



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

DESIRANE COSTA BEZERRA

**NANO-EMULSÕES CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Cymbopogon spp: SISTEMAS COLOIDAIS LIVRES DE
TENSOATIVOS DE INTERESSE PARA A INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS**

**Macapá
2020**

DESIRANE COSTA BEZERRA

**NANO-EMULSÕES CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Cymbopogon spp: SISTEMAS COLOIDAIIS LIVRES DE
TENSOATIVOS DE INTERESSE PARA A INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amapá para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Anna Eliza Maciel
de Faria Mota Oliveira
Co-orientadores: Prof. Dr. Caio Pinho
Fernandes
Prof. Dr. Luiz Everson da Silva

**Macapá
2020**

B574n

Bezerra, Desirane Costa.

Nano-emulsões contendo óleos essenciais de *Cymbopogon* SPP: Sistemas coloidais livres de tensoativos de interesse para a indústria de alimentos / Desirane Costa Bezerra. - Macapá, 2020. 1 recurso eletrônico. 100 folhas.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, 2023.

Orientador: Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira.

Coorientadores: Caio Pinho Fernandes e Luiz Everson da Silva.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Auto – nano - emulsificação. 2. Emulsificação espontânea. 3. Capim - limão. I. Oliveira, Anna Eliza Maciel de Faria Mota; Orientador. II. Fernandes Caio Pinho; Coorientador. III. Silva, Luiz Everson da; Coorientador. IV. Universidade Federal do Amapá. V. Título.

CDD 23. ed. – 664.001579

BEZERRA, Desirane Costa. **Nano-emulsões contendo óleos essenciais de *Cymbopogon* SPP:** Sistemas coloidais livres de tensoativos de interesse para a indústria de alimentos. Orientador: Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira. 100 f. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2023.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Desirane Costa Bezerra

Orientador(a): Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira

Co-Orientador(a): Luiz Everson da Silva

Co-Orientador(a): Caio Pinho Fernandes



Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira / Presidente
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP



Maria Ines Isla / Membro Titular
Universidad Nacional de Tucuman



Adley Antonini Neves de Lima / Membro Titular
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN

Data: 14/09/20

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial meus pais e meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela saúde e força para superar todas as dificuldades durante esta caminhada.

A toda a minha família por todo o apoio, em especial meus pais Manoel Danubio e Maria Rosa por todo o incentivo, amor e suporte em toda a minha vida acadêmica. A minha irmã Desirée que sempre torceu e esteve ao meu lado em todas as dificuldades da vida. Amo vocês!

Ao meu noivo Alan Ferrari, por sempre apoiar minhas escolhas, acreditar no meu potencial e sonhar meus sonhos ao meu lado. Meu amor por você é infinito!

A minha orientadora, professora Anna Eliza, que me acompanha desde o início da graduação, obrigada por todos os ensinamentos, paciência e incentivo. Você é uma inspiração!

Ao professor Caio Fernandes, por toda a dedicação e paciência para comigo no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos ao longo desses anos, você é um dos grandes responsáveis pela conclusão deste sonho, minha gratidão!

Ao professor Luiz Everson, pela colaboração e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa. Muito obrigada!

Ao professor Josean da UFPB pela coloboração neste trabalho.

A todos os colaboradores do laboratório de Nanotecnologia Fitofarmacêutica, em especial ao professor Rodrigo por ser um grande amigo e mestre.

Aos meus amigos do laboratório Jonatas, Naima e Lisset que me acompanharam durante muito tempo desta jornada e sempre torceram por mim.

A todos os meus amigos por todo o apoio e carinho, em especial o Antonio Celio e Herica Núbia. Vocês são incríveis, amo vocês!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ÓLEOS ESSENCIAIS	2
1.1.1	Óleos essenciais em alimentos	4
1.1.2	Gênero <i>Cymbopogon</i>	6
1.1.2.2	<i>Cymbopogon citratus</i>	8
1.1.2.2	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	9
1.3	NANO-EMULSÕES	10
1.3.1	Auto-nano-emulsificação livre de tensoativos	12
1.3.2	Nano-emulsões em alimentos	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	16
3.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	16
3.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	16
3.4	PROPRIEDADES MOLECULARES E FÍSICO-QUÍMICAS <i>in silico</i>	17
3.5	OBTENÇÃO DA INFUSÃO DAS FOLHAS (SISTEMA ALIMENTÍCIO)	17
3.5.1	Análise por RMN de ¹ H	18
3.6	AUTO NANO-EMULSIFICAÇÃO	18

3.7	FATORES DE INFLUÊNCIA NA GERAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES	18
3.7.1	Concentração de óleo na solução estoque	18
3.7.2	Quantidades de fase orgânica ou fase aquosa	18
3.8	OBTENÇÃO DAS NANO-EMULSÕES EM SISTEMA ALIMENTÍCIO	18
3.9	CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES	19
3.9.1	Análise por espalhamento dinâmico da luz (EDL)	19
3.9.2	Variação de tamanho de gotículas	19
4	RESULTADOS	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68
ANEXO 1	Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações com água pura e infusão de <i>C. citratus</i> e <i>C.</i> <i>flexuosus</i> submetidas a rampa de aquecimento	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Rota biosintética da via do mevalonato	4
FIGURA 2 -	Gráfico com o incremento de menções às palavras óleos essenciais e alimentos em base de dados de busca artigos científicos entre os anos 2000 a 2019	5
FIGURA 3 -	Distribuição geográfica do gênero <i>Cymbopogon</i>	7
FIGURA 4 -	<i>Cymbopogon citratus</i>	8
FIGURA 5 -	Diagrama ternário de fase num sistema solvente/água/óleo	13
FIGURA 6 -	NECC ₂₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	30
FIGURA 7 -	NECC ₂₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	31
FIGURA 8 -	NECC ₂₁₂ Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	32
FIGURA 9 -	NECC ₂₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	33
FIGURA 10	NECF ₂₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	35
FIGURA 11	Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula das nano-emulsões (NE) de <i>C. citratus</i> e <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1g de fase aquosa. A-NECC ₂₅₁ : NE de <i>C. citratus</i> na proporção de 1:25 no dia 0. B: NE de <i>C. citratus</i> na proporção 1:25 no dia 1.). NECF ₂₅₁ -C: NE de <i>C. flexuosus</i> na proporção de 1:25 no dia 0. D: NE de <i>C. flexuosus</i> na proporção 1:25 no dia 1	36

FIGURA 12	NECF ₂₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	37
FIGURA 13	NECF ₂₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	38
FIGURA 14	NECF ₂₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	39
FIGURA 15	NECC ₄₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	41
FIGURA 16	NECC ₄₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	42
FIGURA 17	NECC ₄₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	43
FIGURA 18	NECC ₄₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	44
FIGURA 19	NECF ₄₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	45
FIGURA 20	NECF ₄₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	46
FIGURA 21	Gráfico de distribuição de gotícula da nano-emulsão de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque a 4mg/mL de óleo essencial adicionada a 2g de fase aquosa. NECF ₄₅₂ - A: NE na proporção 1:25 dia 0 B: NE na proporção de 1:25 dia 1	47

FIGURA 22	Gráfico de distribuição de gotícula da nano-emulsão de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque a 4mg/mL de óleo essencial adicionada a 2g de fase aquosa). NECF ₄₁₂ - A: NE na proporção 1:25 dia 0 B: NE na proporção de 1:25 dia 1	47
FIGURA 23	NECF ₄₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	48
FIGURA 24	NECF ₄₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	49
FIGURA 25	NECC ₈₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	51
FIGURA 26	NECC ₈₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	52
FIGURA 27	NECC ₈₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	53
FIGURA 28	NECC ₈₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. citratus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa	54
FIGURA 29	NECF ₈₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	55
FIGURA 30	NECF ₈₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa	56
FIGURA 31	NECF ₈₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada 2 g de fase aquosa	57

FIGURA 32	NECF ₈₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de <i>C. flexuosus</i> contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada 2 g de fase aquosa	58
FIGURA 33	Nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>C. flexuosus</i> submetida a rampa linear de temperatura	60
FIGURA 34	Nano-emulsões preparadas com <i>C. citratus</i> (concentradas e diluídas) submetidas a uma rampa linear de temperatura	61
FIGURA 35	Nano-emulsões preparadas com <i>C. flexuosus</i> (concentradas e diluídas) submetidas a uma rampa linear de temperatura	63
FIGURA 36	Espectro das infusões por RMS ¹ H NMR de <i>C. citratus</i> e <i>C. flexuosus</i>	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição química (%) do óleo essencial extraído das folhas de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Cymbopogon flexuosus</i>	21
TABELA 2	Propriedades moleculares e físico-químicas <i>in silico</i> das substâncias presentes nos OEs das espécies de <i>Cymbopogon</i> sp	22
TABELA 3	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. citratus</i> (2mg/mL)	23
TABELA 4	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. citratus</i> (4mg/mL)	24
TABELA 5	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. citratus</i> (8mg/mL)	25
TABELA 6	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> (2mg/mL)	26
TABELA 7	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> (4mg/mL)	27
TABELA 8	Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> (8g/mL)	28

SIGLAS E ABREVIATURAS

CG – Cromatógrafo em fase gasosa

DG- Diâmetro da gotícula

DP - Desvio Padrão

IG- Incremento de gotícula

IP – Índice de polidispersão

CR – *Compositional ripening* (do inglês)

MO – Maturação de Oswald

NE – Nano-emulsão

NECC – Nano-emulsão de *C. citratus*

NECC-AD – Nano-emulsão de *C. citratus* com água deionizada

NECF-AD – Nano-emulsão de *C. flexuosus* com água deionizada

NECC-IN – Nano-emulsão de *C. citratus* com infusão

NECF-IN- Nano-emulsão com *C. flexuosus* com infusão

NECF – Nano-emulsão de *C. flexuosus*

NECC₂₅₁ – Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 2mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₂₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 2mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₂₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 2mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECC₂₁₂- Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 2mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECC₄₅₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 4mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₄₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 4mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₄₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 4mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECC₄₁₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 4mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECC₈₅₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 8mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₈₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 8mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECC₈₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 8mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECC₈₁₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. citratus* a 8mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₂₅₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 2mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₂₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 2mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₂₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 2mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₂₁₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 2mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₄₅₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 4mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₄₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 4mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₄₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 4mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₄₁₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 4mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₈₅₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 8mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₈₁₁ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 8mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 1 g de fase aquosa.

NECF₈₅₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 8mg/mL, 500 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

NECF₈₁₂ - Nano-emulsão preparada com solução estoque do óleo essencial de *C. flexuosus* a 8mg/mL, 1000 µL da fase orgânica e 2 g de fase aquosa.

OE – Óleo essencial

OECC- Óleo essencial de *C. citratus*

OECF- Óleo essencial de *C. flexuosus*

PE – Ponto de ebulição

RG- Redução da gotícula

VA- Volatilização da água

VG – Variação de gotícula

Atualmente, observa-se uma tendência no mercado para a busca de produtos que contenham substâncias de origem natural, livres ou com poucos aditivos sintéticos, especialmente na indústria de cosméticos e alimentos. Os óleos essenciais têm se mostrado uma alternativa ao uso desses aditivos devido a sua versatilidade e ampla variedade de funcionalidades. As espécies *Cymbopogon citratus* e *C. flexuosus*, são de grande potencial para produção de óleos essenciais bioativos. Porém, a baixa solubilidade dificulta a sua aplicabilidade em produtos alimentícios aquosos. O desenvolvimento de nano-emulsões se configura como uma alternativa viável a este entrave tecnológico e permite a sua incorporação em alimentos e bebidas com menor alteração das características organolépticas e até mesmo potencializando o efeito do óleo, além das vantagens relacionadas as nano-emulsões, como estabilidade cinética. Neste estudo, obtivemos através de métodos de emulsificação espontânea, nano-emulsões, livre de tensoativos, a base de duas espécies do gênero *Cymbopogon*. Após análise dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, o β -mirceno foi identificado em *C. citratus* e ausente em *C. flexuosus*, sendo considerado preponderante na estabilização das nano-emulsões mais diluídas contendo óleo essencial de *C. citratus*, provavelmente por mecanismo de “*compositional ripening*” atuando na prevenção da Maturação de Ostwald. Nas nano-emulsões contendo óleo essencial de *C. flexuosus*, mecanismos pouco elucidados de saturação da fase externa e inibição da maturação de Ostwald por “*compositional ripening*” por ésteres terpênicos como o acetato de geranila podem ter sido preponderantes. Também foram obtidas nano-emulsões utilizando a infusão do próprio material vegetal para ambas as espécies, onde os melhores resultados foram alcançados nas nano-emulsões com maior concentração de óleo essencial, a nano-emulsão da espécie *C. citratus* apresentou 147,9 nm de tamanho médio de gotícula e, a nanoemulsão contendo o óleo essencial da espécie *C. flexuosus* apresentou 192,4 nm de tamanho médio das gotículas, além disso as formulações apresentaram aspecto translúcido e efeito tyndal . As propriedades *in silico* sugeriram que a perda de β -mirceno pode induzir a desestabilização das nano-emulsões diluídas por *C. citratus*. O perfil fitoquímico distinto de *C. flexuosus*, incluindo sua infusão, como

evidenciado pela RMN de ^1H , pode ter evitado o crescimento de gotículas das nano-emulsões diluídas. Os estudos feitos fornecem bases para a elaboração de protótipos de grande valor funcional, que podem ser incorporados em sistemas alimentícios, contribuindo para o estado da arte e indústria que almejem produtos nano-emulsificados de alto valor agregado.

Palavras-chave: Auto-nano-emulsificação; emulsificação espontânea; capim-limão; Espalhamento dinâmico da luz

Nowadays, it is observed a tendency for searching for natural products, especially in the cosmetic and food industries. Consumers are looking for innovative products, synthetic-free of with low of these substances, which are associated to enhanced toxic and other undesirable effects. The essential oils have been considered alternative to these additives since they are versatile mixtures with a wide range of functionalities. They are complex mixtures of volatiles that can be obtained from different plant parts, often by hydrodistillation. The species *Cymbopogon citratus* and *C. flexuosus* have great potential for obtaining bioactive essential oils. However, the low water solubility impairs its application in aqueous products. The development of nano-emulsions is considered an viable alternativeto this technological problem and allows the incorporation of essential oils in food and beverages with low impactto in the organopeptic characteristic of the product, being even capable of potentializing a functional effect of the oil, beyond the main advantages of a nano-emulsion, such kinetic stability. Nano-emulsions are colloidal systems constituted by two immiscible liquid often stabilized by a surfactant. However, the use of this constituent may impact another characterist of the final product, also turning it “less natural” and with a composition more complex. It is possible, through the spontaneous emulsification method, to obtain surfactant-free nano-emulsions, inside a context of ecofriendly techniques and components. Therefore, the goal of this study was to obtain and compare the behavior of nano-emulsions based on two species from the genus *Cymbopogon* through this approach. After the analysis of the essential oils by gas-chromatograph coupled to mass spectrometry, the β -myrcene was found on *C. citratus* and not on *C. flexuosus*, being considered decisive in the stabilization of the most diluted nano-emulsions prepared with the essential oil of *C. citratus*, probably due to a compositional ripening mechanism acting against the Ostwald ripening. In the nano-emulsions containing the essential oil of *C. flexuosus*, a few elucidated mechanisms of saturation of external phase and inhibition of Osteald ripening through compositional ripening by terpenic esters, such gerannyl acetate, may have been decisive. Spontaneous nano-emulsions were also prepared using the infusions of the each plant material, for both species. The *in silico* properties suggested that the lossof β -myrcene may induce destabilization of the diluted nano-emulsions of *C. citratus*. The distinct phytochemical profile of *C. flexuosus*, including its infusion, as evidenced by de ^1H nuclear magnetic ressonace may have avoided the droplet growth of diluted nano-emulsions. This study allowed to show the feasibility of obtaining surfactant-free nano-emulsions with essential oils of a phytochemical profile which allowed theoreutical-practical investigations, providing basis for elaboration of prototypes of great functional value, contributing to the state of art and to the industry, that aim nano-emulsified products of high-aggregated value and novelty.

Keywords: Self-nano-emulsification; emulsificação espontânea; lemongrass; dynamic light scattering

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas, seja para fins medicinais, cosméticos ou alimentícios é uma prática que vem se perpetuando por várias as gerações. Das folhas, cascas, caule, raízes ou frutos são feitas tinturas, extratos, infusos e óleos essenciais (OE). Estes últimos caracterizam-se por serem misturas complexas de substâncias que são obtidas de diferentes partes dos vegetais, por processos que envolvem vapor d'água, como técnicas de hidrodestilação ou arraste a vapor. No caso de frutos cítricos, excepcionalmente, os OEs podem ser obtidos pela prensagem dos seus pericarpos.

Os OEs possuem em sua composição uma infinidade de compostos bioativos, com diferentes atividades e aromas característicos. Por estes motivos, esses derivados vegetais vêm sendo utilizados em diversos setores industriais, como por exemplo, em perfumaria, cosméticos, produtos de higiene, produção de fármacos, alimentos e bebidas. Das diversas espécies vegetais produtoras de OEs, destacam-se as do gênero *Cymbopogon*, como *C. citratus* e *C. flexuosus*, popularmente conhecidas como capim-limão. Estas espécies são utilizadas em forma de chás pela medicina tradicional por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antiespasmódico, calmantes e digestivas. Além disso, possuem ampla utilização na forma de chá para fins alimentícios e a própria planta, como especiaria no tempero de alimentos. No entanto, a imiscibilidade de óleos vem dificultar a sua aplicabilidade em produtos aquosos, tornando um desafio tecnológico sua utilização na indústria (ex. bebidas). Uma alternativa viável para tentar solucionar esse problema e otimizar as atividades já descritas seria o desenvolvimento de nano-emulsões (NE).

As NEs caracterizam-se por serem sistemas termodinamicamente instáveis constituídos por dois líquidos imiscíveis, usualmente estabilizados por tensoativos. No entanto, o baixo diâmetro das gotículas da fase externa, habitualmente descritas na faixa de 20-200 nm, tornam esses sistemas coloidais cineticamente estáveis. Elas vêm ganhando um grande destaque na indústria de alimentos e bebidas. O tamanho de gotícula diminuto garante diversas vantagens como a baixa turbidez, melhora da biodisponibilidade das substâncias, incorporação de substâncias lipofílicas, alta estabilidade física contra separação gravitacional, entre outras. Essas características permitem a incorporação de substâncias ativas, sem alterar visivelmente a

apresentação do produto final. Apesar de normalmente possuírem em sua composição um agente emulsificante capaz de reduzir a tensão interfacial, é possível realizar a emulsificação espontânea sem tensoativos, através de métodos de emulsificação espontânea via auto-nano-emulsificação. Nesse caso, é necessária a adição de um componente miscível em ambas as fases, que mediante processo de diluição irá migrar para a fase externa e conseqüentemente gerar as gotículas de tamanho nanométrico. Considerando que a maior parte das NEs possui a fase externa aquosa e a fase interna oleosa (permitindo sua aplicação em produtos aquosos) e o fato de que o etanol possui tais características, podendo também ser encontrado dentro de certos limites em produtos alimentícios, é possível obter NEs a base de óleos essenciais dentro de conceitos teóricos e em consonância com uma abordagem verde por essa estratégia livre de tensoativos.

Além de possível interferência com o sistema alimentício ou alteração sensorial, somam-se algumas desvantagens no uso de tensoativos, tendo alguns estudos demonstrado que essas substâncias estão envolvidas a desconfortos gastrointestinais, além de que a maioria desses agentes são de origem sintética, impactando no nicho específico de consumidor ávido por produtos os mais naturais possíveis. Estudos vêm demonstrando a eficiência de métodos de obtenção de NEs livre de tensoativos devido ao “efeito ouzo” e dentre as vantagens associadas a este método em relação as NEs convencionais, podemos citar a diminuição dos custos e maior possibilidade de incorporação das nanoformulações. Com isso o objetivo deste trabalho é o obter de nano-emulsões com os óleos essenciais de duas espécies do gênero *Cymbopogon*, através de uma abordagem comparativa que permita a utilização de conceitos teóricos para a investigação do comportamento na geração das nano-emulsões sem o uso de tensoativos, com foco na sua aplicação na indústria de alimentos para nano-emulsões com a serem futuramente utilizadas em produtos inovadores, amigáveis ao meio ambiente e funcionais.

1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são derivados vegetais obtidos de diferentes partes das plantas (folhas, flores, frutos, galhos). Eles caracterizam-se por serem misturas complexas de

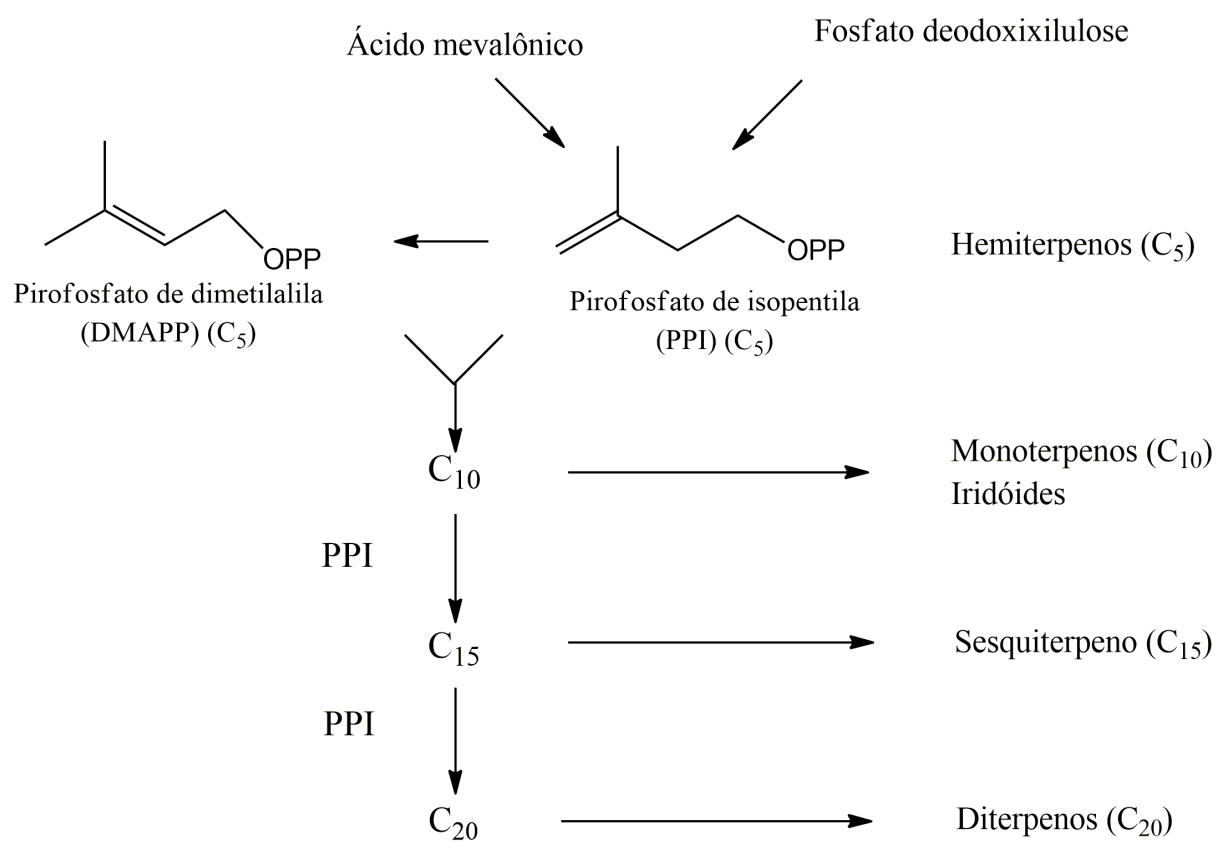
substâncias lipofílicas, como fenilpropanoides, monoterpenos e sesquiterpenos. Substâncias voláteis de folhas verdes (do inglês “Green leaf volatiles”) são substâncias orgânicos que também podem ser encontrados (SIMÕES et al, 2017). Os OEs possuem aroma característico e interessantes atividades biológicas, por isso têm sido exploradas na medicina. Para eles, já foram relatadas ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2007), anti-inflamatória, analgésica (CHANDRASHEKAR; PRASANNA, 2010) e também anticancerígena (BAYALA et al., 2018). Além de poderem ser utilizados na fitoterapia, são potencialmente úteis no desenvolvimento de cosméticos (DORNIC et al., 2018; HALLA et al., 2018) e na indústria de alimentos e bebidas, como conservantes e flavorizantes (CALO et al., 2015).

Os OEs podem ser obtidos por diferentes métodos de extração e segundo ASBAHANI e colaboradores (2015) os métodos podem ser classificados em duas categorias distintas: métodos convencionais e métodos inovadores. O princípio geral dos métodos convencionais é baseado na destilação da água por aquecimento do material vegetal para extração do OE (EL ASBAHANI et al., 2015). Nessa categoria se destaca a hidrodestilação que é caracterizada pela transferência do material vegetal (em contato com a água) para um balão, que por sua vez fica imerso em água aquecida e então as substâncias voláteis são arrastadas pelo vapor d’água e levadas a um condensador onde retornam ao estado líquido. A diferença por densidade, permite a separação do óleo volátil da água. A destilação por arraste a vapor é também um método convencional e um dos mais utilizados para obtenção desses óleos, se diferenciando da hidrodestilação por não ter contato do material vegetal diretamente com a água (EL ASBAHANI et al, 2015; SIMÕES et al, 2017). Nos métodos inovadores destacam-se a extração por fluido supercrítico e extração por solventes (DIMA; DIMA, 2015; EL ASBAHANI et al., 2015; SIMÕES et al, 2017).

Atualmente, segundo a sexta edição da Farmacopéia Brasileira os óleos essenciais são preferencialmente denominados de “óleos voláteis”, dando ênfase a essa característica intrínseca e marcante. Segundo esse compêndio, englobam dentro da sua definição, os seguintes trechos “...obtidos de plantas, por processos físicos, que evaporam à temperatura ambiente sem deixar resíduo... constituídos por misturas complexas de substâncias de baixa massa molecular, que determinam seu odor e sabor. Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados” (BRASIL, 2019).

Os fenilpropanóides são originados do ácido chiquímico, (EL ASBAHANI et al, 2015; SIMÕES et al, 2017), enquanto os terpenóides são originados a partir do isopreno (C₅). Essa última classe constitui a maior variedade de constituintes químicos de OEs. A biossíntese dos terpenos ocorre por duas vias: a rota do ácido mevalônico derivada do acetil-CoA (Figura 1) e a rota do fosfato metileritriol (DEWICK, P. M., 2002, POLITEO et al., 2018).

Figura 1 – Rota biossintética da via do mevalonato



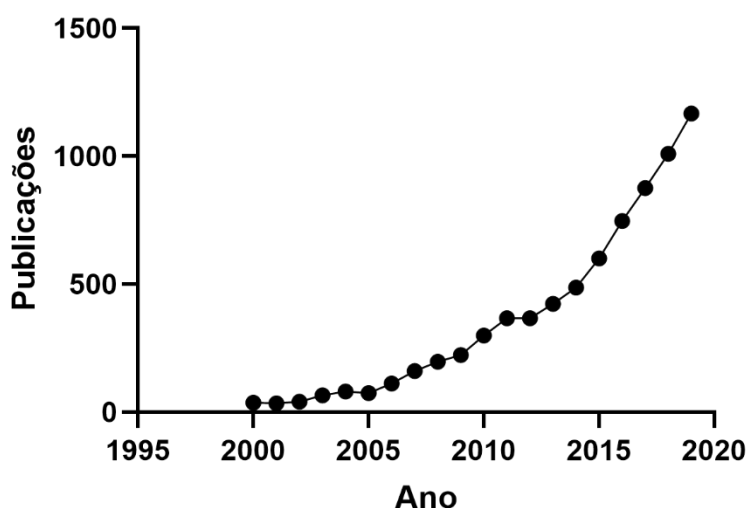
1.1.1. OE em alimentos

Nos últimos anos a crescente procura pelo uso de produtos naturais deu destaque ao uso dos OEs, principalmente na indústria alimentícia. A busca por substitutos aos aditivos sintéticos que comprovadamente podem causar toxicidade e carcinogenicidade (TOMASKA, 2014; DEHGHAN et al., 2018) já é uma realidade. Dentre as diversas funcionalidades almejadas com esses aditivos naturais, a

preocupação com a conservação dos alimentos contra a contaminação e deterioração por microrganismos patogênicos têm papel preponderante.

Segundo o relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde, estima-se que há cerca de 600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos a cada ano (OMS, 2015). Esses microrganismos alteram as características organolépticas dos alimentos e diminuem sua qualidade. As substâncias dos OEs têm sido exaustivamente estudadas, demonstrando o potencial bioativo dessas matérias-primas vegetais frente a diversos patógenos. Por este motivo, o interesse nas atividades associadas aos OEs tem aumentado na indústria alimentícia. Uma pesquisa na base de dados “Web of Science” com as palavras “essential oil*” and “food” demonstram o crescimento nos números de publicações nos últimos 19 anos, conforme o gráfico a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Gráfico com o incremento de menções às palavras óleos essenciais e alimentos em base de dados de busca artigos científicos entre os anos 2000 a 2019.



Fonte: Próprio autor

Além da atividade antimicrobiana, os OEs possuem atividade antioxidante interessante para o aumento da vida útil dos alimentos (OTONI et al., 2016). O mecanismo de oxidação é um grande fator associado à deterioração dos alimentos, alterando sua aparência física, o sabor e causando a perda do seu valor nutricional. Substâncias antioxidantes previnem que esses eventos indesejáveis aconteçam. Devido a gama de substâncias presentes nos OEs, estes têm sido alvo de estudos para avaliação da sua atividade antioxidante (FALLEH et al., 2020). O estudo de

Sacchetti e colaboradores (2005) demonstrou a atividade antioxidante dos OEs de 11 espécies diferentes, dando destaque a espécie *C. citratus* que apresentou potencial atividade antioxidante e antimicrobiana quando comparada aos demais óleos do estudo (SACCHETTI et al., 2005).

Além do potencial uso como aditivos nas funções citadas acima, ainda podem ser utilizados como aromatizantes e até mesmo como aditivos funcionais, indo muito além de meramente preservantes ou agentes de melhoramento das características organolépticas dos alimentos, mas verdadeiros agentes capazes de exercer efeitos complexos à nível fisiológico, que é uma abordagem cada vez mais crescente.

1.2 Gênero *Cymbopogon*

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae e possui mais de 50 espécies distribuídas em países de clima tropical da Ásia, América do Sul e África (ABDULAZEEZ; ABDULLAHI; JAMES, 2016). No Brasil, segundo o site FLORA DO BRASIL (2019) o gênero *Cymbopogon* está presente em diferentes domínios fitogeográficos (FIGURA 3), inclusive na região amazônica (FLORA DO BRASIL, 2019). Apesar de não ser uma planta nativa brasileira, as espécies deste gênero estão adaptadas a climas tropicais e úmidos, dessa forma, proliferam-se sem dificuldade nas diversas regiões do país (ABDULAZEEZ; ABDULLAHI; JAMES, 2016). Diversas espécies da região amazônica são utilizadas pelas suas propriedades medicinais, folhas, cascas, flores, frutos e óleos de origem vegetal são vendidos em mercados populares para atender as necessidades da população, inclusive do gênero *Cymbopogon*. Suas folhas e óleos obtidos das folhas são vendidas em um famoso mercado popular do norte do Brasil, conhecido como Ver o Peso em Belém-PA, pelas suas propriedades medicinais e aroma característico que remete ao limão (ANDRADE, ZOGHBI e LIMA, 2009; SIMÕES et al, 2017).

Os OEs deste gênero têm ganhado destaque na indústria alimentícia por apresentarem importantes atividades contra contaminantes e patógenos de alimentos. Um estudo com OEs de 29 espécies de plantas demonstrou que a espécie *C. martinii* apresentou melhor desempenho contra diferentes sorotipos de *Escherichia coli*, bactéria enteropatogênica comum em alimentos (DUARTE et al., 2007). Já o OE da espécie *C. jawarancusa* apresentou atividade antioxidante, interessante característica

para aplicação em alimentos (DAR et al., 2011). Outras espécies deste gênero também demonstraram atividade repelente e fumigante contra insetos adultos da espécie *Oryzaephilus surinamensis* e *Sitophilus zeamais*, que são importantes agentes causadores de danos no armazenamento de grãos, como milho e farinhas (HERNANDEZ-LAMBRANO et al., 2015).

A espécie *C. citratus* é a mais representativa do gênero e o OE obtido das folhas já demonstrou diferentes atividades biológicas, sendo a mais citada a atividade antimicrobiana (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013; LU et al., 2018; KHOSRAVI et al., 2018). Outras espécies deste gênero têm despertado o interesse, como a espécie *C. flexuosus*, cujo OE apresentou atividade antibacteriana frente à *Acinetobacter baumannii* (ADUKWU et al., 2016). As características morfológicas de *C. citratus* e *C. flexuosus* são semelhantes. Dessa forma, as duas espécies são popularmente conhecidas como capim-limão, capim-santo ou capim cidreira (LORENZI & MATOS, 2002), sendo a *C. citratus* de ocorrência mais comum no Brasil. O OE de *C. flexuosus*, quando comparado ao de *C. citratus*, possui grande semelhança na composição química. (LORENZI e MATOS, 2002). O citral é uma mistura de isômeros (neral e geranial) (PARANAGAMA et al., 2003; PANDEY; RAI; ACHARYA, 2003; SALVIA-TRUJILLO et al., 2014; ADUKWU et al., 2016; FERIOTTO et al., 2018) e é majoritário tanto em *C. citratus* quanto *C. flexuosus*.

Figura 3 – Distribuição geográfica do gênero *Cymbopogon*



Fonte: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >

Cymbopogon citratus

C. citratus é uma espécie herbácea de origem asiática e da África tropical e subtropical. Adapta-se bem em climas tropicais, e por este motivo é cultivada em diversos países, incluindo o Brasil. É uma planta de pequeno porte, perene e com folhas longas, que apresentam cerca de 60 a 85 cm de comprimento e largura de 0,8 a 1,1 cm (FIGURA 4). Quando amassadas exalam odor que remete ao limão e por isso é popularmente conhecida como capim-cidreira, capim-limão, capim-santo e capim-cidrô (BRASIL 2010; RUPPELT et al 2015). Esta espécie é uma das mais estudadas do gênero *Cymbopogon* e seu uso na medicina popular também é comum. A infusão das suas folhas é bastante usada devido a suas propriedades calmantes e antiespasmódicas (RUPPELT et al, 2015). Suas folhas são utilizadas pela população em forma de chás, no tratamento de cólicas intestinais, como diurético, anti-inflamatório e analgésico (SHAH et al., 2011; COSTA et al., 2016).

Figura 4 – *Cymbopogon citratus*



Fonte: www1.londrina.pr.gov.br

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a potencial atividade biológica do OE proveniente das suas folhas, como por exemplo, a atividade antifúngica contra espécies oportunistas como *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Aspergillus Níger*, atividade anti-inflamatória em modelo de edema em orelhas de camundongos (BOUKHATEM et al., 2014) e atividade antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016). Oliveira e colaboradores (2017) adicionaram OE de *C. citratus* a um filme de acetato de celulose e incorporaram em queijo coalho, o que

permitiu a preservação das características físicas e melhora da qualidade do produto artesanal (OLIVEIRA et al., 2017).

A caracterização química do OE das folhas desta espécie demonstrou a presença da substância geranial como majoritária, apresentando cerca de 32,82 a 42,01% da sua composição relativa (AKONO NTONGA et al., 2014; PUSHPANATHAN; JEBANESAN; GOVINDARAJAN, 2006; SAEIO et al., 2011; YEN; LIN, 2017). A substância neral também foi característica nas análises químicas, apresentando-se como o constituinte em segunda maior concentração, além do β -mirceno, que similarmente, aparece em níveis relativamente altos (<10%) (FOKOM et al., 2019; TOFIÑO-RIVERA et al., 2016). A caracterização química feita por cromatografia em fase gasosa também demonstrou a presença de substâncias como o geraniol e linalol, entre outros componentes, sob a forma de traços (concentração menor que 1%) (BOUKHATEM et al., 2014; LIMA OLIVEIRA et al., 2018; UZAIR, 2017).

O óleo essencial extraído das suas folhas apresentou melhor desempenho comparado a outros 11 óleos em relação à atividade antioxidante e maior atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lypolitica*, destacando sua importância na preservação de alimentos (SACCHETTI et al., 2005).

Produtos nanoestruturados com o OE desta espécie foram desenvolvidos, buscando otimizar as atividades já apresentadas pelo óleo essencial. Bonferoni et al (2017) desenvolveu uma nano-emulsão (NE) utilizando quitosana como agente estabilizante da mistura e avaliou a atividade antimicrobiana, demonstrando melhores resultados do que a utilização do OE livre. O desenvolvimento de nanopartículas com o OE de *C. citratus* e a incorporação dessas nanopartículas em um hidrogel, demonstrou atividade anti-herpética (ALMEIDA et al., 2018), Guerra-Rosas e colaboradores (2016) desenvolveram NEs com diferentes óleos essenciais, incluindo o OE de *C. citratus* e avaliou a estabilidade a longo prazo dessas formulações. A NE permaneceu estável por todos os 56 dias de análise e os autores destacaram a utilidade deste na incorporação a alimentos e bebidas por esta característica (GUERRA-ROSAS et al., 2016).

1.2.2. *Cymbopogon flexuosus*

A espécie *C. flexuosus* é originária da Índia e suas características morfológicas são bem parecidas com a espécie *C. citratus*, com folhas longas e estreitas. A composição química do OE dessas duas espécies muito se assemelha, sendo a principal diferença a ausência do β -mirceno na espécie *C. flexuosus* (LORENZI E MATOS, 2008).

Trabalhos conduzidos para avaliação da composição química relativa do OE desta espécie demonstrou a presença do geranial (28, 2% a 38,10%) como substância majoritária, seguindo de neral e geraniol (CASTILLO; STASHENKO; DUQUE, 2017; GAUTAM; AGRAWAL, 2017; NATH et al., 2002). No estudo de Skaria e colaboradores (2012) a ausência do β -mirceno, que é a principal diferença em relação ao OE de *C. citratus*, fez com que a espécie *C. flexuosus* fosse mais solúvel em álcool, quando comparada a essa outra espécie (SKARIA et al., 2012). Dentre os trabalhos para avaliar o potencial biológico do OE desta espécie, podemos citar o de Caballero-Galardo et al (2012), que mostrou que o OE de *C. flexuosus* apresentou atividade repelente frente *Tribolium castaneum* (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012). Também já foi relatada a atividade antibiofilme frente à *Staphylococcus aureus* (ADUKWU; ALLEN; PHILLIPS, 2012). O óleo essencial de *C. flexuosus* foi capaz de inibir totalmente o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* (KUMAR et al., 2009), microrganismo conhecido por contaminar alimentos como amendoim, castanhas e soja.

Pesquisas recentes também têm revelado o interesse na utilização de sistemas nanoestruturados com intuito de encapsular esse OE. O desenvolvimento de uma NE a base do OE de *C. flexuosus* demonstrou a capacidade de gerar uma melhor atividade contra *Mycobacterium fortuitum*, *M. massiliense* e *M. abscessus* nas suas formas planctônicas em modelos *in vitro*, quando comparada ao óleo livre (ROSSI et al., 2017) e NE contendo o OE de *C. flexuosus* impediram a formação de biofilme das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (DA SILVA GÜNDEL et al., 2018).

1.3 NANO-EMULSÕES

A nanotecnologia caracteriza-se pela manipulação e exploração de materiais em escala nanométrica. É uma área emergente e em franca expansão que pode proporcionar melhores características físico-químicas e modificar propriedades funcionais quando comparadas a escalas micro/macrosscópicas. Além disso, é um campo multidisciplinar que abrange diferentes setores da indústria, como a de medicamentos, cosméticos e alimentos. Devido ao seu enorme potencial esta tecnologia tem sido alvo de muitas pesquisas e tem demonstrado importantes avanços (KALE; DEORE, 2016). Dentro desse sistema temos as nano-emulsões (NE), que são definidas como a mistura de dois líquidos imiscíveis, onde um líquido é disperso em uma fase externa em forma de gotículas em escala nanométrica. Frequentemente são preparadas utilizando-se emulsificantes, onde geralmente estes são agentes tensoativos (BRUXEL et al., 2012). As NEs são sistemas termodinamicamente instáveis e o seu tamanho de gotícula diminuto (20 a 200 nm) lhes permite algumas características físicas em particular, como a baixa viscosidade, aparência opaca ou transparente e estabilidade cinética (MCCLEMENTS, 2011; MEHTA; KAUR, 2011).

Podem ser obtidas por diferentes métodos, denominadamente de alto ou baixo aporte de energia. A escolha do método é um passo importante para determinar algumas características das formulações (VANDAMME; ANTON, 2010). Nos métodos de alto aporte de energia são utilizados equipamentos mais robustos capazes de obter as NEs pela própria capacidade do equipamento gerar energia, onde gotículas nanométricas irão formar-se através da ruptura de gotículas maiores. Dentre esses, encontram-se os sonicadores, homogeneizadores de alta pressão e microfluidificadores (MCCLEMENTS, 2011).

Nos métodos de baixo aporte de energia a inversão de fases consiste na mudança de um sistema água em óleo para um sistema óleo em água ou vice-versa variando ou não a temperatura. O importante nesse caso, é a mudança na curvatura espontânea do tensoativo, que irá indicar efetivamente que houve a inversão (ARAÚJO, 2013). NE também podem ser desenvolvidas por processo de auto-emulsificação, também chamada de emulsificação espontânea, onde ocorre a diluição da fase contínua e a energia química liberada durante esse processo favorece a formação de gotículas nanométricas. Nesses casos a rápida liberação de moléculas

de solvente ou tensoativos para a fase externa desempenham papel crucial no processo. Quando as NEs são formadas na ausência de tensoativo, ocorre o “efeito ouzo” ou devendo haver uma alta relação solvente/óleo (SOLANS; SOLÉ, 2012).

A nano-emulsificação de óleos sem tensoativos apresenta também vantagens comerciais, como a diminuição dos custos das nano-emulsões e aumenta as opções de aplicabilidade das formulações (SOLANS; MORALES; HOMS, 2016). Além disso, a maioria dos tensoativos disponíveis são de origem sintética e atualmente a tendência do mercado é a busca por produtos de origem natural, que sejam sustentáveis, chamados de produtos *ecofriendly*. Isto indica o potencial das nano-emulsões contendo produtos naturais para as mais variadas áreas da indústria.

1.3.1 Auto nano-emulsificação livre de tensoativos

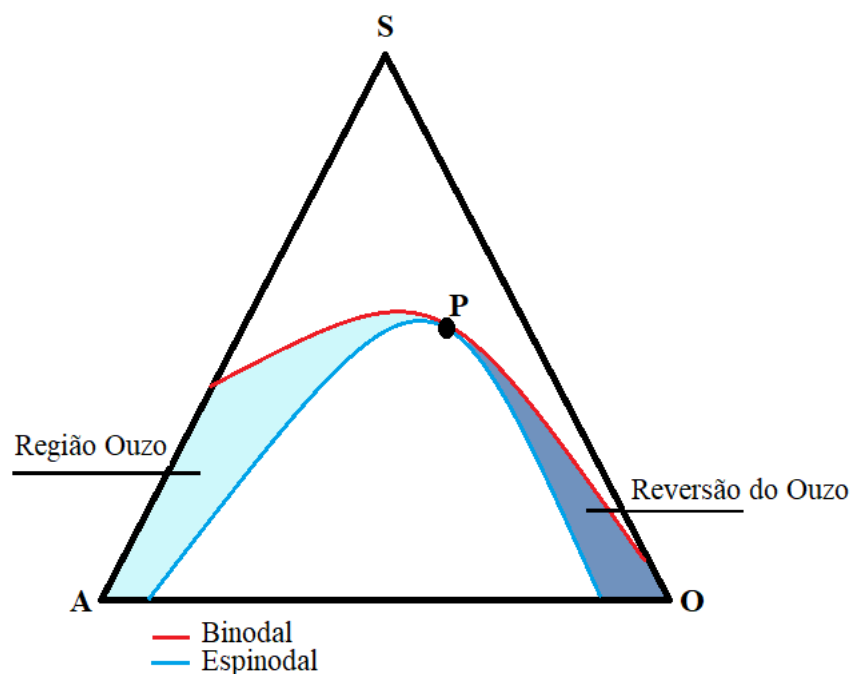
O processo de auto-nano-emulsificação ou emulsificação espontânea livre de tensoativos baseia-se na formação de um sistema nanoestruturado composto por dois líquidos imiscíveis, (usualmente nanogotículas de óleo dispersas em água) e um solvente suficientemente miscível em ambas as fases (SAKAI, 2008; FISCHER et al., 2015). Segundo Solan e Solé (2012) ao adicionar a fase orgânica (óleo+solvente) sob a fase contínua ocorre a rápida difusão do solvente para a fase externa devido a supersaturação, levando a formação de gotículas com diâmetro em escala nanométrica.

Estudos recentes buscaram elucidar o processo de emulsificação espontânea que envolvem o “efeito ouzo” e a utilização do diagrama ternário de fases tem sido considerada uma ferramenta útil na explicação deste fenômeno. Lepeltier e colaboradores (2014) demonstram através do diagrama de fases que as formulações obtidas na região do ouzo encontram-se entre as curvas binodal, região em que duas fases distintas podem coexistir, e curva espinodal, que separa regiões instáveis e metaestáveis (Figura 5) (LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014).

Dentre os fatores influenciam a estabilidade do sistema das nano-emulsões por esta técnica, a composição, temperatura, densidade dos componentes e solubilidade mútua podem alterar o tamanho das gotículas (SOLANS; MORALES; HOMS, 2016) e

a remoção do solvente pode reduzir o aparecimento de eventos relacionados à instabilidade, como a separação de fases (KUMAR; PRUD'HOMME, 2009).

Figura 5 – Diagrama ternário de fase num sistema solvente/água/óleo



1.2.3 Nano-emulsões em alimentos

Estudos comprovam que a saúde humana está diretamente relacionada com o tipo de alimentação de cada indivíduo. O consumo excessivo de certos alimentos está levando ao aumento de doenças como obesidade, diabetes e problemas cardíacos. Dessa forma, o interesse por alimentos funcionais (nutracêuticos) tem aumentado (VIANA et al., 2017).

A ciência dos coloides têm sido um importante aliado na melhora das características dos alimentos. Formulações contendo NEs proporcionam a melhora dos perfis funcionais devido a bioatividade de possíveis produtos naturais que podem ser incorporados apesar de sua natureza lipofílica (MCCLEMENTS, 2017). A exemplo disto, temos as NEs com OE, aplicadas tanto dentro dos sistemas alimentícios como em embalagens para preservação de alimentos (RIBEIRO-SANTOS; ANDRADE; SANCHES-SILVA, 2017).

Kwan e Pardo (2018) desenvolveram NEs com óleo de laranja e incorporaram em hidrogéis. Os resultados demonstraram que os hidrogéis foram capazes de

encapsular o óleo e liberar seu sabor e compostos voláteis em contato com a saliva artificial. O desenvolvimento de uma NE com óleo essencial de *Backhousia citriodora* demonstrou melhor atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes* e *Escherichia coli* em modelo *in vitro* quando comparada ao óleo essencial livre (NIRMAL et al., 2018).

Os aspectos físico-químicos das NEs, como a baixa turbidez, aparência translúcida, alta estabilidade física e boa eficiência de encapsulação, tem feito com que esses sistemas sejam escolhas na incorporação em alimentos e bebidas (QIAN; MCCLEMENTS, 2011). Estudos demonstrados acima afirmam que as nano-emulsões possuem vantagens quando comparadas aos sistemas convencionais. Portanto, é de se esperar que sistemas livres de tensoativos ofereçam vantagens adicionais devido a sua composição com menos aditivos. Uma vez bem estáveis e formuladas por técnicas amigáveis ao meio ambiente, podem ser exploradas para de forma economicamente viável para um nicho em franca expansão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar NEs livres de tensoativos com potencial para a indústria alimentícia, a partir dos óleos essenciais individuais das espécies *C. citratus* e *C. flexuosus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar qualitativamente e quantitativamente os componentes dos OEs de *C. citratus* e *C. flexuosus* por cromatografia em fase gasosa (CG-EM e CG-DIC);
- b) Analisar o perfil da infusão das folhas de *C. citratus* e *C. flexuosus* por RMN de ^1H
- c) Obter as NEs e avaliar parâmetros de influência em sua formação;
- d) Correlacionar os resultados experimentais com propriedades moleculares e físico-químicas *in silico* dos componentes dos OEs;
- e) Caracterizar físico-quimicamente as NEs por espalhamento dinâmico da luz;
- f) Avaliar o comportamento das NEs preparadas e diluídas em sistema alimentício (infusão das folhas);
- g) Avaliar a estabilidade das NEs em 24 horas através da análise macroscópica e parâmetros físico-químicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As plantas foram coletadas na Fazenda Experimental de Canguiri, Universidade Federal do Paraná, Pinhais, PR. As plantas foram transportadas para o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, PR, onde foram herborizadas (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992) e registradas na coleção. As espécies do estudo foram identificadas depositando-se a exsicata de *C. citratus* no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba com o número MBM 389414 e o espécime de *C. flexuosus* no herbário Royal Botanic Gardens, Kew com o número H2014 / 02284. As espécies de estudo foram cadastradas no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro AB84CB8.

3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A obtenção do óleo essencial de *C. citratus* (OECC) e do óleo essencial de *C. flexuosus* (OECF) foi realizada por hidrodestilação no laboratório de química da Universidade Federal do Paraná por um período de 2,5 horas em aparato do tipo Clevenger, utilizando 100 g de folhas frescas em 1 L de água destilada. Este procedimento foi repetido por 3 vezes (WASICKY, 1963). Após as extrações, as amostras foram coletadas e acondicionadas em um freezer (4°C) onde permaneceram até o momento da análise.

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM) no laboratório de química da Universidade Federal do Paraná. Os OEs foram diluídos em diclorometano na proporção de 1% (v/v) e 1 µL foi injetado em um cromatógrafo gasoso 6890 (Agilent) acoplado a um detector de massa 5973N. O injetor foi mantido a 250 ° C. A separação dos constituintes foi realizada utilizando-se uma coluna capilar HP-5MS (5% -fenil-

95% - dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 ° C, com incremento a taxa de 3 ° C min⁻¹. O detector de massas foi operado no modo de ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 scans s⁻¹ e alcance de 40 a 450 u. O liner de transferência foi mantido a 260° C, a fonte de íons a 230° C e o analisador de quadrupolo a 150° C.

A identificação dos constituintes químicos foi obtida através da comparação de seus espectros de massa com bibliotecas de comparação (WILEY, 1994; NIST, 2016) e por suas taxas de retenção linear, calculadas a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₇ - C₂₆) e em comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Para quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em um cromatógrafo Agilent 7890A equipado com um detector de ionização de chama (DIC), operado a 280 °C. Foi utilizada uma coluna similar e as mesmas condições analíticas descritas acima foram empregadas, exceto pelo gás de arraste utilizado, que foi hidrogênio na presente análise por CG-DIC e a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal DIC, dividindo-se a área de cada componente pela área total (área %).

3.4 PROPRIEDADES MOLECULARES E FÍSICO-QUÍMICAS *in silico*

As propriedades moleculares e físico-químicas das substâncias presentes no OECC e OCCF foram obtidas através da plataforma ChemSpider da Royal Society of Chemistry (Rao and McClements, 2012). As propriedades foram obtidas a partir das seguintes bases de dados conforme a seguir: logP, densidade, tensão superficial (ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module) e solubilidade em água (US Environmental Protection Agency's EPISuite™).

3.5 OBTENÇÃO DA INFUSÃO DAS FOLHAS (SISTEMA ALIMENTÍCIO)

As folhas secas foram extraídas por infusão com água na proporção de 1:100 de planta/solvente por 10 minutos. Após esse período, foi efetuada a filtração e

imediatamente utilizada para a preparação de NEs e avaliação do seu comportamento em sistema alimentício.

3.5.1 Análise por RMN de ^1H

O espectro de ^1H RMN das infusões de folhas de *C. citratus* e *C. flexuosus* foram registradas a 400 MHz em um espectrômetro Varian VNMRS 500 MHz. Foi utilizada água deuterada (Laboratórios Cambridge Isotope) para diluição.

3.6 AUTO-NANO-EMULSIFICAÇÃO

Foram preparadas soluções-estoque contendo OECC ou OCCF em etanol 96 % (v/v), a fim de proporcionar a fase orgânica. Em seguida a fase orgânica foi adicionada gota a gota sobre a fase aquosa sob agitação vigorosa em agitador tipo vórtex. Ao final, o aparecimento de um reflexo azulado foi considerado um indicativo da geração de nanogotículas devido ao efeito Tyndal.

3.7 FATORES DE INFLUÊNCIA NA GERAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES LIVRES DE TENSOATIVOS

3.7.1. Concentração de óleo na solução estoque

O efeito da concentração de OE na solução estoque foi verificado pela utilização de diferentes concentrações conforme a seguir: 2 mg/mL, 4 mg/mL e 8 mg/mL.

3.7.2. Quantidades de fase orgânica ou fase aquosa

O efeito da variação da alíquota de fase orgânica adicionada (500 μL ou 1000 μL) sobre a fase aquosa (1 g ou 2 g) também foi avaliado sobre a geração e estabilização das nano-emulsões.

3.8 OBTENÇÃO DAS NANO-EMULSÕES EM SISTEMA ALIMENTÍCIO

As nano-emulsões livres de tensoativos contendo OECC ou OECF por auto-nano-emulsificação, previamente submetidas ao screening quanto aos parâmetros de geração de estabilização, foram preparadas e diluídas em sistema alimentício (infusão das folhas). O efeito da composição da fase aquosa na nano-emulsificação foi avaliado utilizando-se água deionizada ou infusões preparadas com cada planta. As folhas foram colocadas em um bécker de vidro e, em seguida, foi adicionada água deionizada recentemente fervida. Após 10 min, uma etapa preliminar de filtração foi realizada para remover o material vegetal e a fase aquosa foi filtrada em um filtro 0,22µm previamente a sua utilização. As NEs foram preparadas com o OE e a infusão correspondente, de plantas da mesma espécie.

3.9. CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES

3.9.1. Análise por espalhamento dinâmico da luz (EDL)

A análise por espalhamento dinâmico de luz (EDL) foi realizada no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido) para determinar a distribuição do tamanho das gotículas, em termos de diâmetro das gotículas e índice de polidispersão (IP). O equipamento possui um laser vermelho de 10 mW ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) e as amostras foram medidas em um ângulo de espalhamento de 173 ° para medições de tamanho. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

As nano-emulsão a base de OECC e OECF escolhidas para preparação em sistema alimentício foram submetidas à análise em uma rampa linear de temperatura programada conforme a seguir: temperatura inicial de 25 °C e aumentada no intervalo de 5 °C unidades para uma temperatura final de 80 °C. As amostras foram inseridas diretamente na cubeta de vidro e submetidas à análise.

3.9.2. Variação de tamanho de gotículas

A variação de tamanho de gotículas (VG) em termos de diâmetro foi determinada (Guttoff 2015; Mehmood, 2015) e expressa da seguinte forma: $VG_x, y = 100 \times$

$$\frac{[\text{diâmetro médio do tamanho (dy)} - \text{diâmetro médio do tamanho (dx)}]}{\text{média diâmetro do tamanho (dx)}}$$
 em que $V_{Gx, y}$ é a variação do tamanho da gotícula na faixa de $X \rightarrow Y$, onde X pode ser o diâmetro médio no limite inferior do intervalo de armazenamento e Y pode ser diâmetro médio no limite superior do intervalo de armazenamento ($X \rightarrow Y \text{ h}$), ou X pode ser o diâmetro médio no limite superior do intervalo de aquecimento e Y pode o diâmetro médio no limite superior do intervalo de aquecimento ($X \rightarrow Y \text{ }^{\circ}\text{C}$)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de hidrodestilação resultou em OEs ligeiramente amarelados e com odor bem característico. A análise química por cromatografia em fase gasosa permitiu a identificação das substâncias presentes nos OEs das espécies de *Cymbopogon sp* (Tabela 1). Como já era esperado, o geranial apresentou maior proporção no OECC quanto no OECF, seguido por neral e geraniol. A principal diferença entre os dois OEs foi a presença do β -mirceno no OECC em quantidade relativamente alta (14,1 %) e sua ausência no OECF.

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial extraído das folhas de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*.

MONOTERPENOS	IR ^a	IR ^b	<i>C. citratus</i>	<i>C. flexuosus</i>
β -Mirceno	990	998	14,1	ND
Linalol	1099	1095	0,8	0,7
Neral *	1241	1235	29,6	31,4
Geraniol	1254	1249	5,7	3,9
Geranial *	1272	1264	39,7	46,4
Acetato de geranil*	1384	1381	1,8	3,3
Outros			5,9	10,9
Total identificado			97,6	96,6
Citral*			69,3	77,8

IR^a: Índice de retenção calculado. IR^b: índice de retenção da literatura.

ND – Não Detectado.

Ao analisar as propriedades moleculares e físico-químicas *in silico* (Tabela 2) observou-se que o β -mirceno é a substância com menor ponto de ebulição (PE) e maior logP. É sabido que essas características estão associadas a compostos mais lipofílicos e a baixa solubilidade em água confirma sua propriedade mais lipofílica. Outra substância com essas características é o acetato de geranila, presente em uma concentração cerca de 1,5-2,0 vezes maior no OECF (3,3%) do que no OECC. Seria de esperar que a volatilização da água (VA) sob fluxo, como no modelo - rio, levasse a uma maior partição para a atmosfera. Uma correlação positiva entre os PE e a VA não foi observada devido aos valores previstos de linalol e acetato de geranila, onde o primeiro tem o segundo menor PE e maior volatilização a partir da água e o segundo tem maior PE e segunda menor VA. O neral, o geraniol e o geranial apresentaram

valores de PE em torno de 229 ° C, sendo a volatilização prevista da água semelhante entre eles. A investigação dessas propriedades permitiu correlacionar o comportamento do OEs no desenvolvimento das NEs.

Tabela 2. Propriedades moleculares e físico-químicas *in silico* das substâncias presentes nos OEs das espécies de *Cymbopogon* sp.

Substâncias	Log P	Ponto de ebulição (°C)*	Solubilidade em água (mg/L)	Volatilização da água (h)**	
				Modelo – Rio	Modelo - Lago
β-Mirceno	4,58	167,0 ± 0,0	6,923	1,202	111
Linalol	3,28	198,5 ± 0,0	683,7	35,09	486,9
Neral	3,17	229,0 ± 9,0	84,71	17,87	298,4
Geraniol	3,28	229,5 ± 0,0	255,8	13,61	252,6
Geranial (citral)	3,17	229,0 ± 9,0 °C	84,71	17,87	298,4
Acetato de Geranila	4,10	247,5 ± 0,0 °C	18,24	3,696	157,8

*em 760 mmHg

** meia-vida em horas

A utilização da técnica de emulsificação espontânea se mostrou capaz de gerar satisfatoriamente nano-emulsões com os óleos essenciais das duas espécies de campim-limão. Os dados obtidos após análise por espalhamentos dinâmicos da luz encontram-se nas tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e a análise dos gráficos de distribuição de tamanho é feita a seguir.

Tabela 3. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. citratus* (2mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamanho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECC ₂₅₁	Concentrada	1362 ± 333,8	0,975 ± 0,044	-	-	-
	1:1	765,9 ± 52,12	0,803 ± 0,119	958,6 ± 72,16	0,788 ± 0,187	25,15
	1:10	484,1 ± 47,64	0,566 ± 0,096	506,1 ± 57,58	0,595 ± 0,061	4,54
	1:25	734,1 ± 60,10	0,459 ± 0,020	655,8 ± 120,4	0,531 ± 0,096	-10,66
NECC ₂₁₁	Concentrada	1982 ± 232,9	0,142 ± 0,101	537,7 ± 155,1	0,372 ± 0,065	-72,87
	1:1	426,3 ± 13,91	0,317 ± 0,081	630 ± 40,9	0,313 ± 0,038	47,78
	1:10	250,9 ± 4,801	0,421 ± 0,010	228,5 ± 13,37	0,444 ± 0,017	-8,92
	1:25	228,7 ± 2,354	0,217 ± 0,003	242,4 ± 8,031	0,525 ± 0,013	5,99
NECC ₂₅₂	Concentrada	1097 ± 54,85	0,188 ± 0,077	1451 ± 97,6	0,075±0,105	32,26
	1:1	452,1 ± 5,139	0,113 ± 0,018	558,4 ± 8,256	0,161 ± 0,019	23,51
	1:10	233,4 ± 12,26	0,183 ± 0,039	302,7 ± 1,637	0,203 ± 0,012	29,69
	1:25	228,7 ± 2,354	0,217 ± 0,003	332,4 ± 23,55	0,313 ± 0,077	45,34
NECC ₂₁₂	Concentrada	2941 ± 592,1	0,202 ± 0,183	2809 ± 922,4	0,468 ± 0,189	-4,48
	1:1	810,3 ± 104,8	0,923 ± 0,088	445,6 ± 32,81	0,587 ± 0,094	-45,00
	1:10	493,2 ± 25,33	0,568 ± 0,043	351,6 ± 33,45	0,504 ± 0,095	-28,71
	1:25	515,8 ± 56,68	0,538 ± 0,081	537,9 ± 51,65	0,577 ± 0,011	4,28

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro
IP é o índice de polidispersão

Tabela 4. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. citratus* (4mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamanho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECC ₄₅₁	Concentrada	4985 ± 772,5	0,400 ± 0,157	-	-	-
	1:1	476,20 ± 33,38	0,452 ± 0,031	707 ± 39,91	0,364 ± 0,073	48,46
	1:10	465 ± 4,409	0,331 ± 0,048	442,4 ± 36,57	0,419 ± 0,022	-4,86
	1:25	824 ± 93,14	0,479 ± 0,060	444,9 ± 10,78	0,313 ± 0,032	-46,00
NECC ₄₁₁	Concentrada	2028 ± 543,6	0,662 ± 0,107	2370 ± 192,3	0,236 ± 0,135	16,86
	1:1	580,1 ± 16,5	0,152 ± 0,016	481,7 ± 3,927	0,139 ± 0,023	-16,96
	1:10	350 ± 12,26	0,363 ± 0,006	208,3 ± 11,07	0,355 ± 0,019	-40,48
	1:25	291,6 ± 13,49	0,379 ± 0,004	284,8 ± 21,05	0,400 ± 0,030	-2,33
NECC ₄₅₂	Concentrada	3315 ± 644,3	0,333 ± 0,046	1527 ± 698,7	0,608 ± 0,431	-53,93
	1:1	2150 ± 96,91	0,532 ± 0,418	942,6 ± 29,39	0,208 ± 0,023	-56,15
	1:10	723,4 ± 35,96	0,271 ± 0,037	520,5 ± 38,81	0,245 ± 0,017	-28,04
	1:25	753,4 ± 19,05	0,406 ± 0,034	497,7 ± 22,24	0,291 ± 0,072	-33,93
NECC ₄₁₂	Concentrada	962,8 ± 267,7	0,600 ± 0,347	756,7 ± 169,6	0,784 ± 0,374	-21,40
	1:1	583,9 ± 33,43	0,302 ± 0,080	563,5 ± 36,23	0,476 ± 0,037	-3,49
	1:10	281,5 ± 8,228	0,207 ± 0,027	306,1 ± 11,80	0,263 ± 0,013	8,73
	1:25	276 ± 4,735	0,221 ± 0,006	305,2 ± 15,06	0,328 ± 0,053	10,57

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro

IP é o índice de polidispersão

Tabela 5. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. citratus* (8mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamanho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECC ₈₅₁	Concentrada	254,3 ± 11,63	0,229 ± 0,014	-	-	-
	1:1	280,0 ± 10,33	0,353 ± 0,036	196,8 ± 2,234	0,265 ± 0,013	-29,71
	1:10	163,4 ± 4,008	0,340 ± 0,029	170,1 ± 17,72	0,332 ± 0,061	4,10
	1:25	273 ± 41,40	0,388 ± 0,041	157,7 ± 10,05	0,276 ± 0,031	-42,23
NECC ₈₁₁	Concentrada	1138 ± 187,7	0,385 ± 0,192	1408 ± 187	0,199 ± 0,005	23,72
	1:1	464,3 ± 12,81	0,380 ± 0,022	369,8 ± 11,09	0,391 ± 0,020	-20,35
	1:10	274,7 ± 12,74	0,743 ± 0,065	563,7 ± 61,58	0,606 ± 0,026	105,20
	1:25	421,6 ± 21,09	0,677 ± 0,086	449,3 ± 133	0,511 ± 0,064	6,57
NECC ₈₅₂	Concentrada	259,4 ± 1,700	0,206 ± 0,014	283 ± 5,758	0,368 ± 0,050	9,09
	1:1	194,3 ± 1,222	0,208 ± 0,004	207,3 ± 3,378	0,332 ± 0,018	6,69
	1:10	154,6 ± 1,940	0,345 ± 0,015	197 ± 7,679	0,333 ± 0,006	27,42
	1:25	131,2 ± 2,854	0,319 ± 0,036	225,8 ± 11,47	0,356 ± 0,029	72,10
NECC ₈₁₂	Concentrada	383,3 ± 5,072	0,147 ± 0,092	519,7 ± 5,069	0,501 ± 0,169	35,58
	1:1	296,5 ± 3,253	0,315 ± 0,047	420,1 ± 17,90	0,591 ± 0,041	41,68
	1:10	196,6 ± 6,056	0,376 ± 0,037	382,3 ± 3,329	0,492 ± 0,046	94,45
	1:25	223,2 ± 18,04	0,355 ± 0,044	598,9 ± 12,12	0,541 ± 0,031	168,32

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro
IP é o índice de polidispersão

Tabela 6. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. flexuosus* (2mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamaho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECF ₂₅₁	Concentrada	124,6 ± 0,7371	0,137 ± 0,023	251,5 ± 45,46	0,415 ± 0,104	101,84
	1:1	102,8 ± 2,924	0,218 ± 0,031	121,7 ± 2,631	0,338 ± 0,029	18,38
	1:10	149 ± 35,04	0,277 ± 0,017	254,5 ± 60,23	0,500 ± 0,063	70,80
	1:25	350,3 ± 125,5	0,435 ± 0,067	423,1 ± 52,85	0,561 ± 0,076	20,78
NECF ₂₁₁	Concentrada	213,8 ± 60,34	0,308 ± 0,102	227,7 ± 5,220	0,143 ± 0,008	6,50
	1:1	167,7 ± ± 1,102	0,086 ± 0,024	224,7 ± 0,9000	0,094 ± 0,031	33,98
	1:10	121,7 ± 3,424	0,303 ± 0,023	167,1 ± 1,531	0,206 ± 0,062	37,30
	1:25	135,6 ± 3,027	0,369 ± 0,014	210,9 ± 7,087	0,290 ± 0,012	55,53
NECF ₂₅₂	Concentrada	157,4 ± 3,197	0,420 ± 0,026	165,7 ± 1,250	0,308 ± 0,038	5,27
	1:1	172,4 ± 31,45	0,447 ± 0,134	145,8 ± 8,792	0,361 ± 0,055	-15,42
	1:10	159,7 ± 19,48	0,441 ± 0,086	154 ± 11,28	0,476 ± 0,077	-3,56
	1:25	308,3 ± 27,19	0,476 ± 0,024	274,4 ± 12,51	0,436 ± 0,035	-10,99
NECF ₂₁₂	Concentrada	132,5 ± 3,666	0,222 ± 0,023	135,4 ± 1,274	0,278 ± 0,004	2,18
	1:1	104,9 ± 2,281	0,184 ± 0,034	107,2 ± 1,457	0,195 ± 0,006	2,19
	1:10	82,42 ± 1,437	0,320 ± 0,014	109 ± 3,011	0,386 ± 0,011	32,24
	1:25	108,3 ± 13,24	0,504 ± 0,127	117 ± 3,510	0,563 ± 0,024	8,03

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro
IP é o índice de polidispersão

Tabela 7. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. flexuosus* (4mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamanho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECF ₄₅₁	Concentrada	193,1 ± 2,201	0,224 ± 0,010	-	-	-
	1:1	141,2 ± 4,252	0,146 ± 0,034	117,4 ± 1,159	0,181 ± 0,032	-16,85
	1:10	110,1 ± 5,547	0,275 ± 0,014	96,85 ± 7,116	0,306 ± 0,046	-12,03
	1:25	113,7 ± 6,242	0,327 ± 0,018	153,2 ± 9,366	0,397 ± 0,016	34,74
NECF ₄₁₁	Concentrada	351,8 ± 7,812	0,085 ± 0,034	339,3 ± 8,658	0,076 ± 0,053	-3,55
	1:1	401,7 ± 3,037	0,045 ± 0,020	411,4 ± 10,29	0,062 ± 0,033	2,41
	1:10	229,4 ± 2,571	0,101 ± 0,036	184,3 ± 0,8185	0,186 ± 0,008	-19,66
	1:25	196,7 ± 5,755	0,144 ± 0,013	178,1 ± 1,168	0,216 ± 0,020	-9,46
NECF ₄₅₂	Concentrada	199,9 ± 1,510	0,194 ± 0,003	189,0 ± 0,4726	0,176 ± 0,005	-5,45
	1:1	155,1 ± 1,418	0,227 ± 0,010	148,5 ± 1,790	0,203 ± 0,015	-4,25
	1:10	156,8 ± 22,76	0,353 ± 0,087	130,4 ± 0,9644	0,342 ± 0,019	-16,84
	1:25	222,5 ± 22,42	0,304 ± 0,032	134,7 ± 9,067	0,349 ± 0,015	-39,46
NECF ₄₁₂	Concentrada	168,4 ± 0,4583	0,114 ± 0,024	193,3 ± 2,234	0,230 ± 0,003	14,78
	1:1	145,4 ± 0,6083	0,090 ± 0,010	152,4 ± 2,330	0,200 ± 0,011	4,81
	1:10	91,36 ± 2,712	0,256 ± 0,033	115,5 ± 3,134	0,275 ± 0,040	26,42
	1:25	85,63 ± 3,075	0,207 ± 0,038	179,8 ± 21,64	0,465 ± 0,131	109,97

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro
IP é o índice de polidispersão

Tabela 8. Parâmetros de distribuição de tamanho de gotículas das nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. flexuosus* (8mg/mL)

Nano-emulsão	Diluições	Dia 0		Dia 1		Variação de tamanho
		Tamanho (nm)	IP	Tamanho (nm)	IP	
NECF ₈₅₁	Concentrada	1026 ± 75,10	0,239 ± 0,198	-	-	-
	1:1	1055 ± 118,6	0,110 ± 0,096	683,6 ± 3,465	0,112 ± 0,047	-35,20
	1:10	462,6 ± 6,780	0,149 ± 0,067	415 ± 78,08	0,435 ± 0,078	-10,28
	1:25	735,2 ± 63,25	0,488 ± 0,204	435,2 ± 6,361	0,379 ± 0,022	-40,80
NECF ₈₁₁	Concentrada	836,3 ± 21,69	0,111 ± 0,077	1018 ± 24,49	0,134 ± 0,112	21,72
	1:1	519,5 ± 36,68	0,402 ± 0,030	360,5 ± 4,801	0,201 ± 0,025	-30,60
	1:10	258,1 ± 5,843	0,435 ± 0,028	205,1 ± 4,252	0,339 ± 0,014	-20,53
	1:25	261,4 ± 11,43	0,422 ± 0,022	243,9 ± 17,36	0,723 ± 0,117	-6,69
NECF ₈₅₂	Concentrada	295,6 ± 5,750	0,112 ± 0,036	288,2 ± 3,179	0,105 ± 0,011	-2,50
	1:1	221,5 ± 1,114	0,114 ± 0,023	219,0 ± 2,230	0,115 ± 0,008	-1,12
	1:10	140,5 ± 1,744	0,174 ± 0,027	168,7 ± 2,281	0,212 ± 0,026	20,07
	1:25	144,2 ± 4,553	0,264 ± 0,030	255,9 ± 28,83	0,330 ± 0,047	77,46
NECF ₈₁₂	Concentrada	842 ± 17,60	0,041 ± 0,038	694,4 ± 4,895	0,071 ± 0,062	-17,52
	1:1	882,6 ± 4,371	0,101 ± 0,064	898,7 ± 15,51	0,118 ± 0,037	1,82
	1:10	301,4 ± 3,014	0,162 ± 0,029	356 ± 7,954	0,230 ± 0,018	18,11
	1:25	286,1 ± 2,272	0,257 ± 0,042	311,6 ± 20,30	0,335 ± 0,048	8,91

O tamanho da gotícula é expresso em diâmetro
IP é o índice de polidispersão

Os gráficos de distribuição de tamanhos das NEs preparadas com o OECC revelaram que a maioria deles eram sistemas polidispersos, quando preparados com solução estoque a 2 mg/mL e fase aquosa com 1g. Como esperado, o aumento da diluição antes da medição por EDL induziu a diminuição da abundância da população de gotículas de baixo tamanho e a diminuição do IP em função do fator de diluição na NECC₂₅₁ (Figura 6), uma vez que apresenta menor quantidade de OE que os análogos NECC₂₁₁, que foram preparados com maior quantidade de solução estoque (Figura 7). Em relação às NEs preparadas com solução estoque do OE de *C. citratus* a 2 mg/mL e fase aquosa a 2g, o maior tamanho e IPd foram observados para NECC₂₁₂ (Figura 8), quando comparados às NEs análogas preparadas com menor quantidade de solução estoque (NECC₂₅₂). No último, o tamanho diminuiu em função do fator de diluição (Figura 9). Isso pode ser atribuído, em primeiro lugar, ao fato de que com a diluição, haveria o favorecimento da difusão dos compostos hidrofílicos do OE (ou da superfície) da gotícula para a fase externa, favorecendo, portanto, a maturação de Oswald (MO). No entanto, a presença de β -mirceno (substância mais hidrofóbica do OE) em concentrações relativamente altas (> 10%) no OECC é um fator muito importante no controle dessa migração de moléculas. Possivelmente, ele atua modulando esse processo e fazendo a manutenção do tamanho das gotículas, evitando uma mudança repentina de forma e tamanho durante a diluição através de um fenômeno conhecido como "composition ripening", pois o enriquecimento em substâncias "mais lipofílicas" na gotícula se opõe a MO (RAO & MCCLEMENTS, 2012).

Figura 6- NECC₂₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

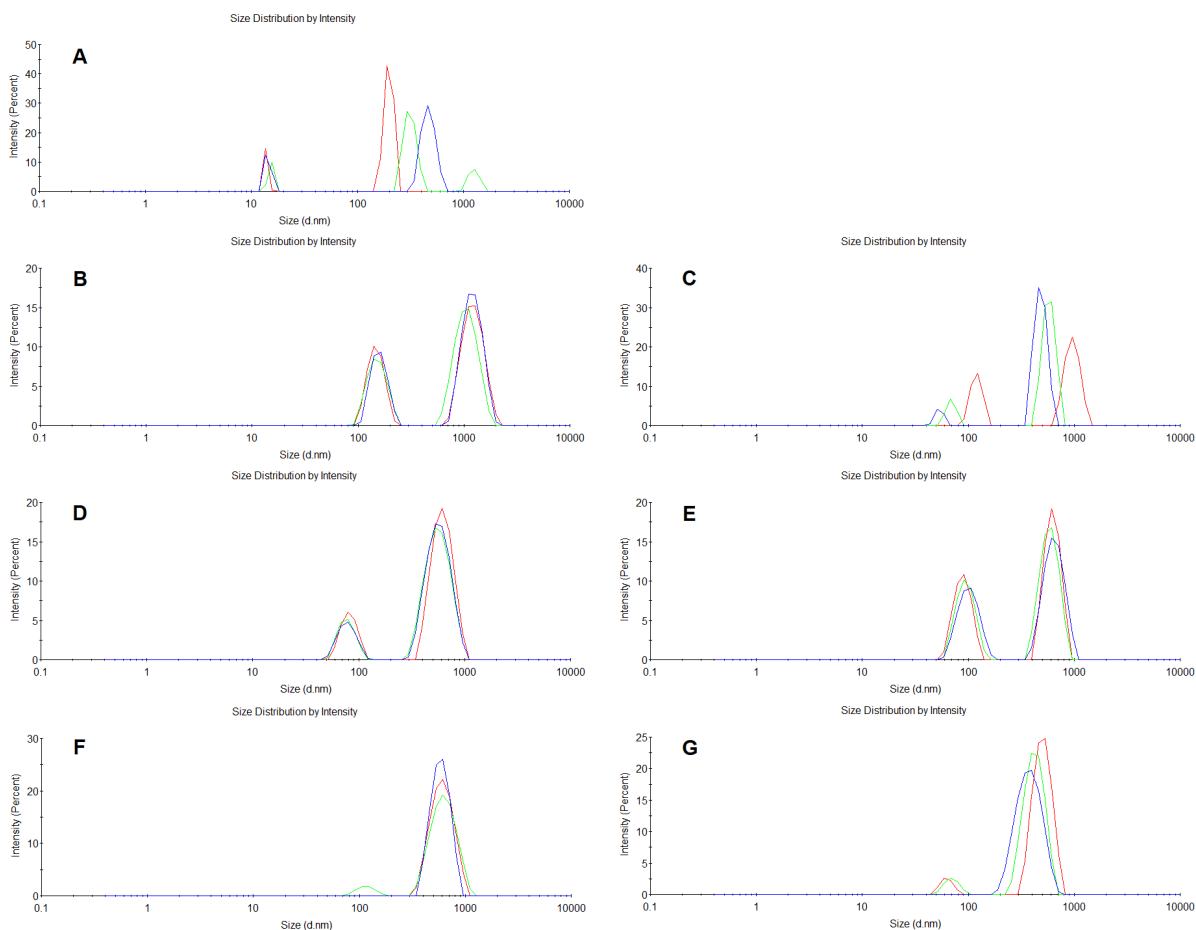


Figura 7 - NECC₂₁₁ . Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

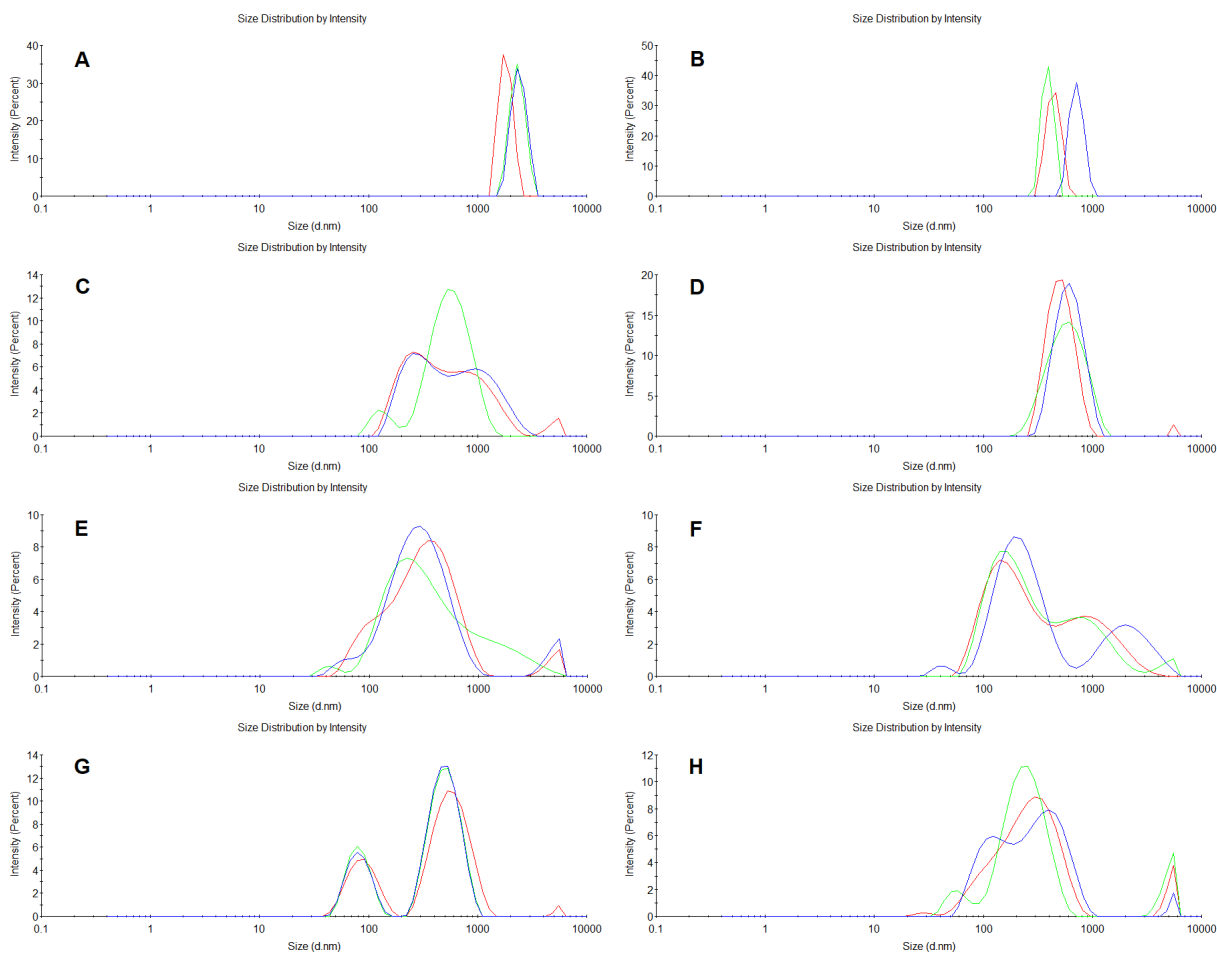


Figura 8- NECC₂₁₂ Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

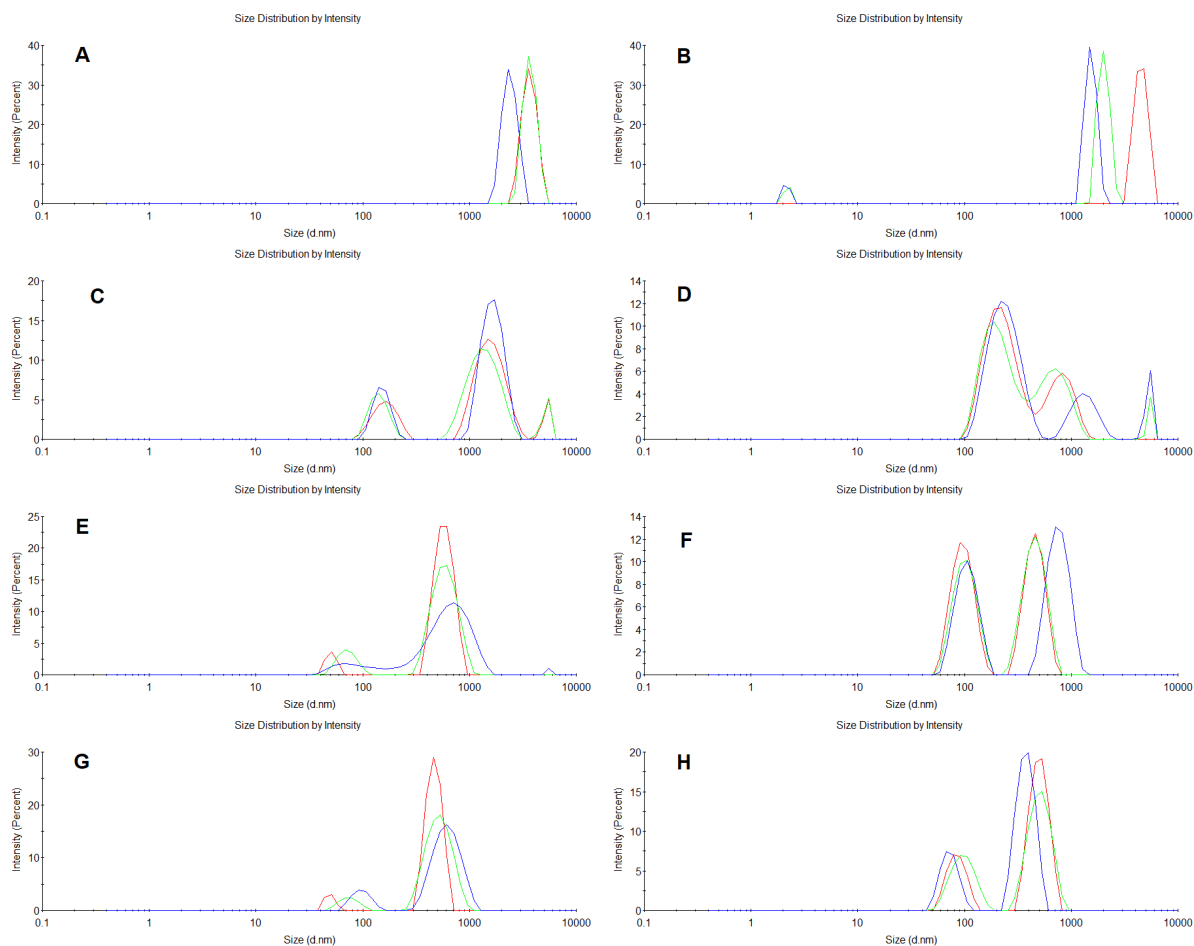
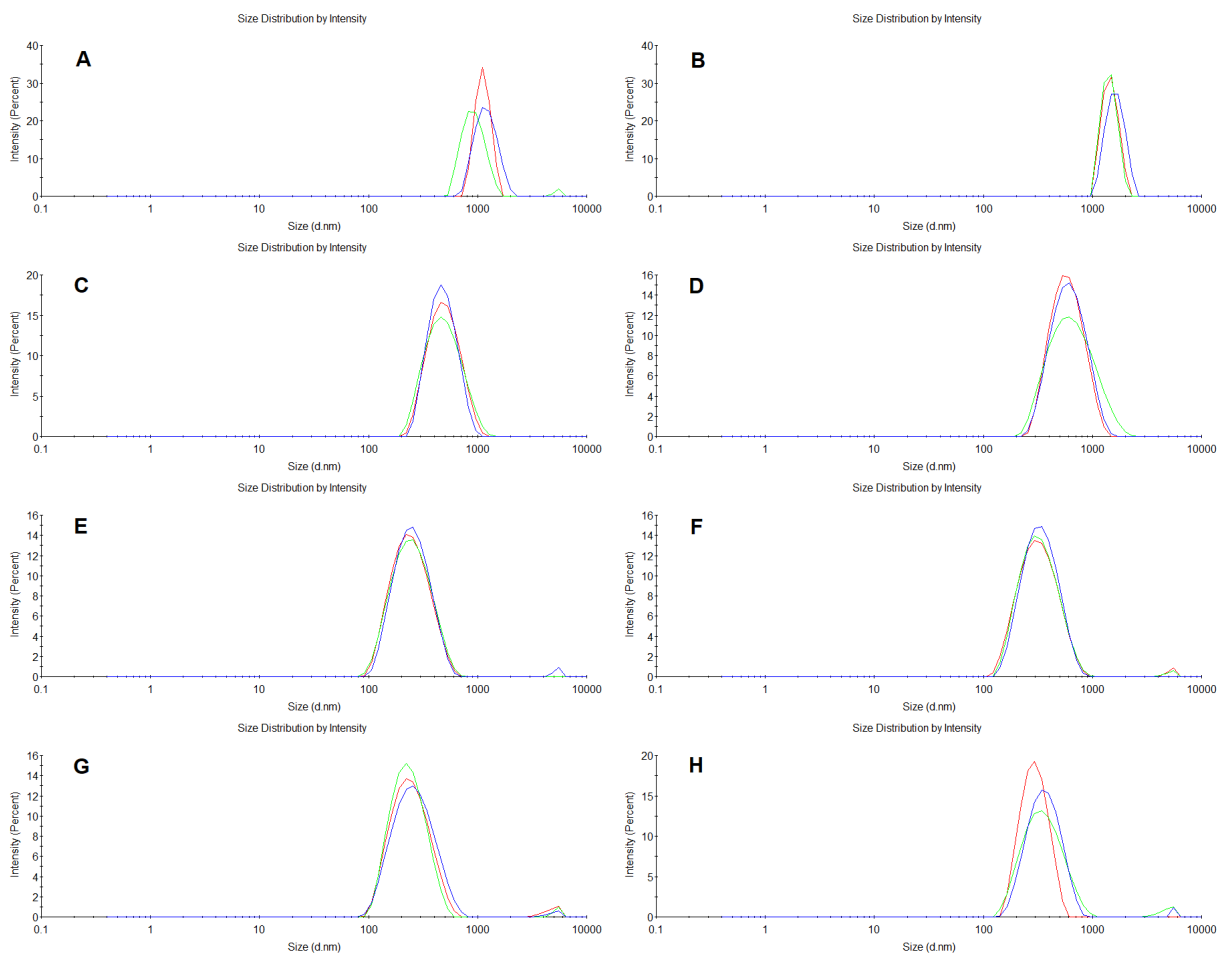


Figura 9 NECC₂₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.



As propriedades físico-químicas *in silico* de monoterpenos foram utilizadas anteriormente como possível fonte de dados para explicação do comportamento das NEs a base de OEs. Como discutido por Rao & McClements (2012), alguns produtos naturais mais hidrofílicos (compostos mais solúveis) seriam facilmente particionados para a fase externa, onde a fase interna seria enriquecida com compostos menos

solúveis (compostos de alto logP), fornecendo proteção contra a MO através do já mencionado “*composition ripening*”. Como mostrado na tabela 2, a substância que apresenta a menor solubilidade em água e o maior logP é o β -mirceno, presente apenas em *C. citratus* (14,1%).

Em relação às NEs preparadas com a solução estoque contendo o OECC à 2 mg/mL, na NECF₂₅₁ foi possível observar uma tendência ao aparecimento de gotículas maiores no gráfico de tamanho de gotículas à medida que o fator de diluição aumentava (Figura 10). Este OE não possui β -mirceno, que é a principal diferença para o OE de *C. citratus*. Portanto, seria de esperar que, aumentando a diluição, a desestabilização fosse favorecida. De fato, ao comparar a alta diluição (fatores 1:25) de NECC₂₅₁ e NECF₂₅₁ (Figura 11), observa-se maior VG (expresso como DG = 20,78) e aumento de IPd na NECF₂₅₁, evidenciado nos gráficos em função do tempo. Observa-se uma variação menor de tamanho ao comparar o dia 0 (Figura 11A) com o dia 1 (Figura 11B) para o NECC₂₅₁. Além disso, esse sistema possui uma população de gotículas mais homogênea. Para NECF₂₅₁, na sua forma mais diluída, o gráfico de distribuição de gotículas mostra que no dia 0 (Figura 11C) as gotículas eram muito heterogêneas em relação ao seu tamanho, resultando em um gráfico mais polidisperso. Essas características permanecem no dia 1 (Figura 11D) e um aumento no tamanho das gotículas também é observado ao longo do tempo, ocorrendo também tendência à sobreposição de curvas em torno de 1000 nm e geração de micropartículas, mostrando a perda de estabilidade. Como mencionado anteriormente, o β -mirceno parece ser fundamental na formação e manutenção do tamanho das gotículas, provando mais uma vez que a presença dessa substância mais lipofílica no OECC proporciona à formulação maior estabilidade. Por outro lado,

a ausência dessas substâncias no OECF pode favorecer uma desestabilização da formulação, como observado no NECF₂₅₁.

Figura 10- NECF₂₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

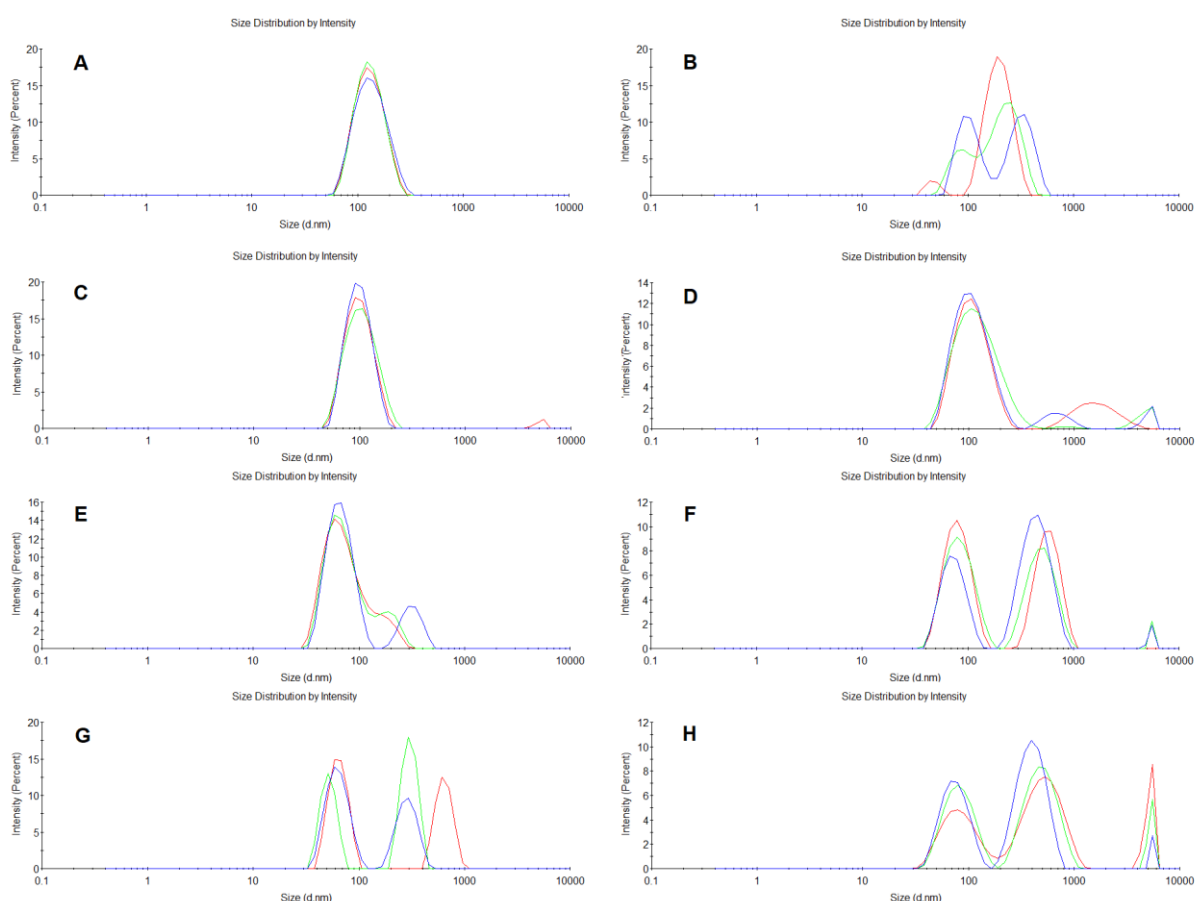
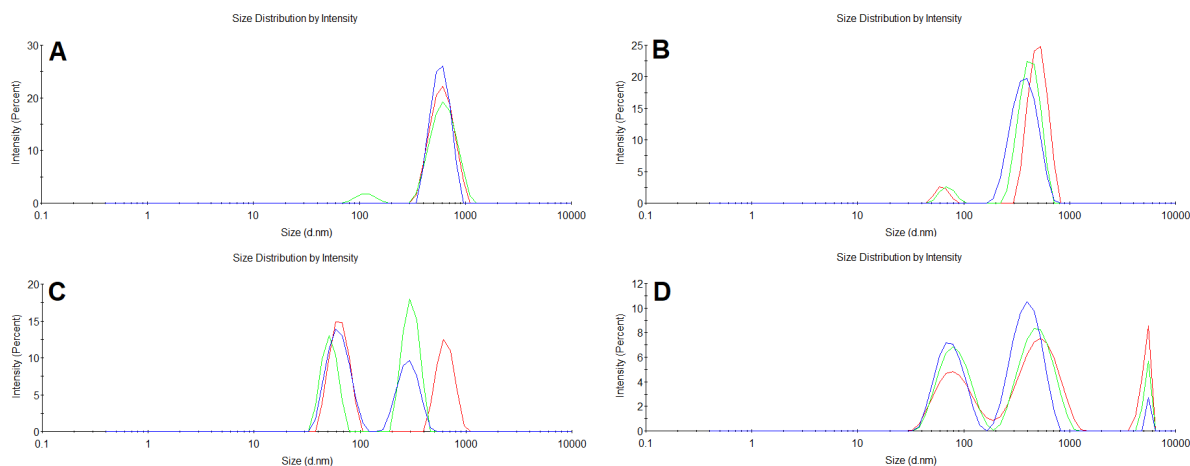


Figura 11 – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula das nano-emulsões (NE) de *C. citratus* e *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1g de fase aquosa. A-NECC₂₅₁ : NE de *C. citratus* na proporção de 1:25 no dia 0. B: NE de *C. citratus* na proporção 1:25 no dia 1). NECF₂₅₁-C: NE de *C. flexuosus* na proporção de 1:25 no dia 0. D: NE de *C. flexuosus* na proporção 1:25 no dia 1.



Para NECF₂₁₁, foi observada uma tendência para o menor diâmetro das gotículas em função do fator de diluição (dia 0), uma tendência para o crescimento das gotículas e redução de IP nas diluições mais altas e um sistema mais monomodal foi alcançado no fator de diluição 1:1 (DG = 33,98) (Figura 12). As NECF₂₅₂ eram polidispersas (Figura 13), enquanto as nanogotículas em torno de 100 nm e IP em torno de 0,200 foram atingidos na NECF₂₁₂ concentrada e no fator de diluição 1:1 (DG ~ 2.2) (Figura 14)

Figura 12 NECF₂₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

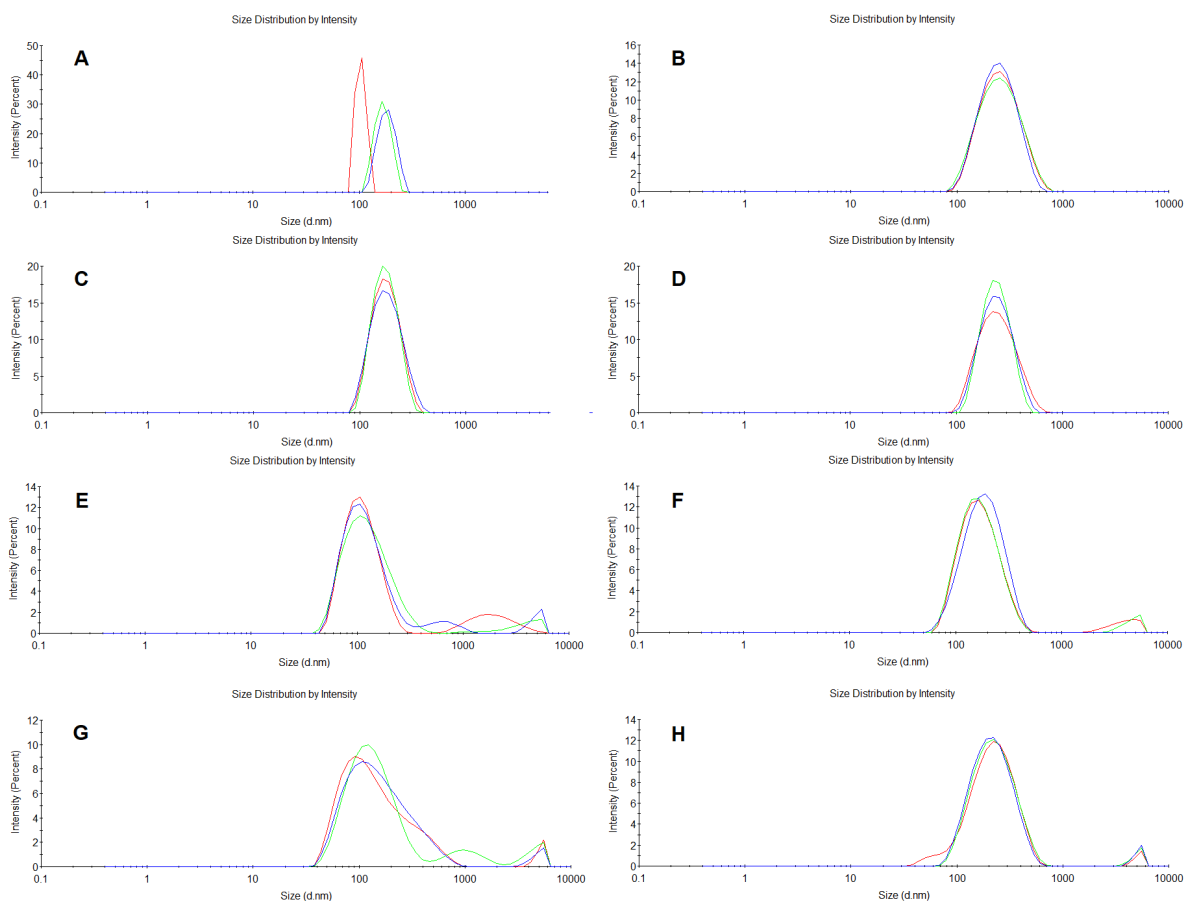


Figura 13 - NECF₂₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

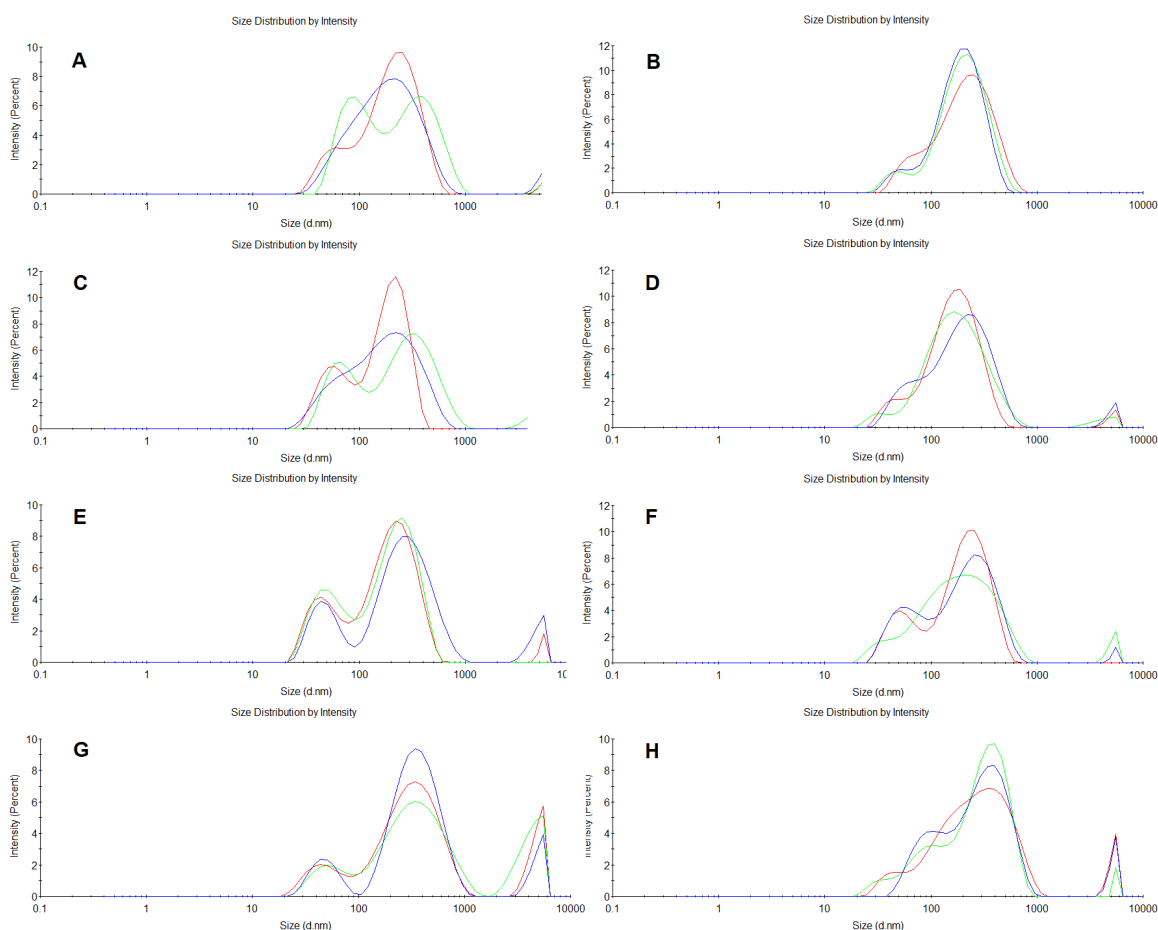
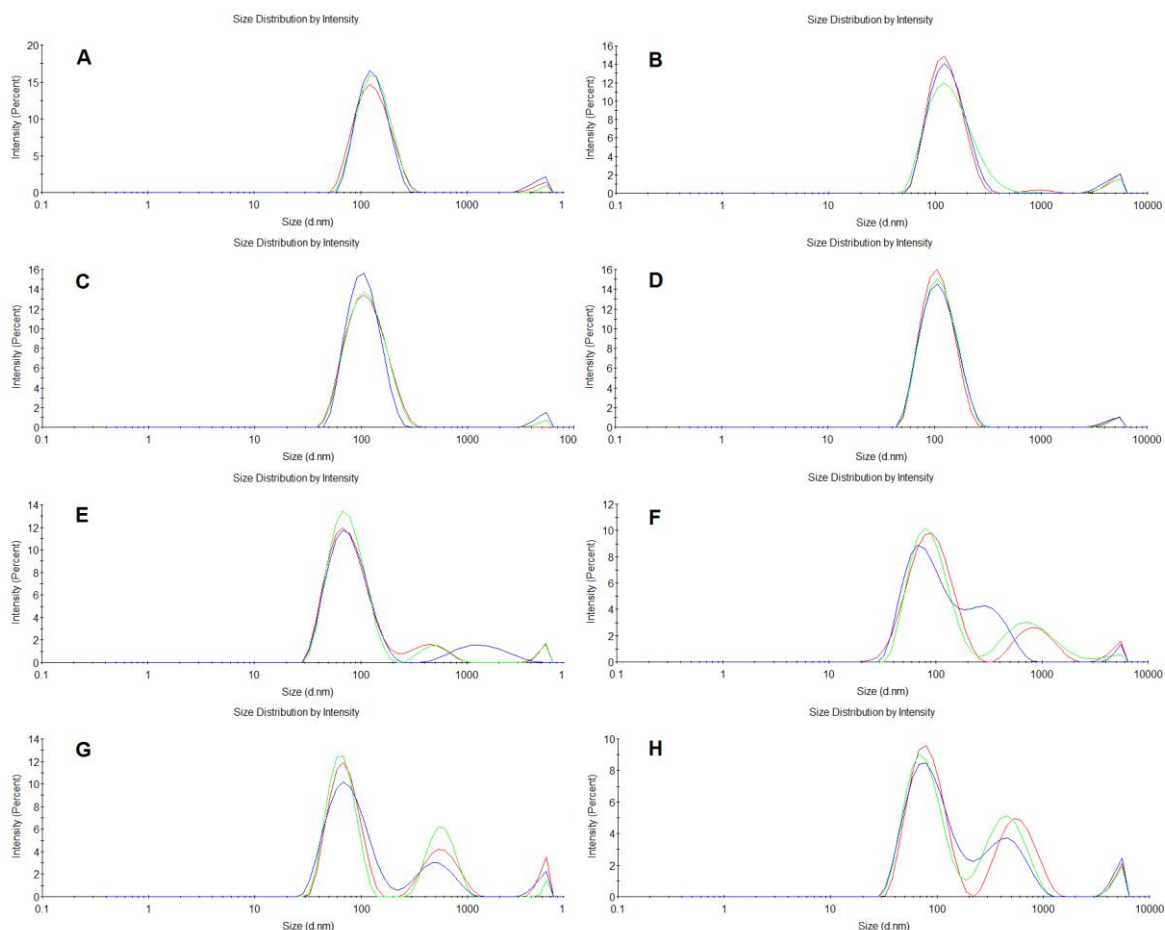


Figura 14. NECF₂₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 2mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.



Quando aumentada a concentração do OECC na solução estoque (4 mg / mL), nenhuma alteração importante em função do tempo foi observada quando alterada a quantidade de fase orgânica adicionada, como evidenciado pelos gráficos de distribuição de tamanho de gotícula da NECC₄₅₁ (Figura 15) e NECC₄₁₁ (Figura 16). No entanto, deve-se mencionar que o IP aumentou duas vezes na diluição 1:25 (Dia 1, NECC₄₁₁), provavelmente devido a uma melhor resolução da curva e melhor

visualização do segundo pico no gráfico. O padrão de distribuição do tamanho das gotículas não apresentou grande alteração no NECC₄₅₂ (Figura 17), apesar de ter sido observada uma ligeira tendência de crescimento de gotículas na diluição 1:10 e aumento de IPd na 1:25, sendo a base mais ampla da curva responsável pelo último. Na NECC₄₁₂ (Figura 18), as gotículas micrométricas na forma concentrada tiveram seu IP aumentado devido à observação de várias populações de gotículas de tamanhos diferentes após 1 dia de armazenamento. O diâmetro de tamanho reduzido após 1 dia de armazenamento na diluição de 1:1 foi devido à população nanométrica de baixo tamanho no gráfico. Para as NEs preparadas com as soluções estoque OECF a 4 mg/mL, a NECF₄₅₁ (Figura 19) apresentou maior IP no fator de diluição 1:25. Aumentando a alíquota da fase orgânica adicionada à fase aquosa, como na NECF₄₁₁ (Figura 20), não foi observada a tendência de aparecimento de populações diferentes de gotículas em diluições mais altas, enquanto as mais concentradas apresentaram maior tamanho (~ 350-400 nm) e IP inferior (<0,100). Curiosamente, uma redução notável no tamanho de gotículas (-39,46%) com quase nenhuma alteração de IP foi observada no maior fator de diluição do NECF₄₅₂ (Figura 21), enquanto um alto crescimento no tamanho de gotículas e um grande aumento de IP foram observados para o análogo NECF₄₁₂ preparado com maior alíquota da fase orgânica (Figura 22). Isso pode ser devido à maior quantidade de compostos disponíveis do OE que podem migrar e induzir o amadurecimento de Ostwald na NECF₄₁₂. As diluições restantes dessas nano-emulsões são mostradas nas figuras 23 e 24.

Figura 15- NECC₄₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

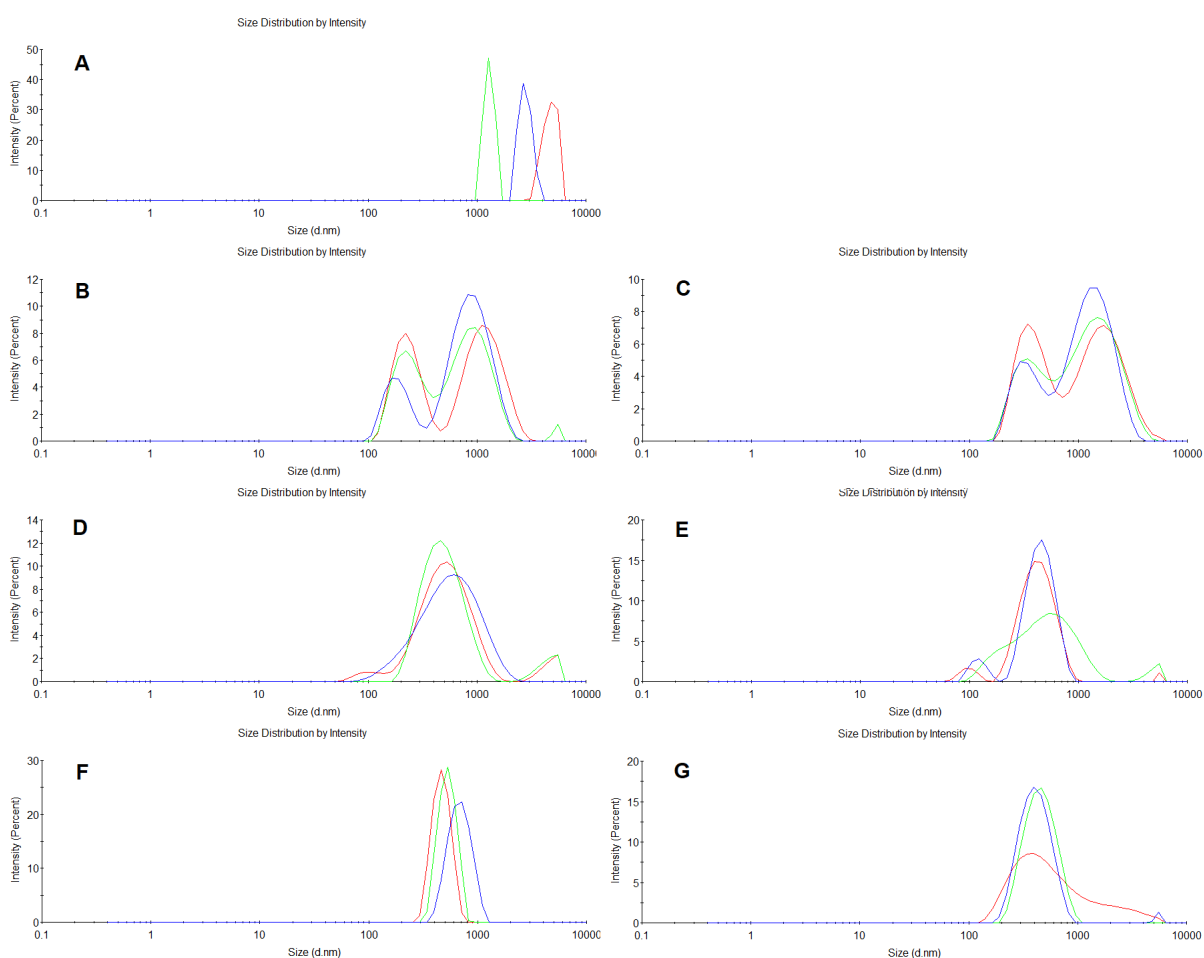


Figura 16 – NECC₄₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 Dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 Dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 no Dia 1.

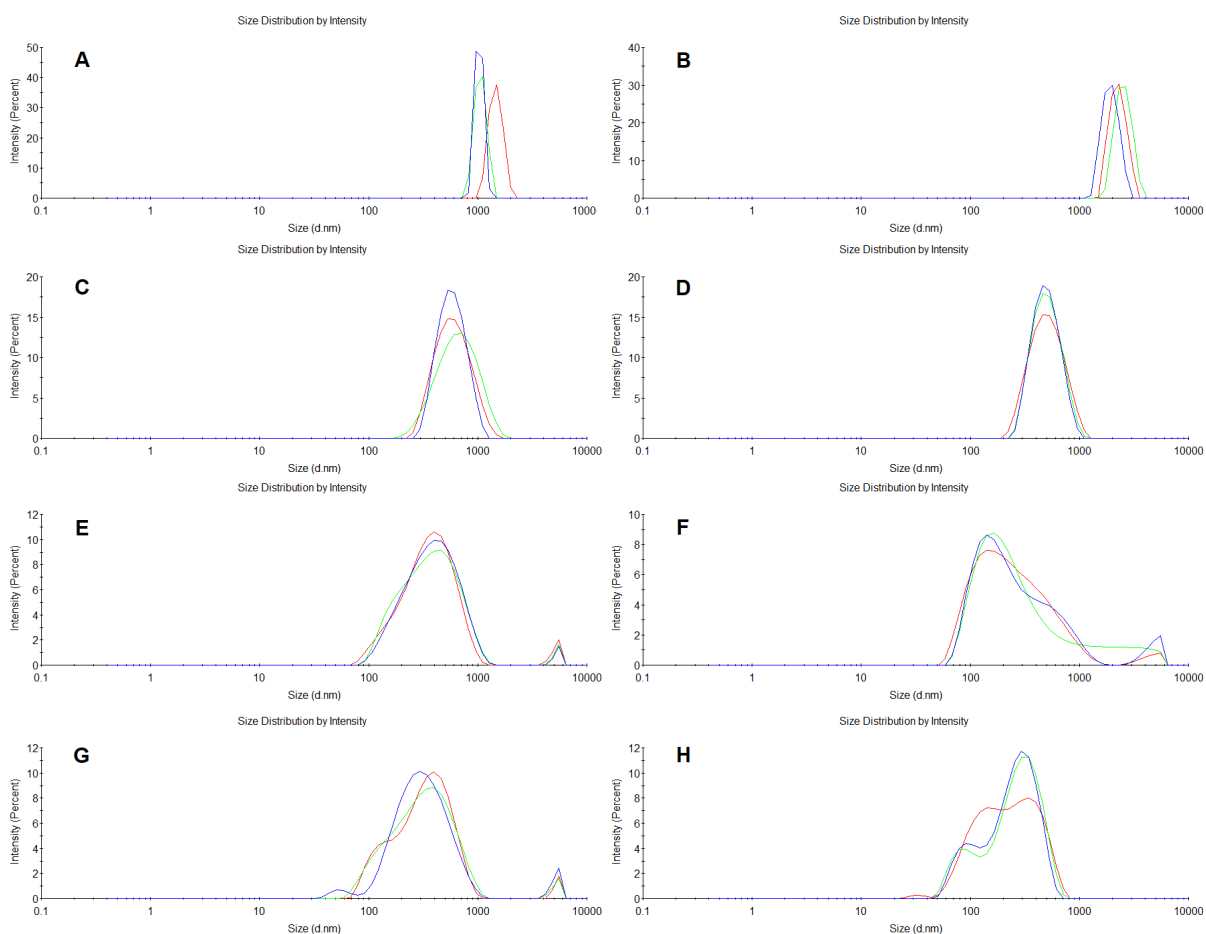


Figura 17 – NECC₄₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 no dia 1.

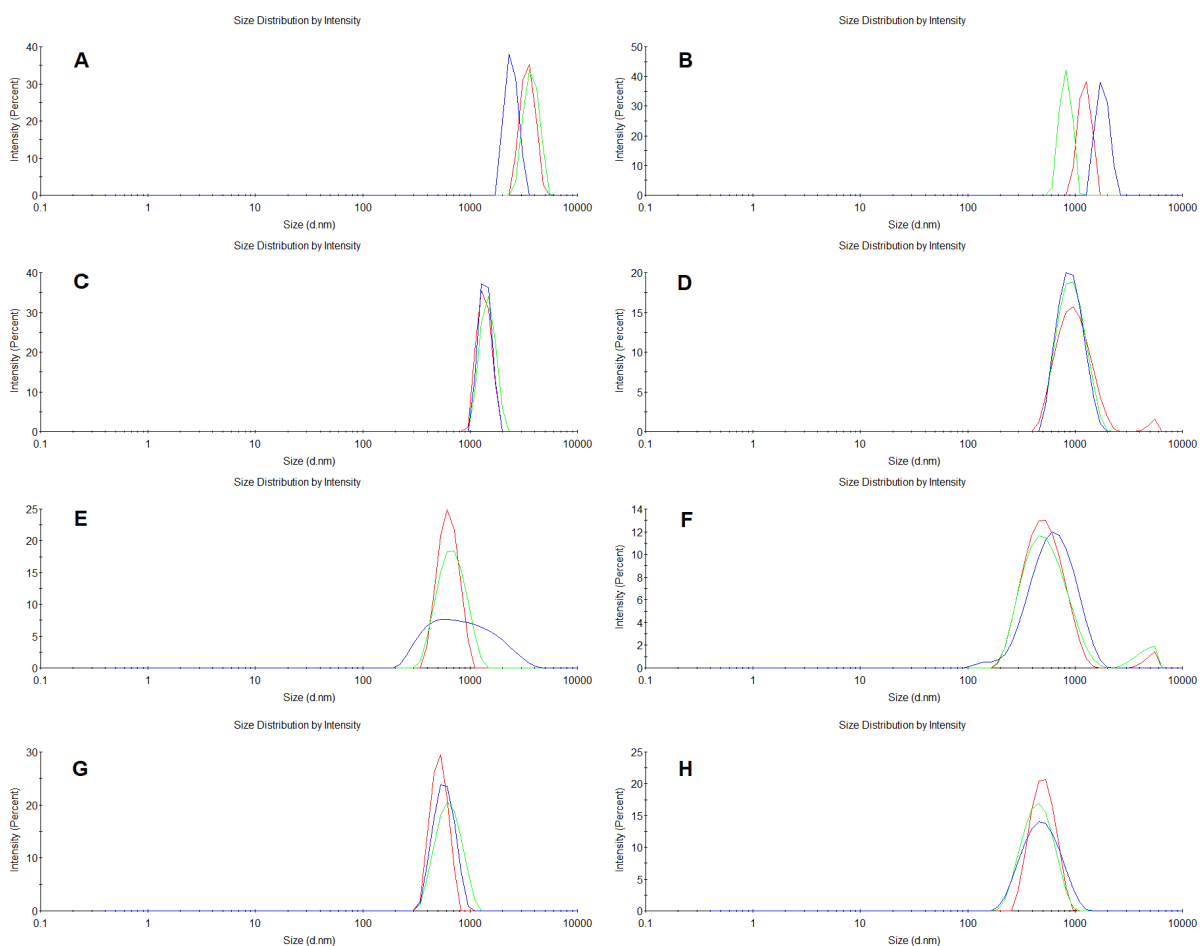


Figura 18 – NECC₄₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

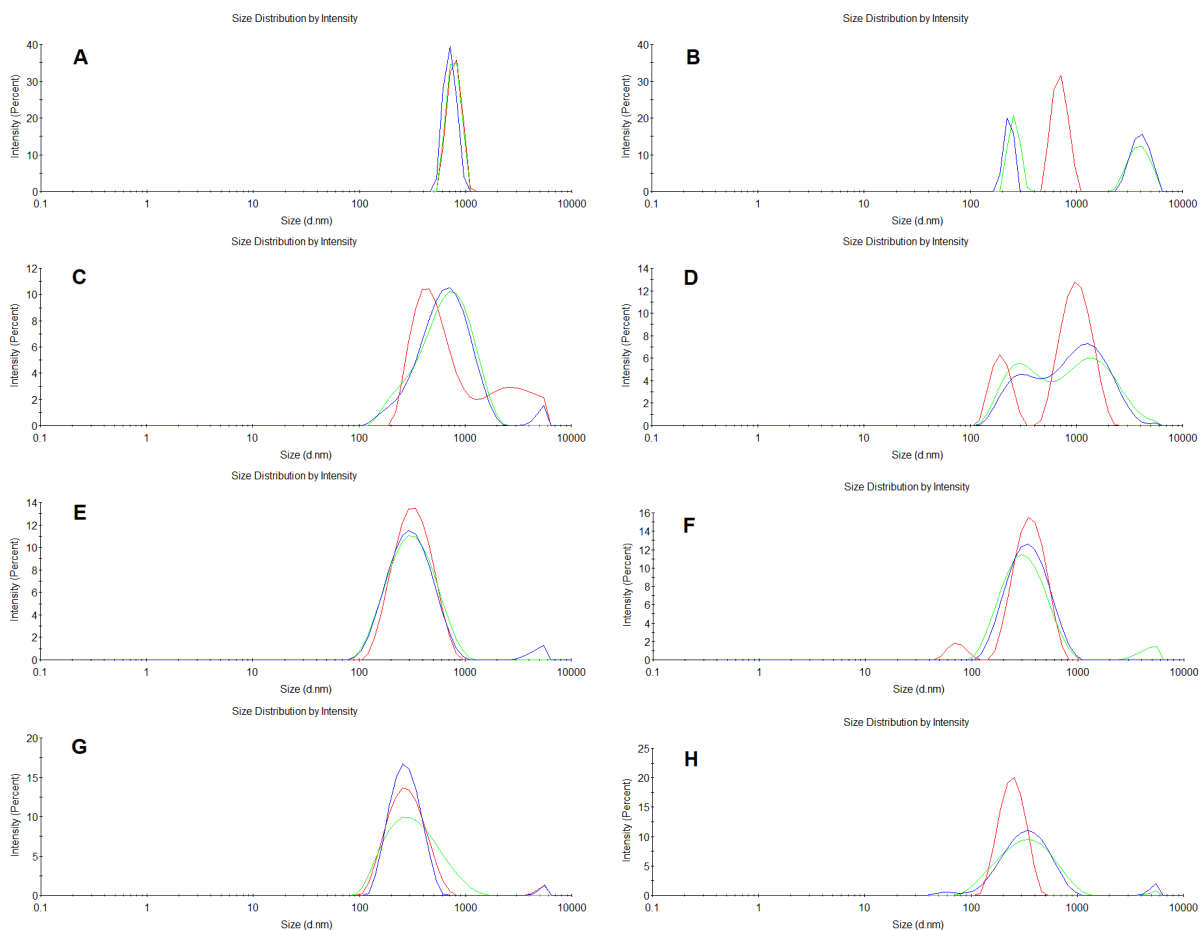


Figura 19- NECF₄₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

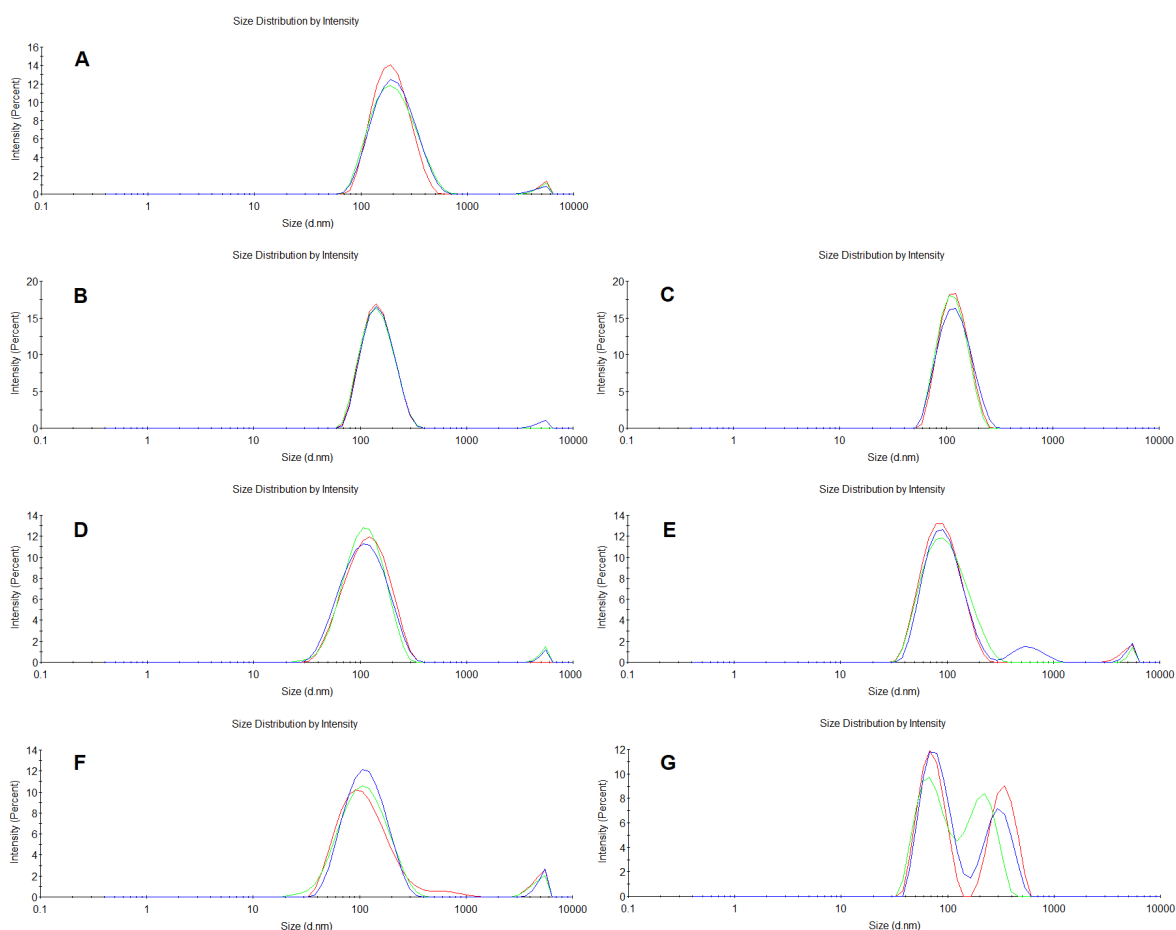


Figura 20 – NECF₄₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 no dia 0. F: NE na proporção de 1:10 no dia 1. G: NE na proporção de 1:25 dia 0. H: NE na proporção de 1:25 dia 1.

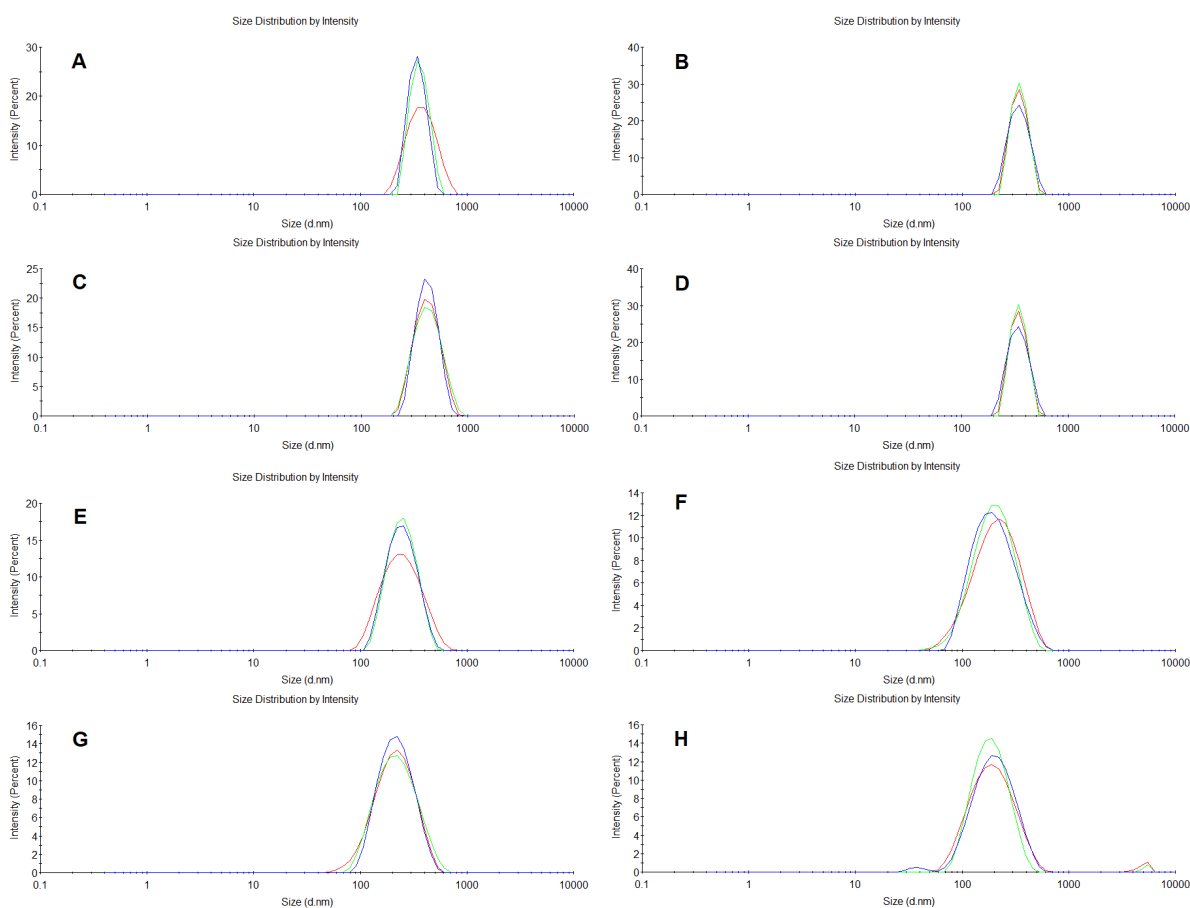


Figura 21. Gráfico de distribuição de gotícula da nano-emulsão de *C. flexuosus* contendo 500 μL da fase orgânica (solução estoque a 4mg/mL de óleo essencial adicionada a 2g de fase aquosa. NECF₄₅₂- A: NE na proporção 1:25 dia 0 B: NE na proporção de 1:25 dia 1.

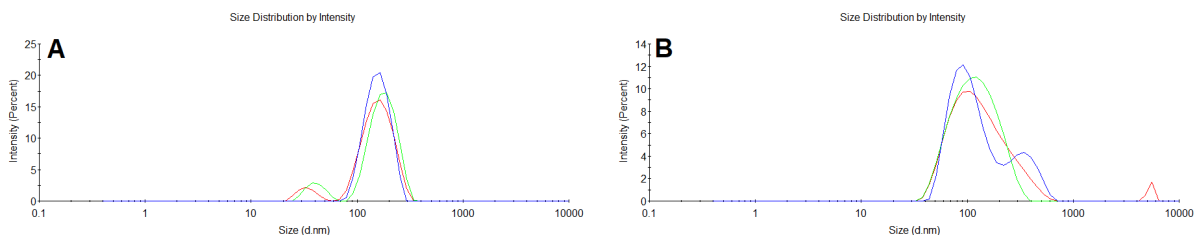


Figura 22. Gráfico de distribuição de gotícula da nano-emulsão de *C. flexuosus* contendo 1000 μL da fase orgânica (solução estoque a 4mg/mL de óleo essencial adicionada a 2g de fase aquosa. NECF₄₁₂- A: NE na proporção 1:25 dia 0 B: NE na proporção de 1:25 dia 1.

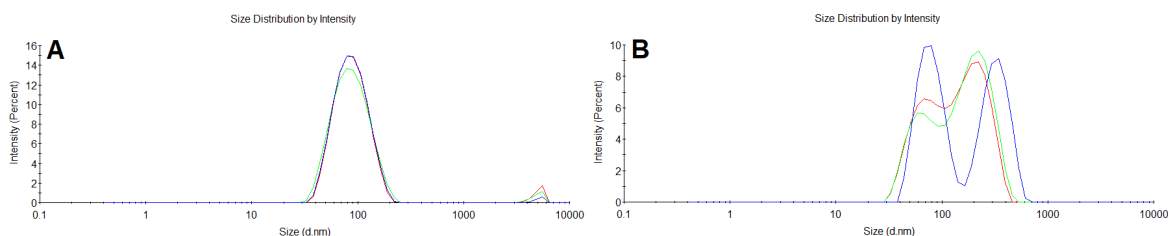


Figura 23. NECF₄₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 no dia 0. F: NE na proporção de 1:10 no dia 1. G: NE na proporção de 1:25 dia 0. H: NE na proporção de 1:25 dia 1.

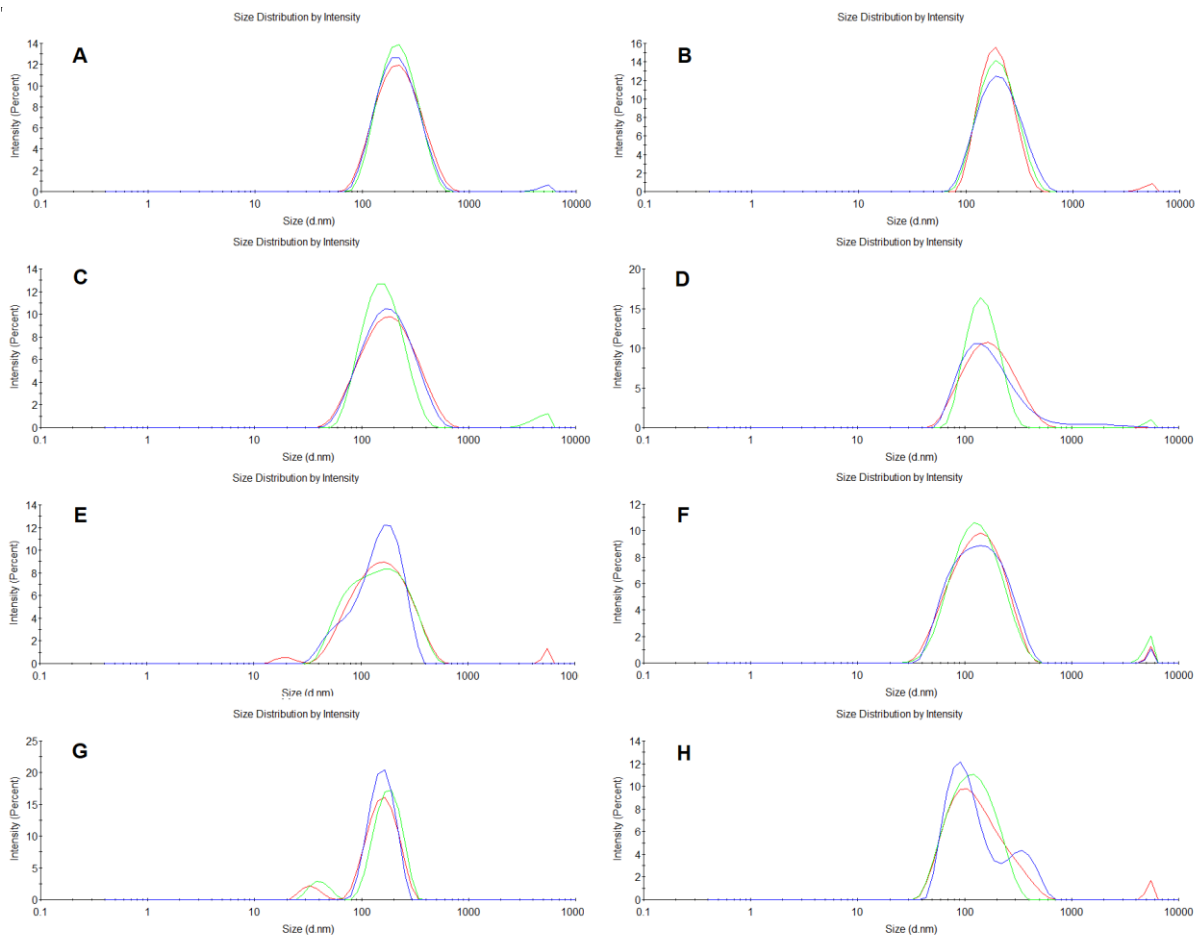
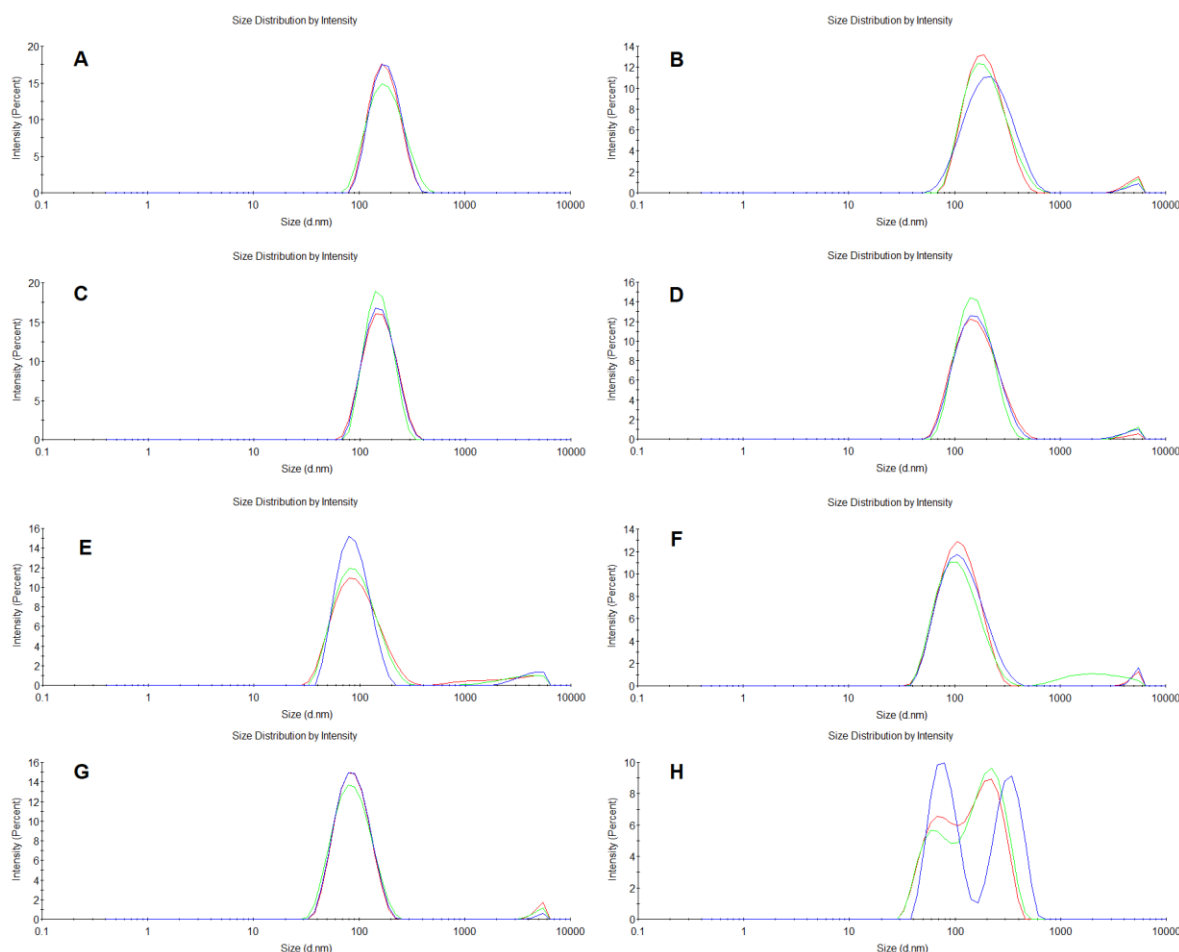


Figura 24 - NECF₄₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 4mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 no dia 0. F: NE na proporção de 1:10 no dia 1. G: NE na proporção de 1:25 dia 0. H: NE na proporção de 1:25 dia 1.



Para as NEs preparadas com a solução estoque contendo OECC à 8 mg/mL, observou-se um reflexo azulado mais notável. A NECC₈₅₁ apresentou distribuição relativamente estreita (Figura 25) e baixo DV (tamanho médio em torno de 170 nm; DG = 4,10) para a diluição 1:10, enquanto a NECC₈₁₁ foi mais polidispersa (Figura 26). A NECC₈₅₂ era monodispersa (Figura 27) e apesar da NECC₈₁₂ (Figura 28) não ser

polidispersa como a NECC₈₁₁, induziu um alto incremento de gotículas. Em relação às NEs preparadas com OECF na solução estoque na sua forma mais concentrada (8 mg/mL), a NECF₈₅₁ (Figura 29) e a NECF₈₁₁ apresentaram alto tamanho ou alto IP (Figura 30). Aquelas preparadas com uma massa final de 2 g apresentaram distribuições de tamanho monomodal. Para a NECF₈₅₂, houve redução de gotículas em função da diluição, com conseqüente aumento máximo de IP e incremento de gotícula ao longo do tempo na maior diluição. No entanto, até a proporção de 1:1 as NEs foram consideradas estáveis (Figura 31). Elevado tamanho ou IP foram observados para a NECF₈₁₂ (Figura 32).

Em geral, a NE mais concentrada a base do OECF e que apresentou menor VG (<5) e tamanho reduzido foi alcançado com a NECF₈₅₂. As diluições apresentaram VG maior que 20 e 70% provavelmente devido a MO. Além disso, à medida que a razão de diluição aumentava, o diâmetro das gotículas diminuía e o IPd aumentava, provavelmente devido também MO. Em um fator de diluição de 1:10, foi observado uma VG menor que 5% para a NECC₈₁₁, sugerindo a capacidade do β -mirceno de prevenir rapidamente a MO através de um ‘composition ripening’. No caso da NECC₈₅₂, deve-se mencionar que foi capaz de manter próximo o tamanho e o valor de IP, quando comparadas as duas maiores diluições (Dia 1). Isso não ocorreu na NECF₈₅₂ e, apesar de a NECC₈₅₂ e o NECF₈₅₂ apresentarem uma VG alta nos fatores de diluição mais altos, apresentaram distribuições monomodais que permitiram comparações, mostrando o principal papel do β -mirceno, neste caso, provavelmente estabilizando a NE a base do OECC, mesmo após altas diluições.

Figura 25- NECC₈₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

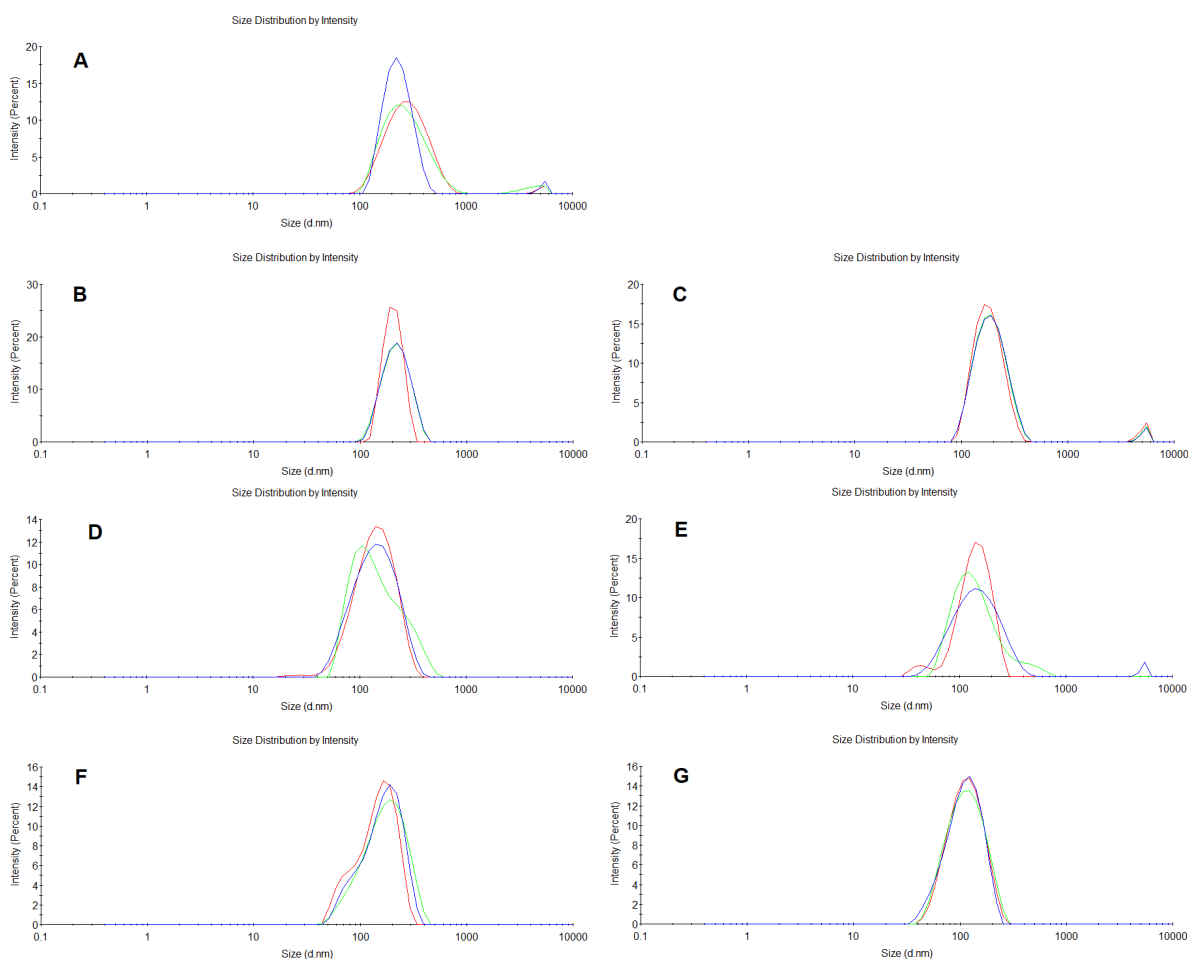


Figura 26 –NECC₈₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:125 dia no 1

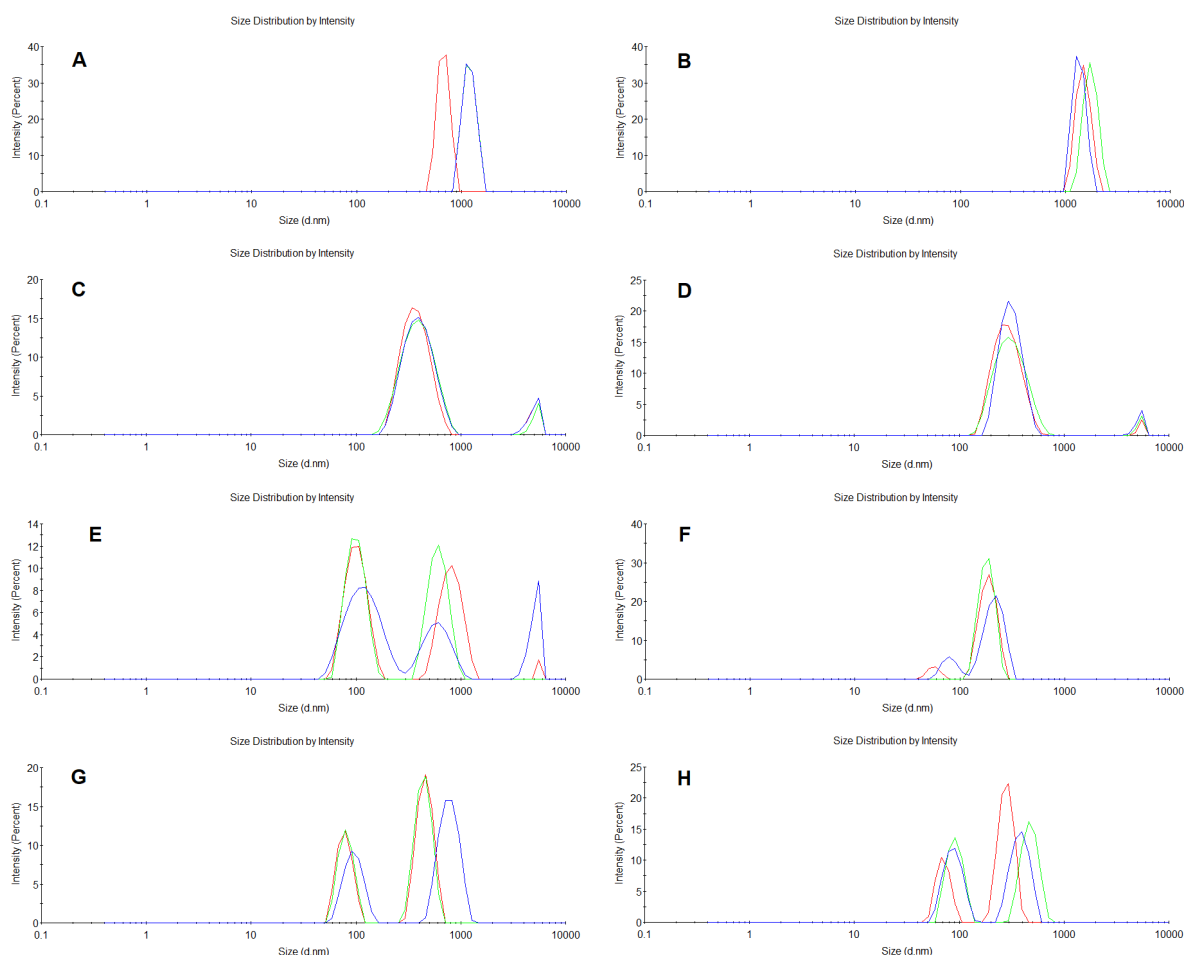


Figura 27. NECC₈₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:125 dia 1.

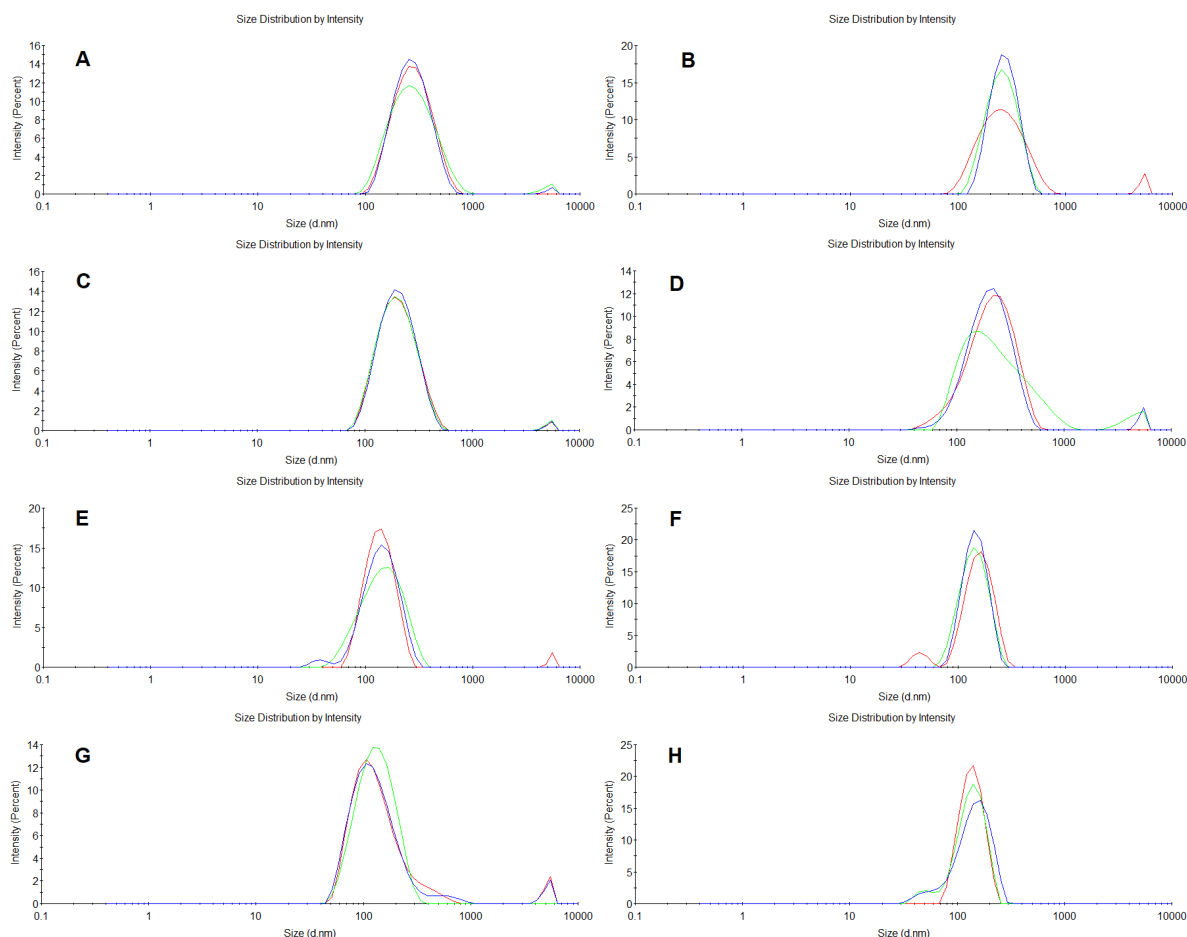


Figura 28 –NECC₈₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. citratus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia 0. F: NE na proporção de 1:10 dia 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia 1.

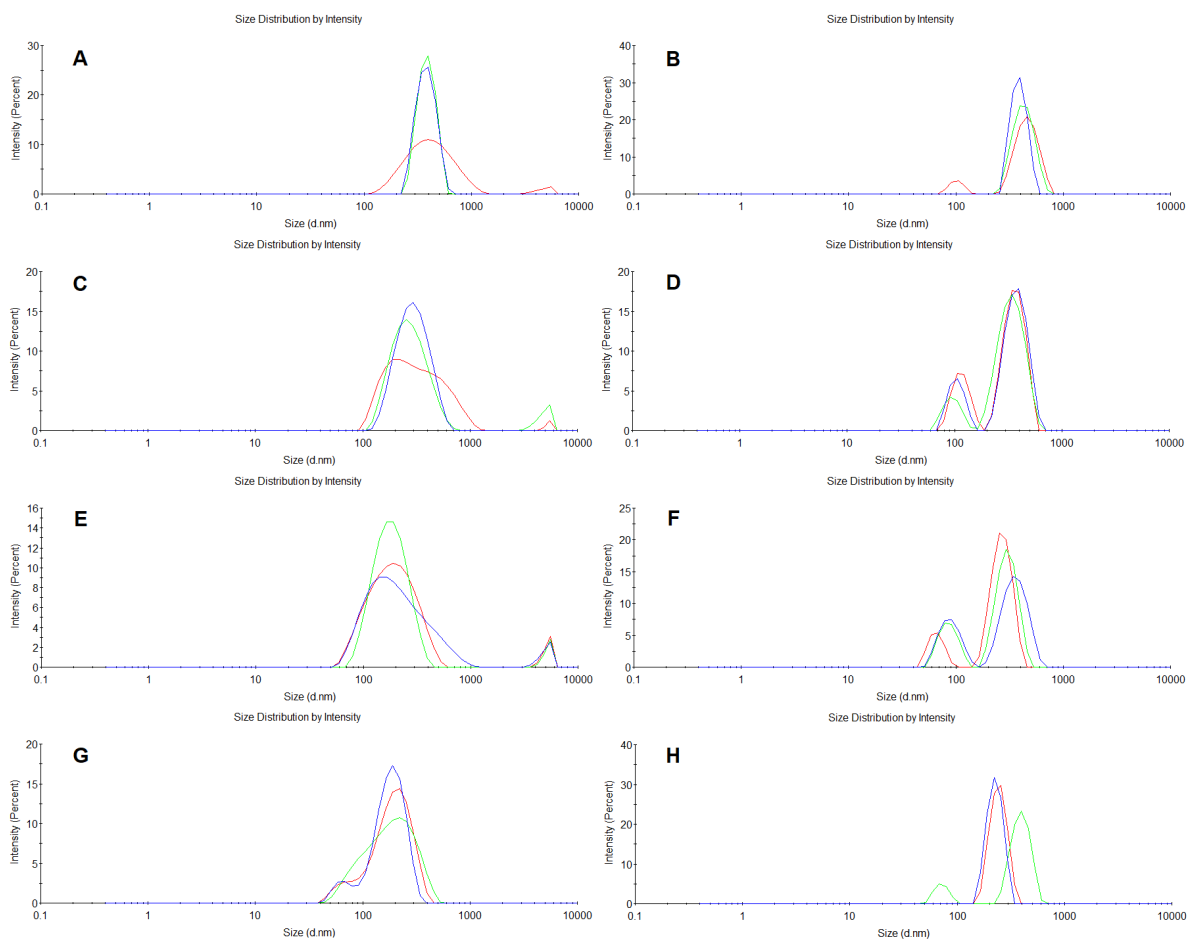


Figura 29 – NECF₈₅₁ – Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada no Dia 0. B: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 0. C: NE diluída na proporção de 1:1 no Dia 1. D: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 0. E: NE diluída na proporção de 1:10 no Dia 1. F: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 0. G: NE diluída na proporção de 1:25 no Dia 1.

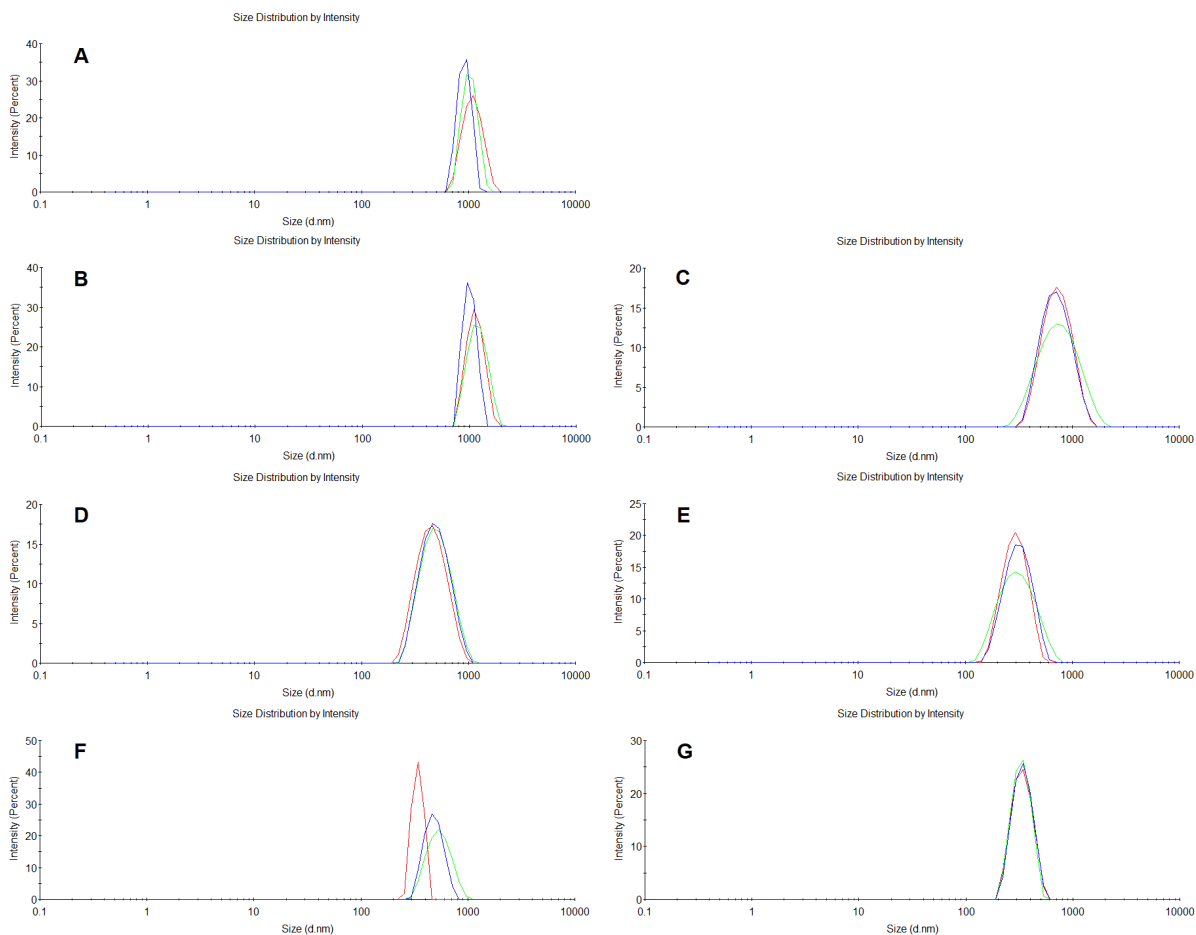


Figura 30 –NECF₈₁₁ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada a 1 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE dia 0. B: NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:125 dia no 1.

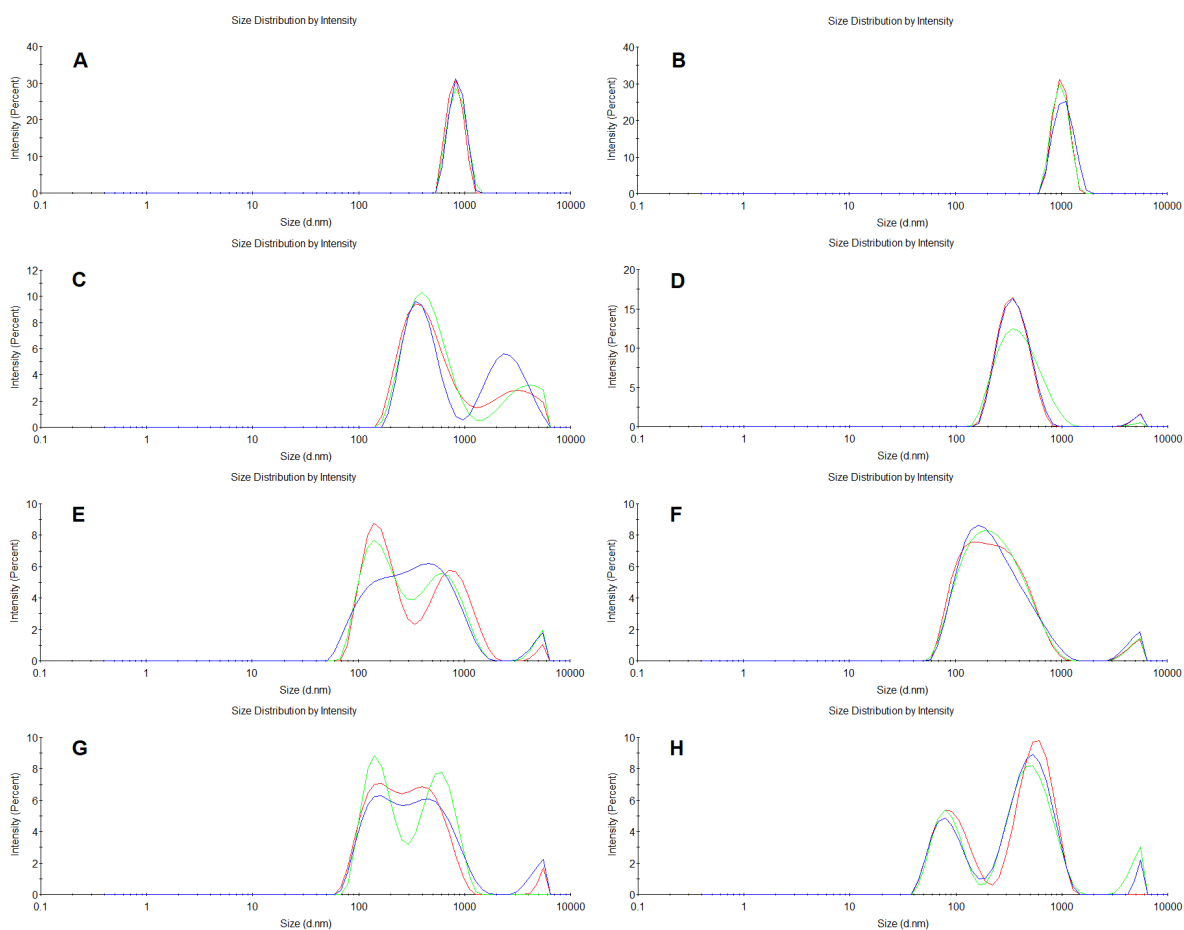


Figura 31 –NECF₈₅₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 500 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:25 dia no 1.

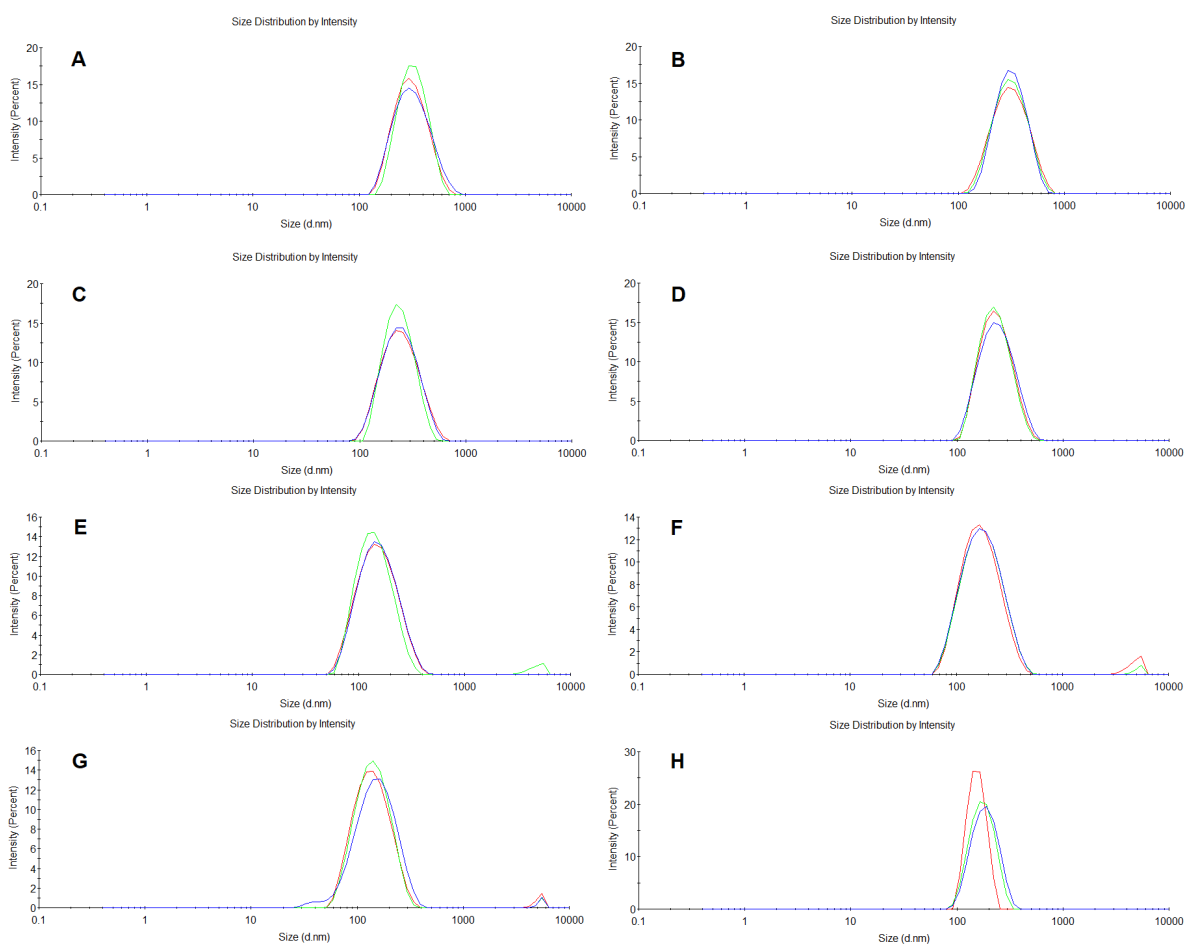
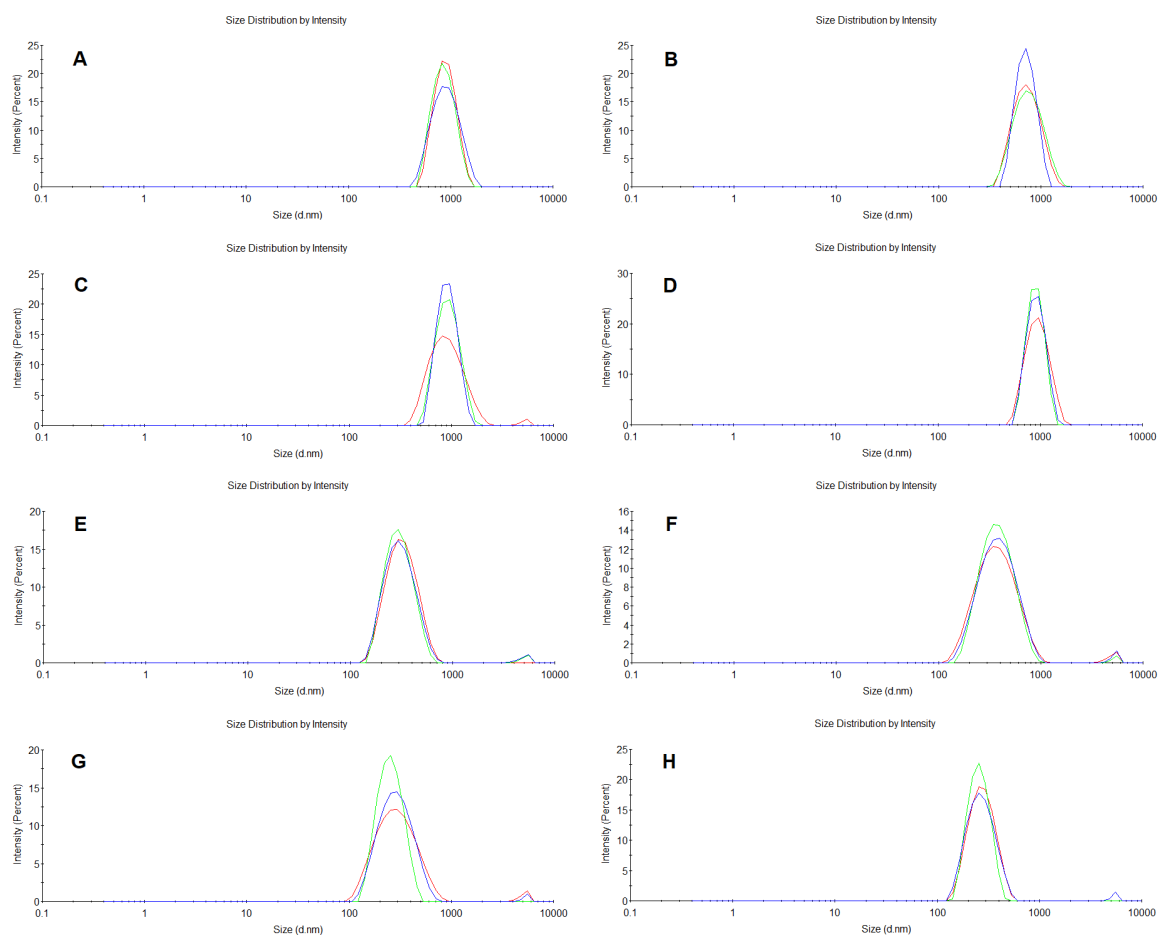


Figura 32 –NECF₈₁₂ - Gráfico de distribuição do tamanho de gotícula da nano-emulsão (NE) de *C. flexuosus* contendo 1000 µL da fase orgânica (solução estoque do óleo essencial a 8mg/mL) adicionada 2 g de fase aquosa. A: NE concentrada NE no Dia 0. B. NE concentrada no dia 1. C: NE na proporção de 1:1 no dia 0. D: NE na proporção de 1:1 no dia 1. E: NE na proporção de 1:10 dia no 0. F: NE na proporção de 1:10 dia no 1. G: NE na proporção de 1:25 dia no 0. H: NE na proporção de 1:125 dia no 1.



Foram escolhidas para preparação das nano-emulsões em sistemas alimentícios as nano-emulsões utilizando-se os OEs na concentração de 8 mg/mL na solução estoque e adicionando-se 500 µL sobre 2g de fase aquosa.

Quando as NEs foram comparadas, nenhuma alteração inicial importante foi observada no diâmetro de gotícula (DG) com a infusão como fase aquosa. Uma tendência para redução de gotícula (RG) foi observada em todos os casos à medida que a temperatura foi aumentada (Figura 33A). Isso não foi acompanhado por uma grande alteração nos valores de IP (Figura 33B). Essa resposta, juntamente com a manutenção dos gráficos de distribuição de tamanho de gotícula, sugere-se que a RG está associada à solubilização de substâncias da fase interna, sem induzir a desestabilização por MO nas NEs concentradas. Esse comportamento pode estar associado a uma possível migração de algumas substâncias das gotículas para a fase externa, uma vez que a temperatura afeta positivamente a solubilização, seguida por uma perda adicional de substâncias mais voláteis, que evitam sua disponibilidade para migrar para gotículas maiores e que consequentemente desestabilizariam o sistema através desse mecanismo. Em seguida, as NEs foram diluídas com base em experimentos anteriores, que indicaram que os melhores resultados foram alcançados na proporção 1:10 e 1:1 para a NECC₈₅₂ e a NECF₈₅₂, respectivamente.

Figura 33. Nano-emulsões preparadas com o óleo essencial de *C. citratus* e *C. flexuosus* submetida a rampa linear de temperatura (A) tamanho de gotícula e (B) índice de polidispersão

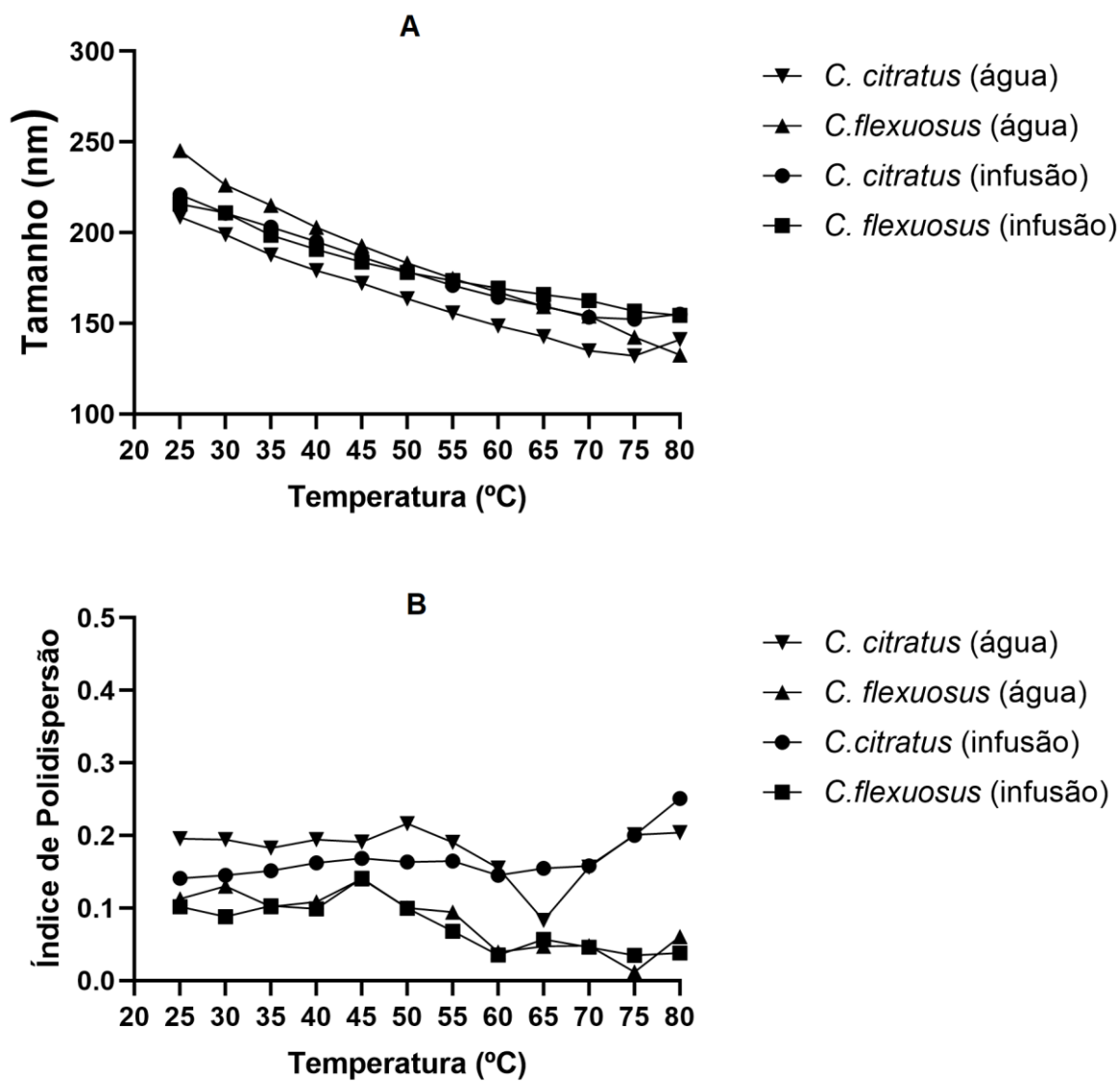
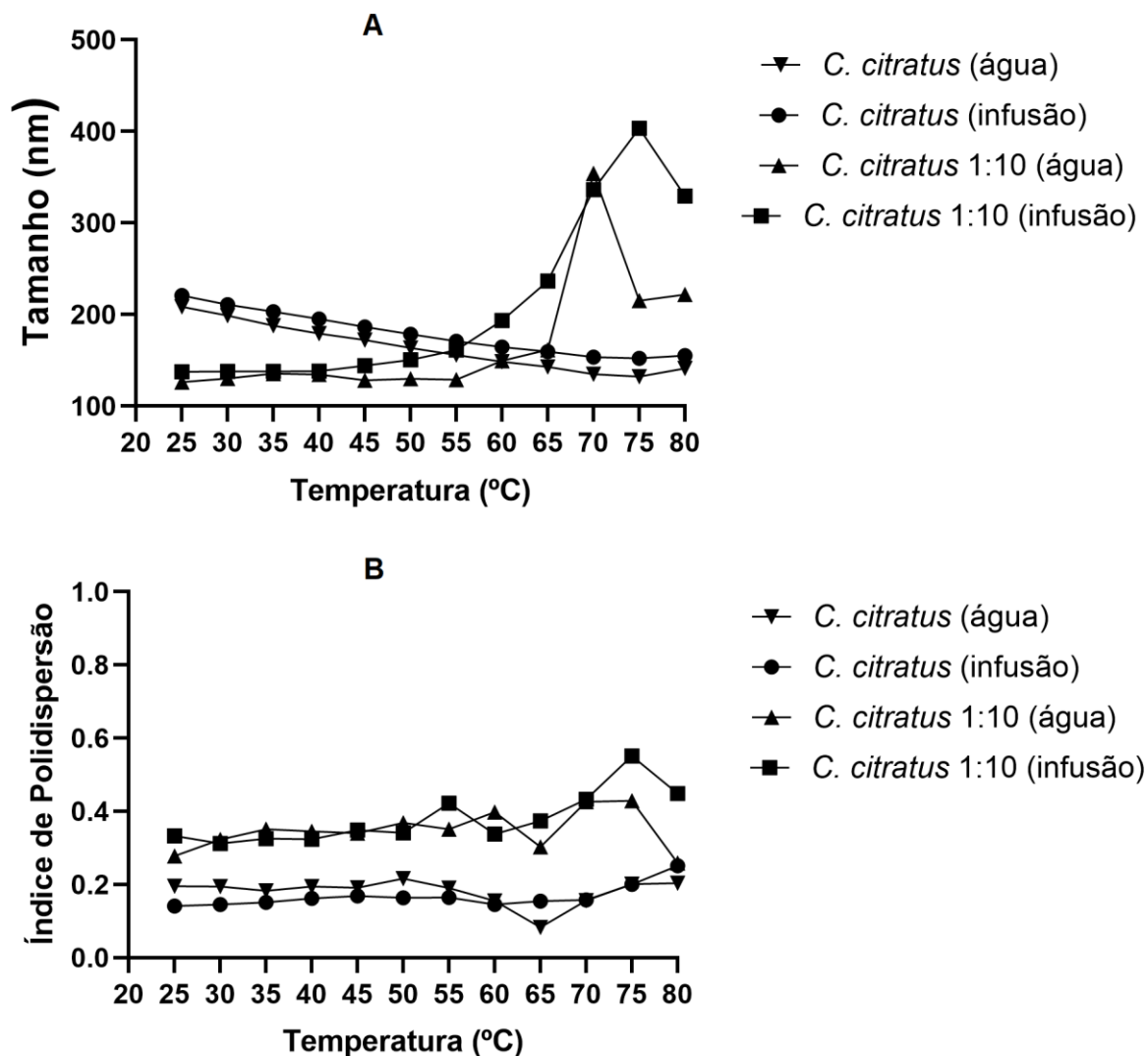


Figura 34. Nano-emulsões preparadas com *C. citratus* (concentradas e diluídas) submetidas a uma rampa linear de temperatura. (A) tamanho da gotícula e (B) índice de polidispersão.

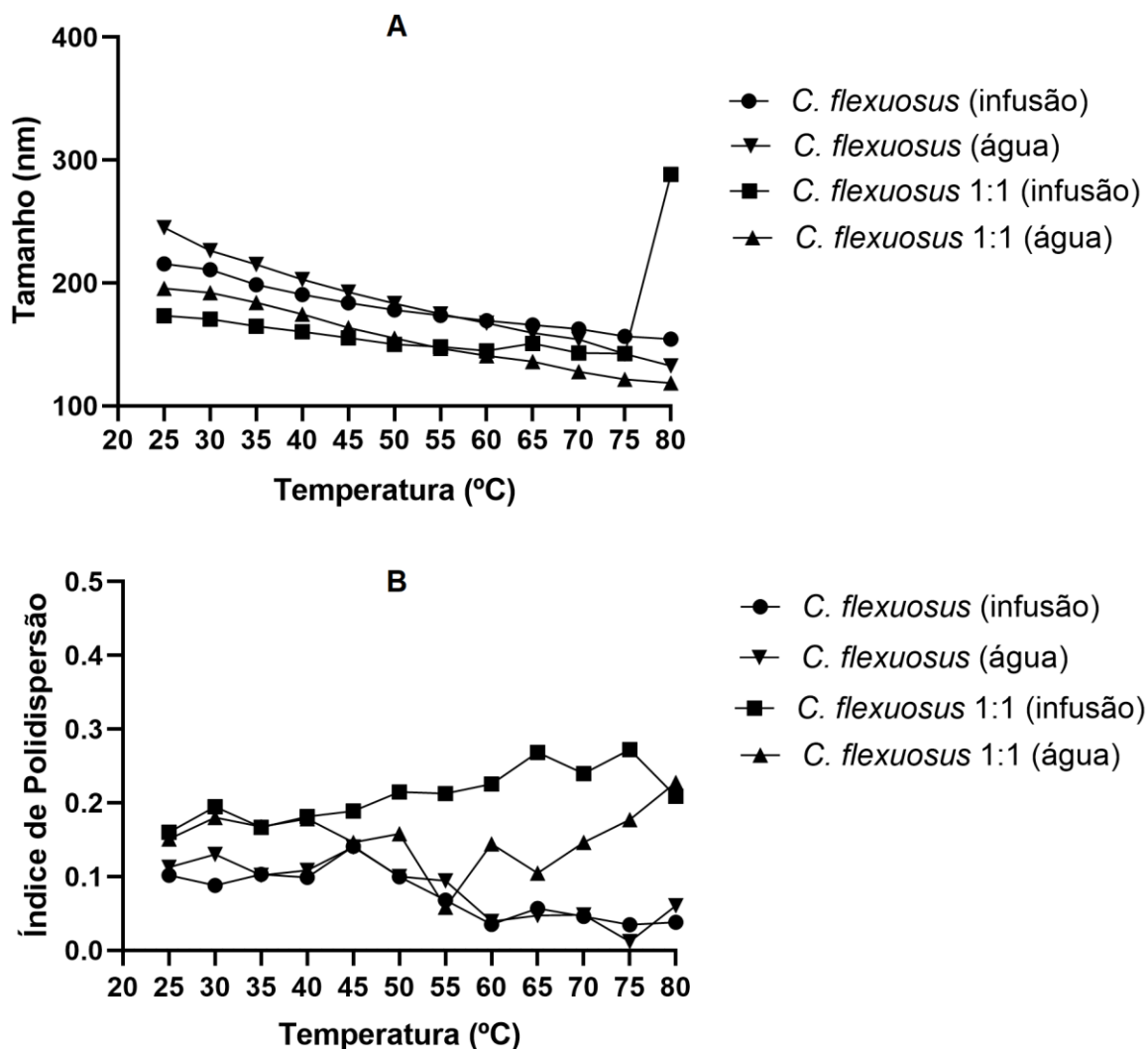


A distribuição inicial do tamanho de gotícula das NECC₈₅₂ mostra que nenhuma alteração importante sobre as NEs concentradas ou diluídas foi induzida pela mudança da fase aquosa. Enquanto que o DG médio a 25 °C foi maior para as NEs concentradas (Figura 34A), o IP foi maior para as NEs diluídas (Figura 34B). Apesar de as NEs diluídas apresentarem um pequeno DG inicial, apresentaram tendência ao IG em função do aumento da temperatura, sendo indicativo de perda de estabilidade.

As propriedades moleculares/físico-químicas *in silico* (Tabela 2) foram analisadas quanto a esse comportamento. A maior volatilização da água foi prevista para o β -mirceno, que tem o menor PE entre esses compostos. Portanto, como o β -mirceno é liberado da fase interna para a externa e volatilizado para a atmosfera, o sistema se torna menos concentrado nessa substância, o que pode contribuir para o CRE, explicando a menor estabilidade dos sistemas diluídos.

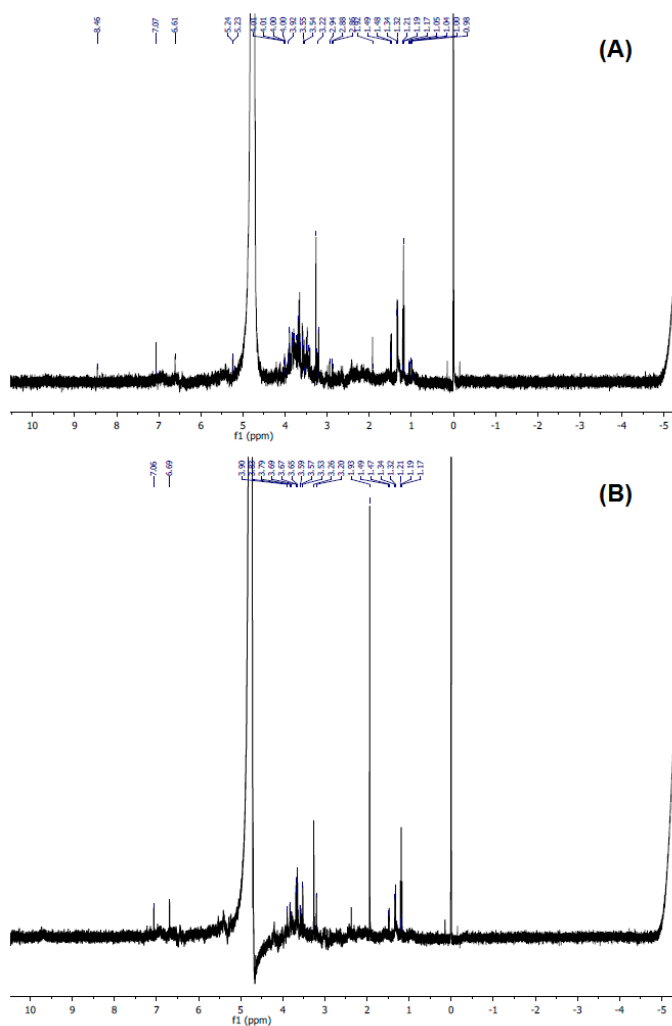
O aumento do diâmetro médio foi mais abrupto para a NECC₈₅₂ diluída, evidenciado por um maior IG entre 65-70 °C. Curiosamente, o DG máximo foi atingido após um aumento gradativo iniciado em temperaturas mais baixas com o NECC₈₅₂ preparado com a infusão (NECC₈₅₂-IN) (Fig 34A), também induzindo o IP máximo (Fig 34B). Uma possível explicação para esse comportamento pode ser uma solubilização modificada dos componentes oleosos das gotículas pela infusão. Os OEs possuem baixa solubilidade intrínseca em água, no entanto, a preparação de uma infusão pode ter induzido uma alteração das propriedades físico-químicas da fase aquosa devido à lixiviação/solubilização de outras substâncias que tornam a solução mais complexa e, portanto, desestabilizando o sistema

Figura 35. Nano-emulsões preparadas com *C. flexuosus* (concentradas e diluídas) submetidas a uma rampa linear de temperatura. (A) tamanho da gotícula e (B) índice de polidispersão.



Em relação ao NECF₈₅₂, observou-se uma tendência para um menor diâmetro das gotículas para os NECF₈₅₂-INs, sendo observada nos sistemas concentrados e diluídos a 25 °C. Além disso, as NEs diluídas apresentaram DG menor do que os sistemas concentrados (Figura 35A). Por outro lado, o IP das NEs concentradas era menor do que os sistemas diluídos, sendo todos considerados valores baixos (Figura 35B). Nenhuma diferença importante no IP foi atribuída a diferentes fases aquosas. A

medida que a temperatura aumentou, foi observada uma tendência para a RG em todos os sistemas. A 55 °C, os valores de NEs preparadas com água pura ou infusão apresentaram valores próximos. Em relação ao IP, à medida que a temperatura aumentou, foi observada uma tendência de diminuição para os sistemas concentrados e, apesar de ter sido observado um aumento para os sistemas diluídos, no geral foi considerado não relevante. Somente no último ciclo de aumento de temperatura (75-80 °C) foi observada um IG importante (NECF₈₅₂-IN diluído). No entanto, foi acompanhado por uma redução de IP, sugerindo dissolução de gotículas maiores.



Considerando que o OECF não possui β -mirceno, a NECF₈₅₂ diluída seria mais instável que o NECC₈₅₂. Além disso, considerando o hipotético efeito de solubilização induzido pela infusão de *C. citratus*, a NECF₈₅₂-IN também seria mais instável quando comparado ao NECF₈₅₂. A ausência de IG e IPd em torno de 0,4 até temperaturas relativamente altas para as NECFs com ambas as fases aquosas, portanto, pode ser devido a dois fatores independentes. Primeiramente, diferenças intrínsecas nas substâncias não identificados deste OE podem desenvolver um papel principal e, em segunda análise, uma diferença principal no perfil fitoquímico da infusão. A análise por RMN de ¹H revela os espectros das infusões (Figura 36). Ambos apresentaram um perfil semelhante, no entanto, os espectros da infusão de *C. citratus* (Fig. 36A) mostram um envelope de sinais com picos mais sobrepostos entre os desvios químicos em δ H 3,5 - 4,0 ppm. Essa região está associada a unidades osídicas e, portanto, está de acordo com a expectativa de uma infusão mais polar ou mais enriquecida em grupamentos hidrofílicos (por exemplo, glicosídeos), corroborando a hipótese de uma solubilização modificada e desestabilização da NECC₈₅₂ diluída.

Por outro lado, a diferença no padrão dessa região para a infusão de *C. flexuosus* (Fig. 36B) e, portanto, um sugestivo de unidades menos osídicas pode sugerir substâncias com menor polaridade. Portanto, uma infusão de menor efeito solubilizante modificado não levaria a uma desestabilização tão pronunciada. A infusão de *C. flexuosus* também pode estar agindo por mecanismos não compreendidos ainda não propostos na literatura, como “i” “Efeito de saturação” inibindo a liberação das “substâncias mais hidrofílicas” da fase interna, ou mesmo “ii” “sequestrando” as substâncias mais hidrofílicas em estruturas supramoleculares de constituintes fitoquímicos e evitando a partição para a atmosfera (volatilização), interrompendo a liberação adicional de compostos mais hidrofílicos da fase interna e

impedindo o MO. Uma vez que o perfil fitoquímico distinto da infusão de *C. flexuosus* pode ter evitado o crescimento de gotículas ou mesmo substâncias do OE não identificadas também podem desenvolver um papel principal, novas investigações visando sua identificação são necessárias para uma melhor compreensão dos fenômenos.

Acreditamos que, em alguns casos, foi difícil gerar mais NEs concentradas com *C. citratus* devido ao β -mirceno, uma vez que sua natureza mais lipofílica induz prontamente uma tendência a se agregar em gotículas maiores na ausência de tensoativos, enquanto em diluições mais altas (concentrações mais baixas) exerce tendência a evitar a OR através do “*compositional ripening*”. Por outro lado, seria mais fácil gerar gotículas menores nas NEs de *C. flexuosus*, como observado em algumas NEs mais concentrados devido à saturação da fase aquosa externa, o que evitaria a Maturação de Ostwald, enquanto as diluições levariam à solubilização e desestabilização do sistema.

No geral, também identificando e quantificando os constituintes na fase interna e externa de ambas as NEs de capim-limão, será possível elucidar melhor os fenômenos subjacentes envolvidos na “Fitoquímica de Fitocolóides”, testando experimentalmente aos poucos a “Maturação Composicional” investigados, que juntamente com NEs baseadas em OE sem tensoativos, são todos uma ótima área para a química de alimentos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível obter nano-emulsões sem o uso de tensoativos, o que além de tornar o desenvolvimento desse sistema menos oneroso, possibilitou a investigação mais profunda no mecanismo dos OEs dentro desses sistemas. Uma grande vantagem adicionada a essa metodologia é a possibilidade de maior aplicabilidade em sistemas alimentícios, uma vez que existem menos substâncias que possam fazer uma possível interação. Além disso, gera possibilidades para investigações mais profundas do mecanismo de OEs de composição muito semelhante, com uma diferença notável que está profundamente associada a poucos mecanismos experimentalmente elucidados de colóides naturais.

Assim sendo, este trabalho tem grande relevância na contribuição no estado da arte, uma vez que pela primeira vez são desenvolvidas nano-emulsões com indicativo de estabilidade sem o uso de tensoativos com OEs dessas matérias primas por métodos de baixo custo, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de produtos inovadores.

A.E., A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ABDULAZEEZ, M. A.; ABDULLAHI, A. S.; JAMES, B. D. Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) Oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 509–516.

ADUKWU, E. C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9619–9627, 26 nov. 2016.

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass *Cymbopogon flexuosus* and grapefruit *Citrus paradisi* essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, nov. 2012.

AKONO NTONGA, P. et al. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s. **Parasite**, v. 21, p. 33, 2014.

ALMEIDA, K. B. et al. *In vitro* release and anti-herpetic activity of *Cymbopogon citratus* volatile oil-loaded nanogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 4, p. 495–502, 2018.

ARAÚJO, B. C. Inversão de Fases em Emulsões Usando Protocolo de Agitação no Estado Estacionário Variando Salinidade, Tamanho da Cadeia Hidrofílica do Surfactante e Concentração do Cosurfactante. 2013.

BAYALA, B. et al. *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**, v. 153, p. 162–170, out. 2018.

BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, n. 1, p. 25431, 2014.

BRASIL. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems. **Quimica Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 50, p. 62–65, 2012.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, ago. 2015.

CASTILLO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 2017.

CHANDRASHEKAR, K. S.; PRASANNA, K. S. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 14, p. 23–25, set. 2010.

COSTA, G. et al. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 222–228, fev. 2016.

DA SILVA GÜNDEL, S. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, 26 mar. 2018.

DAR, M. Y. et al. Chemical composition, *in vitro* cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1606–1611, 2011.

DEHGHAN, P. et al. Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, n. July, p. 123–130, 2018.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, out. 2015.

DORNIC, N. et al. Aggregate exposure to common fragrance compounds : Comparison of the contribution of essential oils and cosmetics using probabilistic methods and the example of limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, n. December 2017, p. 77–85, 2018.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, maio 2007.

- FALLEH, H. et al. Essential oils : A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, v. 330, n. June, p. 127268, 2020.
- FERIOTTO, G. et al. Chemical Composition of Essential Oils from *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Rosmarinus officinalis*, and Their Effects on the HIV-1 Tat Protein Function. **Chemistry and Biodiversity**, 2018.
- FISCHER, V. et al. Toward surfactant-free and water-free microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 453, p. 186–193, set. 2015.
- FOKOM, R. et al. Growth, essential oil content , chemical composition and antioxidant properties of lemongrass as a ff ected by harvest period and arbuscular mycorrhizal fungi in field conditions. **Industrial Crops & Products**, v. 138, n. January, p. 111477, 2019.
- GAUTAM, M.; AGRAWAL, M. Influence of metals on essential oil content and composition of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) grown under different levels of red mud in sewage sludge amended soil. **Chemosphere**, v. 175, p. 315–322, 2017.
- GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438–446, 2016.
- HALLA, N. et al. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Ammodaucus leucotrichus* fruits growing in Sahara and its evaluation as a cosmeceutical ingredient. **Industrial Crops & Products**, v. 119, n. March, p. 249–254, 2018.
- HERNANDEZ-LAMBRANO, R. et al. Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 81–83, 1 maio 2015.
- KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2016.
- KHOSRAVI, A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against *Candida* strains isolated from urine samples. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 2, p. 355–360, 2018.
- KUMAR, A. et al. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 712–716, 2009.
- KUMAR, V.; PRUD'HOMME, R. K. Nanoparticle stability: Processing pathways for

solvent removal. **Chemical Engineering Science**, v. 64, n. 6, p. 1358–1361, 2009.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.

LIMA OLIVEIRA, P. D. et al. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. June 2017, p. 87–94, 2018.

LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 2018.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. The future of food colloids: Next-generation nanoparticle delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 28, p. 7–14, mar. 2017.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions : Thermodynamic and Dynamic Properties. **Thermodynamics**, p. 381–406, 2011.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108–113, mar. 2007.

NATH, S. C. et al. Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain *Cymbopogon* taxa described as *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 2, p. 151–162, 2002.

NIRMAL, N. P. et al. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 254, n. February, p. 1–7, 2018.

OLIVEIRA, M. A. et al. α , β -citral from *Cymbopogon citratus* on cellulosic film: Release potential and quality of coalho cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 246–251, 2017.

OTONI, C. G. et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60–73, 2016.

PANDEY, A. K.; RAI, M. K.; ACHARYA, D. Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass

(*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 6, p. 421–425, 2003.

PARANAGAMA, P. A. et al. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 86–90, jul. 2003.

PUSHPANATHAN, T.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae). **Tropical biomedicine**, v. 23, n. 2, p. 208–212, 2006.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000–1008, 2011.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; SANCHES-SILVA, A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 78–84, 2017.

ROSSI, G. G. et al. Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. November, p. 335–341, 2017.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621–632, 2005.

SAEIO, K. et al. Development of microemulsion of a potent anti-tyrosinase essential oil of an edible plant. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 5, n. 5, p. 246–252, 2011.

SAKAI, T. Surfactant-free emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 228–235, ago. 2008.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 401–407, 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547–556, jan. 2015.

SHAH, G. et al. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.

2, n. 1, p. 3, 2011.

SKARIA, B. P. et al. Lemongrass. **Handbook of Herbs and Spices: Second Edition**, v. 2, p. 348–370, 2012.

SOLANS, C.; MORALES, D.; HOMES, M. Spontaneous emulsification. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 22, p. 88–93, 2016.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. December 2015, p. 749–754, 2016.

TOMASKA, L. D. **Food Additives – General**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 2

UZAIR. Essential oils showing *in vitro* anti MRSA and synergistic activity with penicillin group of antibiotics. v. 30, n. October, p. 1997–2002, 2017.

VANDAMME, T. F.; ANTON, N. Low-energy nanoemulsification to design veterinary controlled drug delivery devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 867–873, 2010.

VIANA, M. R. et al. A racionalidade nutricional e sua influência na medicalização da comida no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 2, p. 447–456, 2017.

YEN, H. Y.; LIN, Y. C. Green extraction of *Cymbopogon citratus* essential oil by solar energy. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. April, p. 716–721, 2017.

Anexo I- Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas das formulações com água pura e infusão de *C. citratus* e *C. flexuosus* submetidas a rampa de aquecimento.

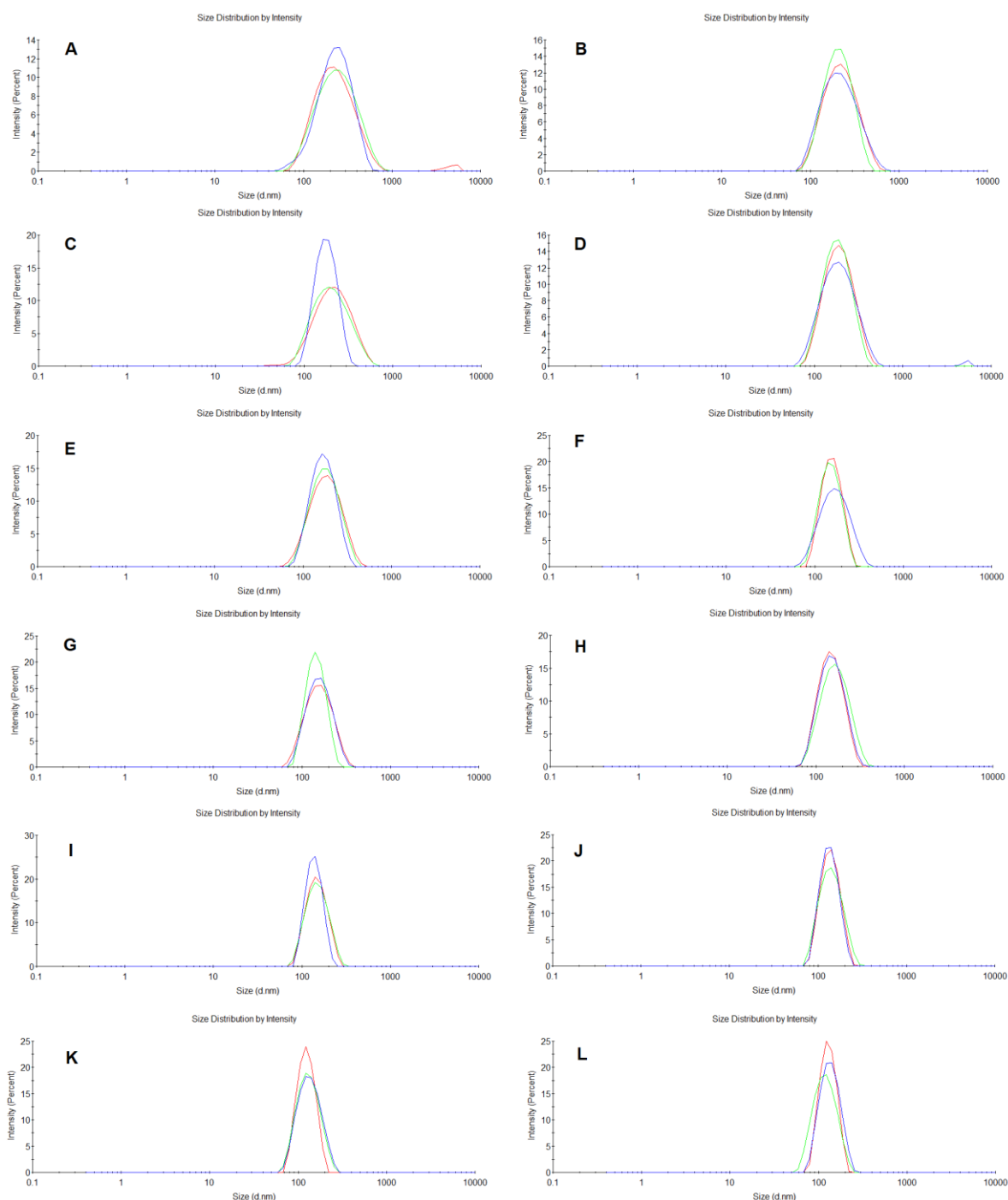


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (concentrada) preparada com óleo essencial de *C. citratus* (8mg/mL, 500 mcL), água deionizada (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

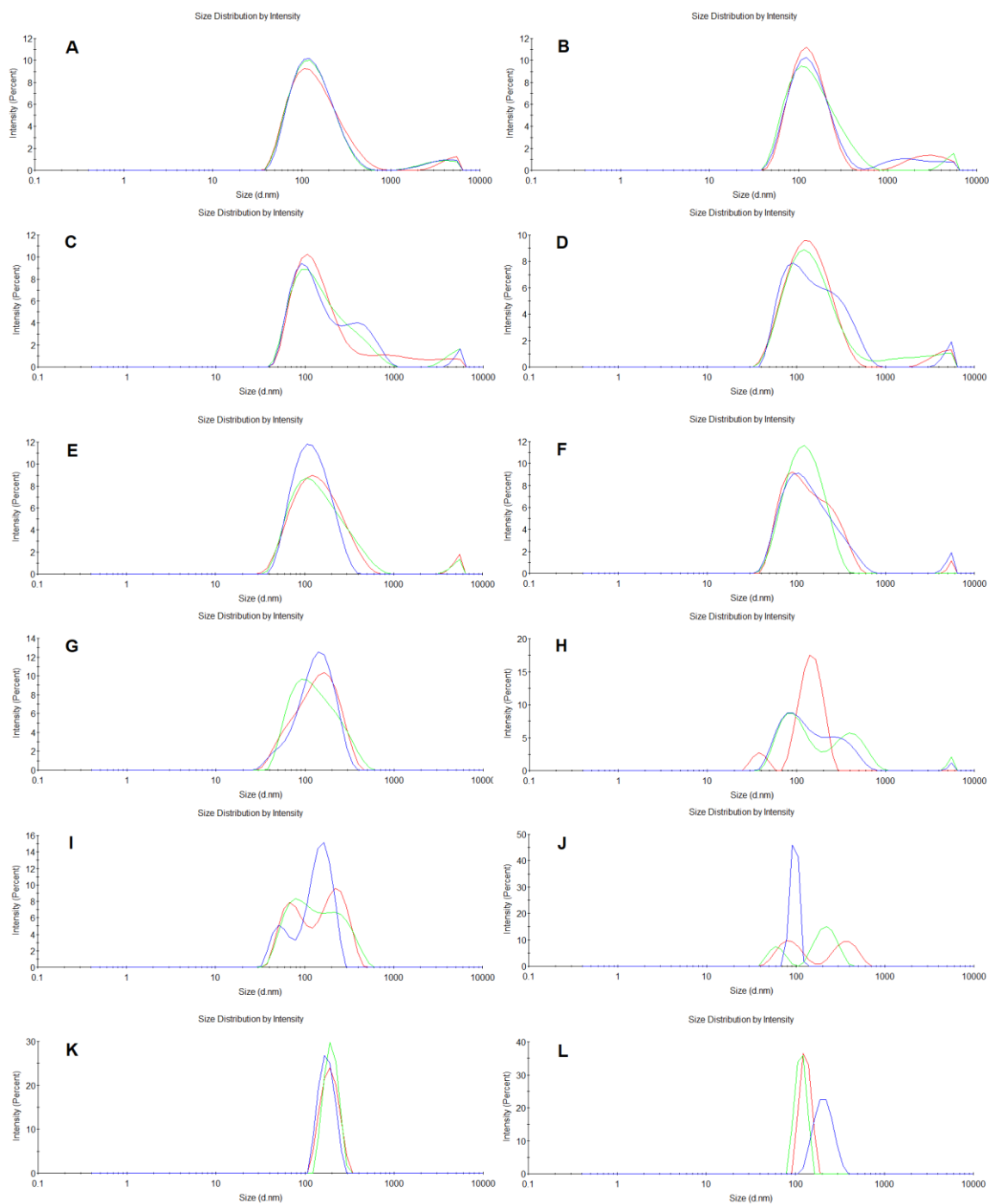


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (1:10) preparada com óleo essencial de *C. citratus* (8mg/mL, 500 mL), água deionizada (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

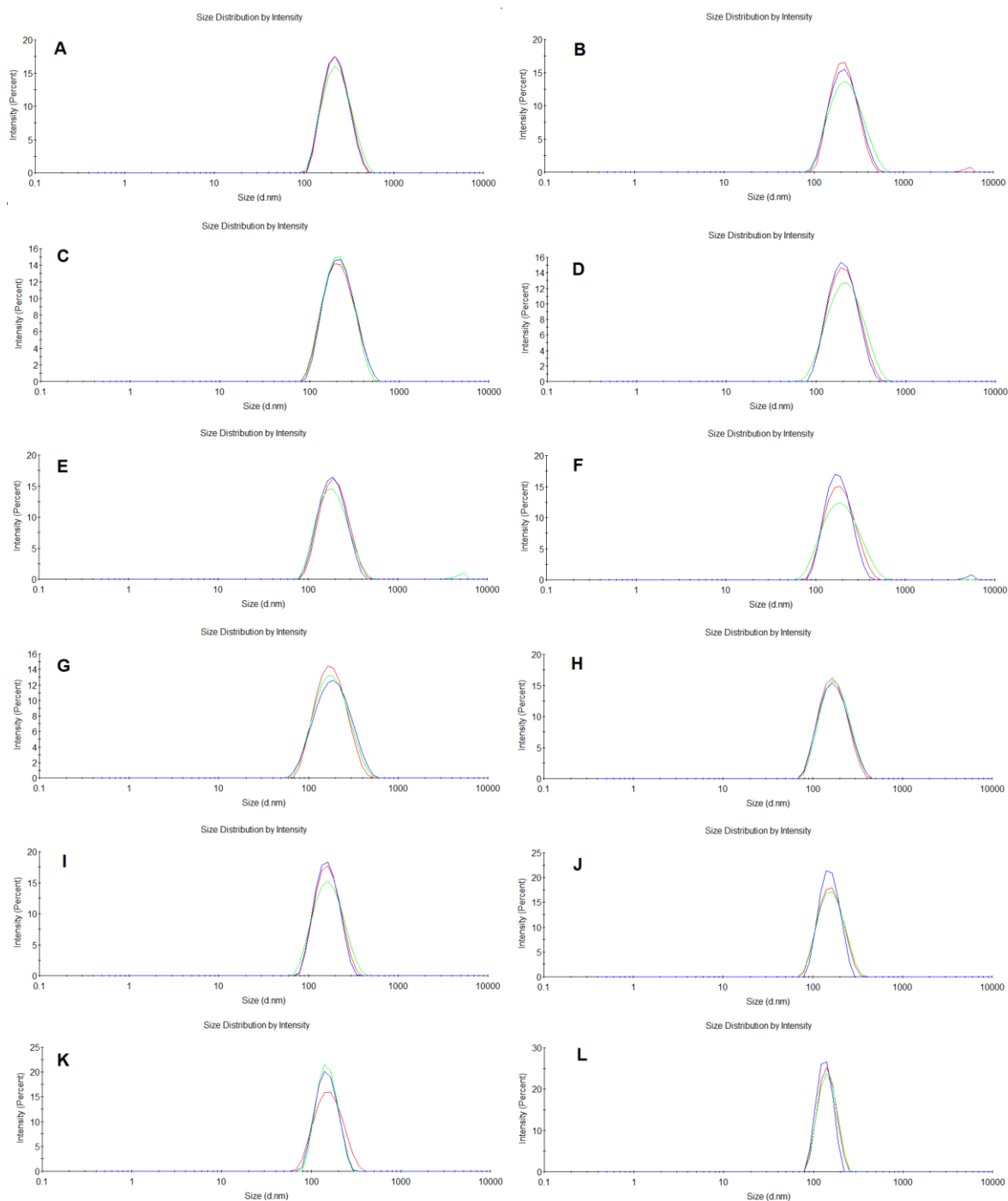


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (concentrada) preparada com óleo essencial de *C. citratus* (8mg/mL, 500 mL), infusão (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

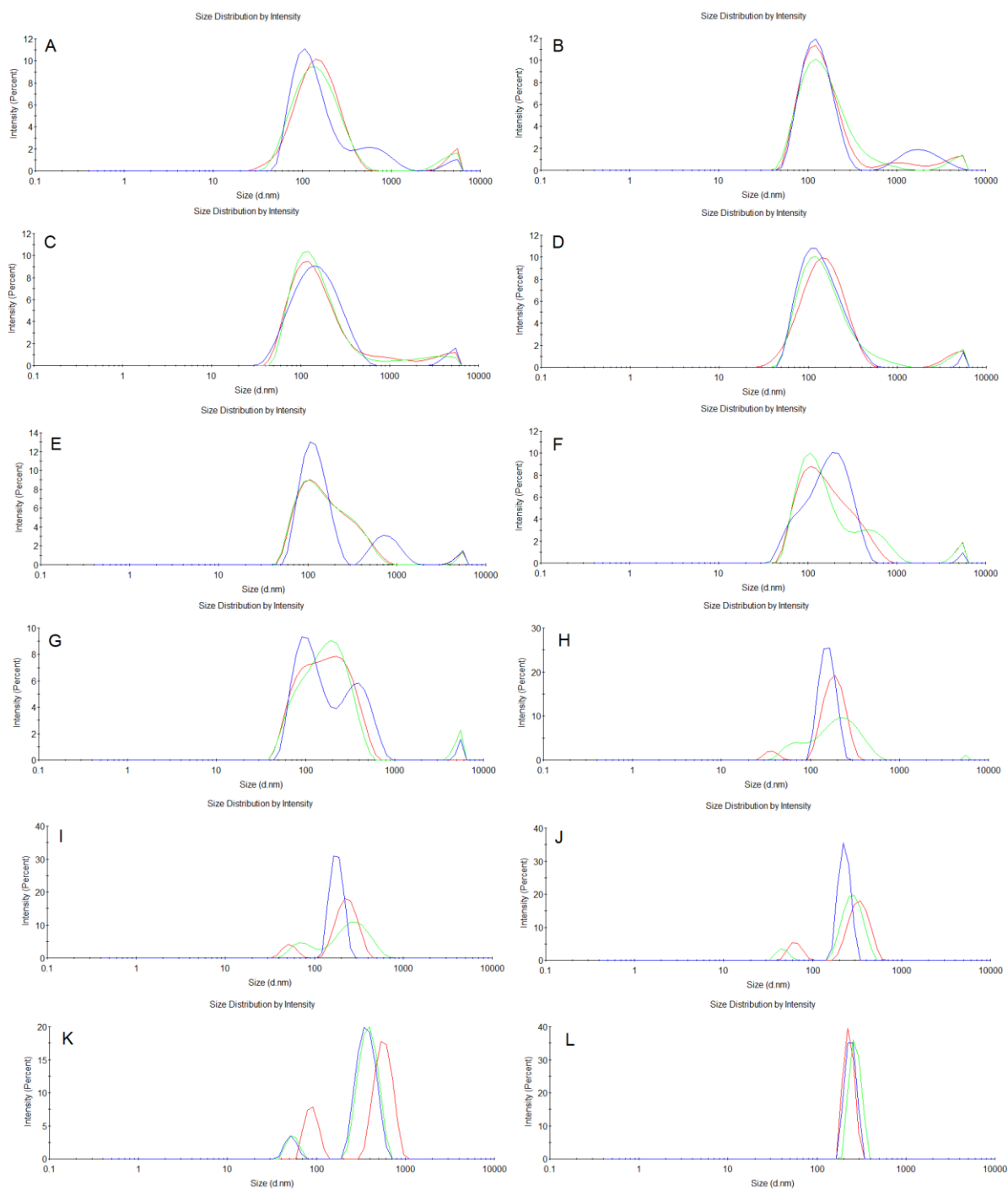


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (1:10) preparada com óleo essencial de *C. citratus* (8mg/mL, 500 mL), infusão (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

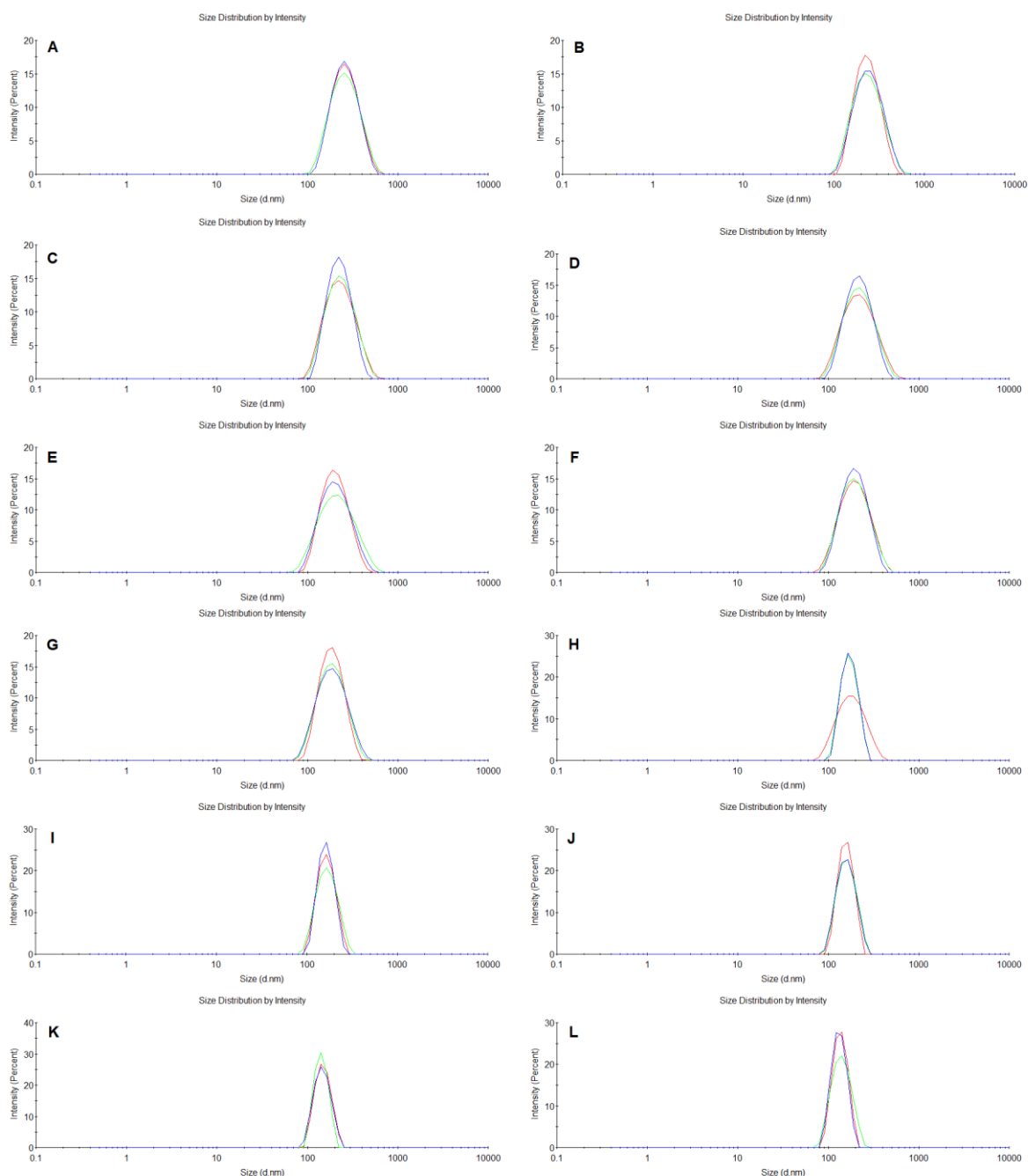


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (concentrada) preparada com óleo essencial de *C. flexuosus* (8mg/mL, 500 mL), água deionizada (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

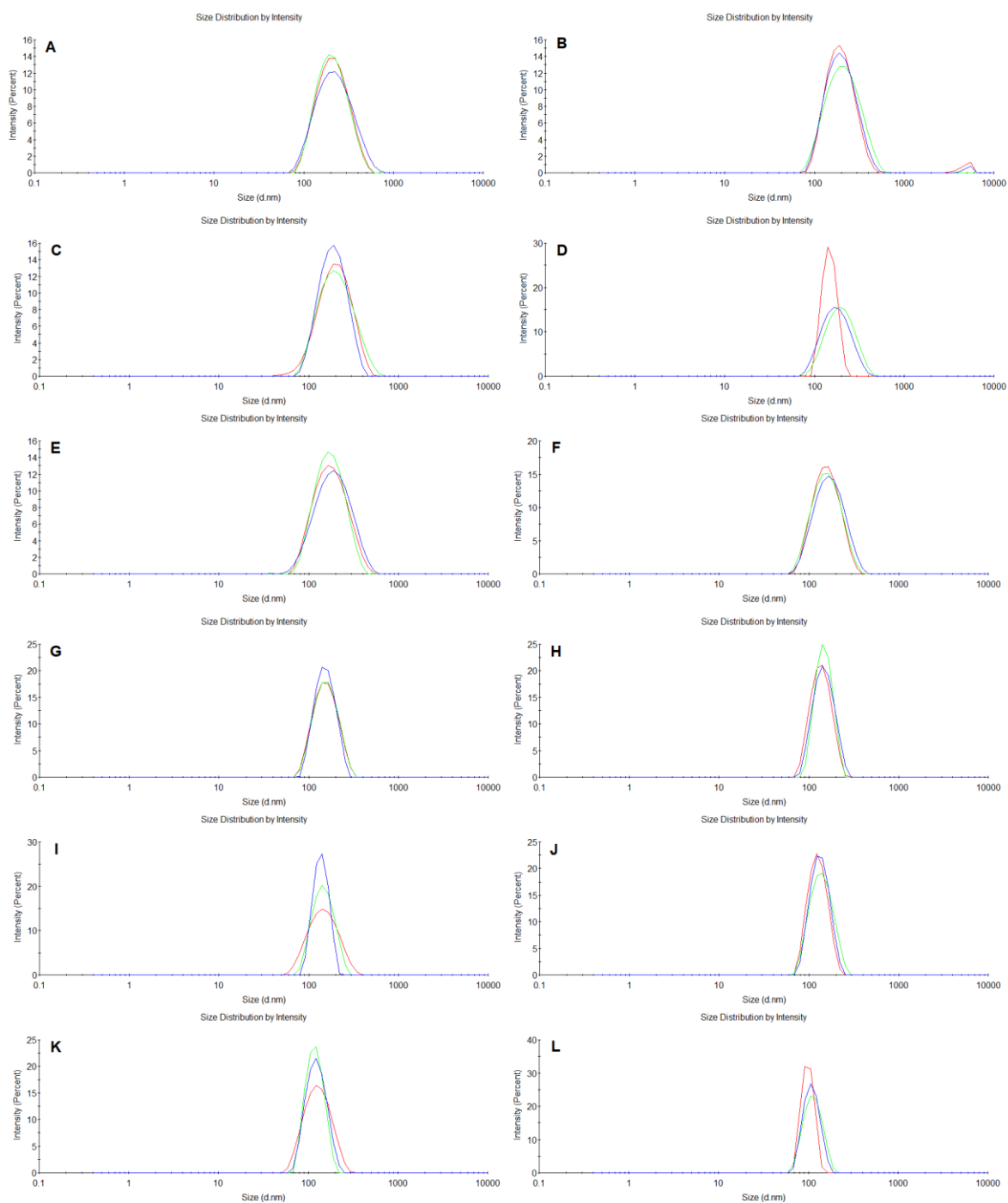


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (1:1) preparada com óleo essencial de *C. flexuosus* (8mg/mL, 500 mL), água deionizada (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

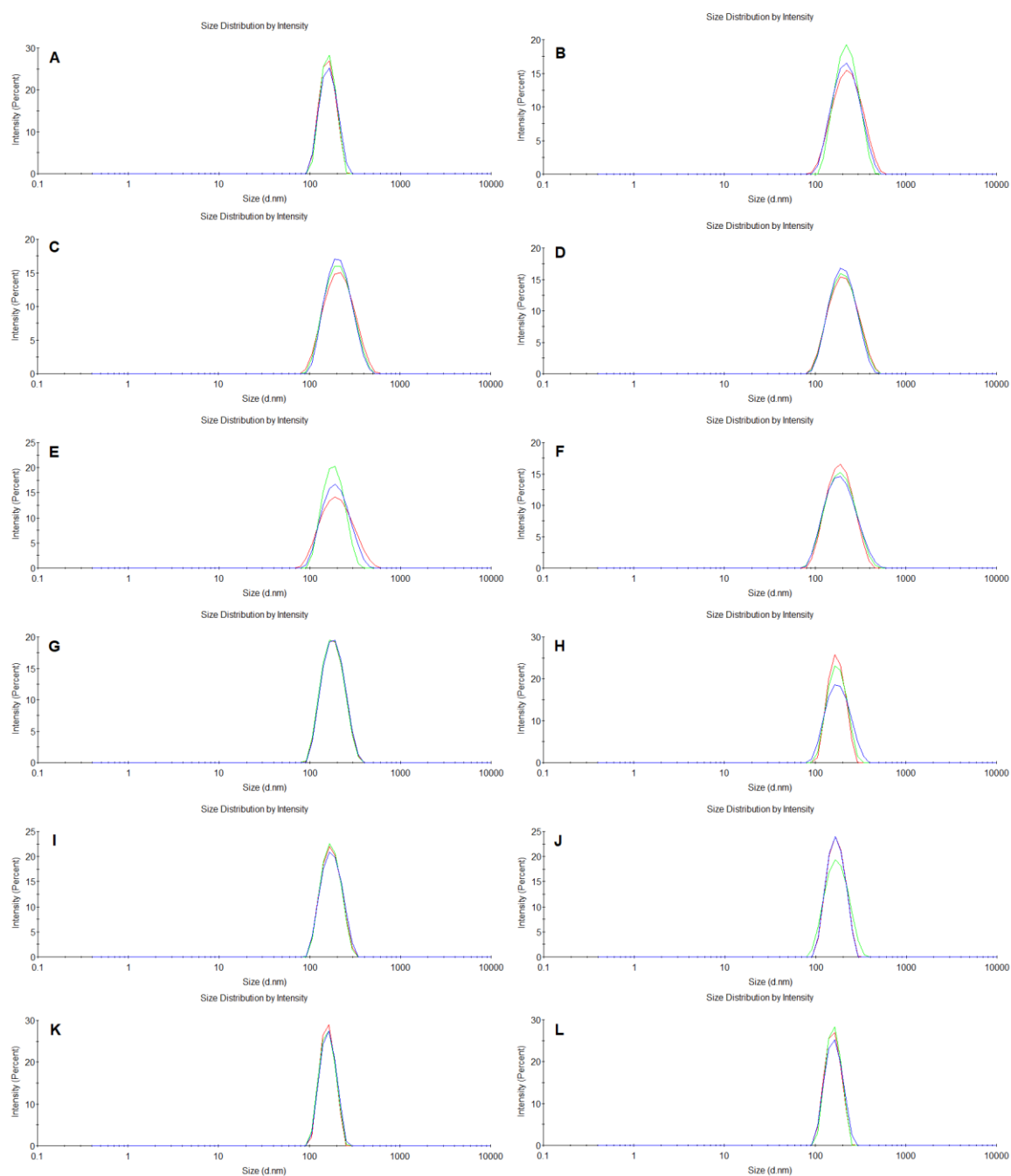


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (concentrada) preparada com óleo essencial de *C. flexuosus* (8mg/mL, 500 mL), infusão (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C.

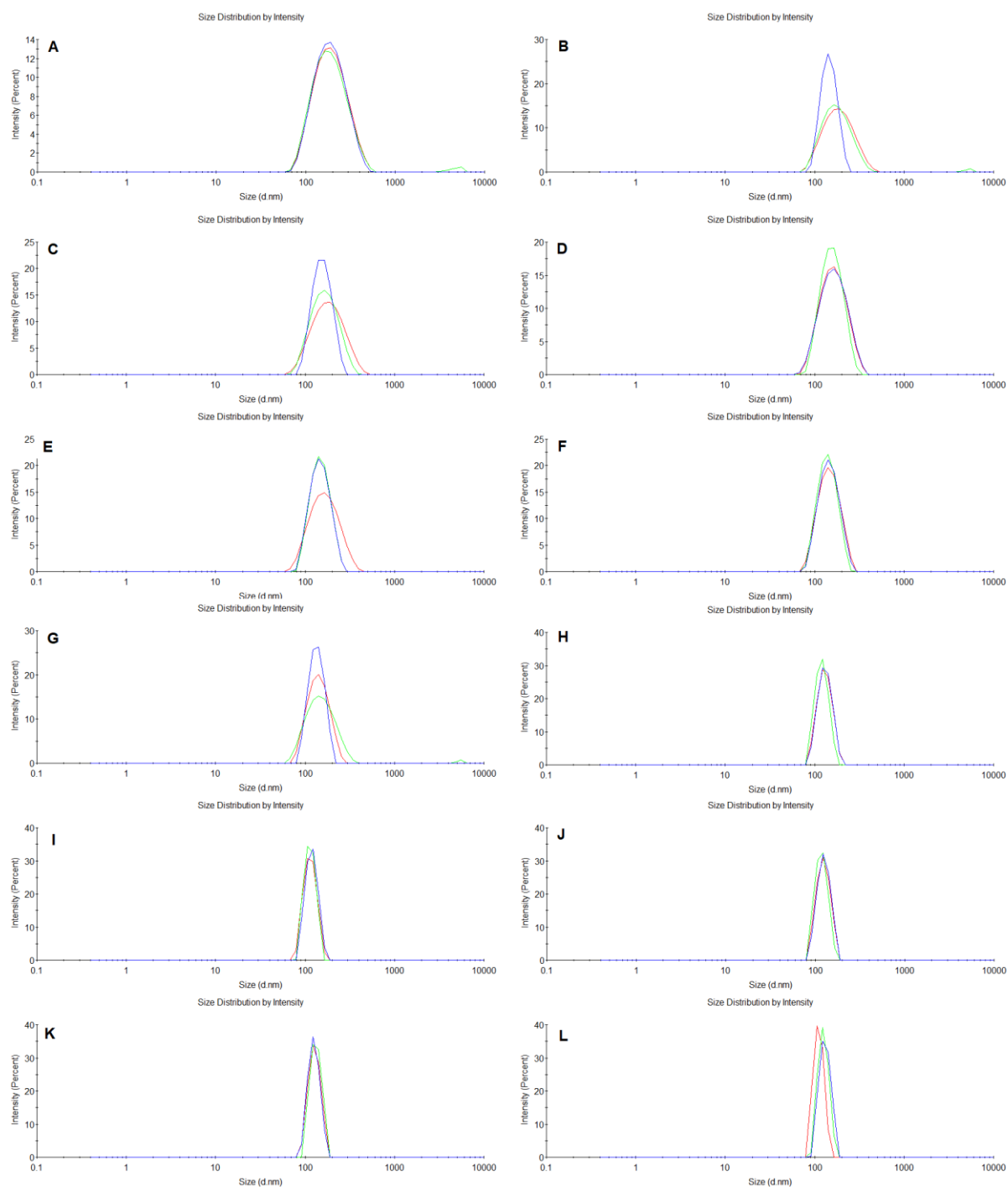


Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula da nano-emulsão (1:1) preparada com óleo essencial de *C. flexuosus* (8mg/mL, 500 mL), infusão (2g) submetida a rampa de aquecimento (A – L): 25 – 80 em intervalos de 5°C