

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Mariana Fernandes de Almeida

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA**

Rio de Janeiro

2016

Mariana Fernandes de Almeida

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. D.Sc. Alexandre Porte

Co-orientador: Prof. D. Sc. Anderson Junger Teodoro

Rio de Janeiro

2016

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professor Doutor Alexandre Porte

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

---

Professora Doutora Ellen Mayra da Silva Menezes

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

---

Professora Doutora Luciana Helena Maia Porte

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus afilhados Gabriel e Heitor...

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por todo apoio e incentivo ao longo de toda a minha vida e pela paciência ao longo desses últimos dois anos, de muito estresse e ausência.

Ao meu orientador Alexandre Porte por me aceitar como aluna, por toda orientação durante esse trabalho, paciência e disponibilidade.

Ao meu co-orientador Anderson Junger Teodoro pelos ensinamentos, dedicação, paciência e apoio. Obrigada por toda ajuda que eu necessitei ao longo do trabalho e por todo o tempo dedicado.

Aos professores Victor Marin e Juliana Nunes pela ajuda durante o meu trabalho com orientações quanto aos experimentos, análise e discussão de resultados e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório e de turma, em especial Lana, Newton, Nayara, Joel, Tamara, Raquel, Bruno, Vanessa, Clara, Deborah, Cristiane, Juliana, Izabela e Márcia por toda ajuda que precisei para realização dos experimentos necessários à execução deste trabalho, por toda paciência e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao professor D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e Paola pelo auxílio com a Cromatografia gasosa.

Aos meus amigos pela compreensão ao longo desse tempo, pela minha ausência, estresse, ansiedade e por estarem ao meu lado sempre. Em especial, Pedro e Rebeca pelo apoio e pelo abrigo, quando os experimentos duravam até tarde da noite; e à Gisele, mais recente amiga e querida que compartilhou comigo conversas importantes que me incentivaram muito a seguir em frente.

Ao meu primo e amigo Alex Lauriano por ter me indicado esse processo seletivo, por sempre me incentivar e acreditar em mim.

À equipe da Tribo Culinária por entenderem minha dedicação a esse trabalho e me permitirem que isso fosse possível.

Ao meu irmão Flávio e à minha cunhada, por trazer Heitor à minha vida, trazendo alegria e alento nos momentos que mais precisei e por terem me dado a honra de ser a madrinha dele.

Ao meu namorado Leonardo Henriques pelo apoio ao longo de todos os nossos anos juntos, e em especial nesses últimos dois anos, por me incentivar sempre, por discutir os meus resultados comigo, me aconselhar e me orientar também um pouco, estar ao meu lado em todos os momentos e acreditar em mim quando as vezes até eu duvidava.

## RESUMO

*Cymbopogon citratus* é mais conhecido no Brasil como capim-limão, apresenta uso na medicina popular como anti-inflamatório, ansiolítico, anticonvulsivante, antipirético e sedativo, e também na indústria de cosméticos e perfumes. Além disso muito estudos relatam ação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OEC) em bactérias, fungos e leveduras, como agente antimicrobiano. Apesar de amplamente empregado na medicina popular pouco é sabido sobre a capacidade antioxidante e citotóxica do OEC, por isso os objetivos deste trabalho foram extrair o óleo essencial, determinar sua composição química, atividade antioxidante, atividade citotóxica em linhagem de câncer de próstata (PC-3) e atividade antimicrobiana. O OEC foi obtido pelo processo de hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger e sua composição foi realizada por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massas. A atividade antioxidante foi avaliada, empregando-se os métodos de redução do radical livre DPPH, método de redução do ferro – FRAP e pela captura do radical ABTS. A atividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em ágar com as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), como controle positivo usamos a gentamicina e como controle negativo, o DMSO. Para atividade citotóxica utilizamos a linhagem celular de câncer de próstata humana com metástase em osso (PC-3), e realizamos os ensaios de viabilidade celular e de ciclo celular e apoptose, realizadas através do método MTT e por citometria de fluxo, respectivamente. Como resultado da sua composição, foram identificados no OEC os compostos majoritários: geranial, neral, mirceno e geraniol. Quanto às suas análises químicas e biológicas, o OEC apresentou potencial antioxidante quando comparados a outros óleos essenciais e atividade antimicrobiana para a cepa de *S. aureus*, enquanto a *E. coli* se mostrou resistente. Para atividade citotóxica, foi demonstrada uma diminuição de cerca de 50 a 80% na viabilidade celular após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente, e a análise do ciclo celular revelou que o OEC aumentou a percentagem de células na fase G0/G1 e diminuiu nas fases S e G2/M após 24 horas de tratamento na linhagem PC-3. O OEC promoveu a parada do ciclo celular, mas não foi capaz de aumentar a apoptose dessas células. Estes resultados indicam que o OEC de *Cymbopogon citratus* apresenta potencial terapêutico como agente antimicrobiano, antioxidante e antitumoral.

**Palavras-chave:** Capim-limão. Câncer. Próstata.

## ABSTRACT

*Cymbopogon citratus*, better known in Brazil as lemongrass, has use in folk medicine as anti-inflammatory, anxiolytic, anticonvulsant, antipyretic and sedative, and in the cosmetics and perfume industry. Also very studies report CEO action in bacteria, yeast and fungi, as an antimicrobial agent. Although widely used in folk medicine, little is known about the antioxidant and cytotoxic potential of the CEO, so the objectives of this study were to extract the essential oil, to determine its chemical composition, antioxidant activity, cytotoxic activity in prostate cancer cell line (PC- 3) and antimicrobial activity. The CEO was obtained by hydro distillation process using Clevenger apparatus, and its composition was performed using gas chromatography/mass spectrometry. The antioxidant activity was evaluated, using free radical reduction methods DPPH, iron reduction method - FRAP and the capture of ABTS radical. The antimicrobial activity was performed using the agar diffusion method with strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), as a positive control we used gentamicin and as a negative control, DMSO. For cytotoxicity, use the cell line of human prostate cancer bone metastasis (PC-3), and performed cell viability assays and apoptosis and cell cycle performed through the MTT and flow cytometry, respectively. As a result of its composition, they were identified in the CEO major compounds: geranial, neral, geraniol and myrcene. As for its chemical and biological analysis, the CEO presented antioxidant potential when compared to other essential oils and antimicrobial activity for the strain of *S. aureus*, while *E. coli* was resistant. To cytotoxic activity was demonstrated a decrease of about 50 to 80% in cell viability after 24 and 48 hours of treatment, respectively, and cell cycle analysis revealed that the CEO increased the percentage of cells in G0/G1 phase and decreased in phases S and G2/M after 24 hours of treatment in PC-3 line. The promoted CEO cell cycle arrest but was not able to increase apoptosis. These results indicate that the CEO has therapeutic potential as an antimicrobial, antioxidant and anti-tumor agent.

**Keywords:** Lemongrass. Cancer. Prostate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Planta <i>Cymbopogon citratus</i> . .....	15
Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . .....	18
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma. ....	25
Figura 4: Atividade antioxidante pelo método de DPPH (A), FRAP (B) e ABTS (C) do OEC. ....	40
Figura 5: Efeito da aplicação do OEC sobre as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (A) e <i>Escherichia coli</i> (B). ....	42
Figura 6: Efeitos do óleo essencial de capim-limão sobre a viabilidade celular da linhagem PC-3 após 24 horas e 48 horas de tratamento. ....	46
Figura 7. Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre a viabilidade de células PC-3 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento em diferentes concentrações .....	46
Figura 8: Efeito do OEC sobre a progressão do ciclo celular em célula PC-3 24 horas após o tratamento.. ....	48
Figura 9: Taxa de aumento relativo de apoptose na linhagem PC-3 tratadas com OEC após 24 horas de tratamento.....	49
Quadro 1. Microrganismos onde o óleo essencial de capim-limão se mostrou efetivo quanto a susceptibilidade .....	20

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Composição do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> em diferentes métodos de secagem das suas folhas .....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2: Incidência e Mortalidade Estimada de Câncer Mundial para ambos os sexos, em 2012 .....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 3: Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer de próstata, segundo localização. ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 4: Valor do antígeno prostático específico (PSA) e risco de câncer de próstata, em pacientes com toque prostático suspeito.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 5: Classificação do câncer de próstata (TNM 2002).....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 6: Classificação dos microrganismos de acordo com o halo de inibição (mm) .....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 7: Volumes aplicados para a amostra .....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 8: Volumes aplicados para a amostra .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 9: Composição do OEC por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 10: Porcentagem dos compostos majoritários no OE de capim-limão .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 11: Valor da Atividade Antioxidante do OEC para os métodos de DPPH, ABTS e FRAP .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 12: Diâmetro dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações do óleo essencial de <i>C. citratus</i> frente aos microrganismos testados .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 13: Efeito do óleo essencial de capim-limão (50 e 250 µg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de câncer de próstata após 24 horas de incubação .....</i>	<i>50</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
2.1	<i>Cymbopogon citratus</i>	15
2.2	ÓLEO ESSENCIAL (OE)	17
2.2.2	Propriedades químicas e biológicas dos óleos essenciais	19
2.3	CÂNCER	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	29
3.1	GERAL	29
3.2	ESPECÍFICOS	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
4.1	AMOSTRA	30
4.2	AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	30
4.2.1	Obtenção da fração volátil	30
4.2.2	Identificação dos constituintes do óleo essencial	30
4.3	ANÁLISE ANTIMICROBIANA	31
4.4	ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.4.1	Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH	32
4.4.2	Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )	33
4.4.3	Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS•+	34
4.5	ENSAIO CELULAR	34
4.5.1	Cultura de células e protocolo de tratamento	34
4.5.2	Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT	35
4.5.3	Ensaio de Ciclo celular	35
4.5.4	Ensaio de Apoptose	36
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. citratus</i>	37
5.3	AVALIAÇÃO DO PODER ANTIOXIDANTE	39
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	41
5.5	ATIVIDADE CITOTÓXICA	45
5.5.1	Ensaio sobre a viabilidade celular (MTT)	45

5.5.2 Efeito do óleo essencial de capim-limão no ciclo celular e sobre a taxa de apoptose..	47
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

*Cymbopogon citratus* é originário da Índia e muito produzido na região Sul do Brasil, no estado do Paraná, mais conhecido no Brasil como capim-limão (CASTRO & RAMOS, 2003; GOMES & NEGRELLE, 2003). No Brasil é bastante conhecido na medicina popular, sendo utilizado como: digestivo, analgésicos, antitérmico, diurético, antiespasmódico, antialérgico, entre outros. Seu óleo essencial (OEC) é utilizado na indústria de sabonetes, perfumaria e produtos relacionados, além de produtos com fins medicinais (GOMES & NEGRELLE, 2007).

Os óleos essenciais (OE) têm sido amplamente estudados quanto sua ação antimicrobiana (NGUEFACK *et al*, 2012; NAIK *et al*, 2010; TZORTZAKIS *et al*, 2007), antioxidante (SACCHETTI *et al*, 2005) e citotóxica (SUN *et al*, 2014). O uso massivo de substâncias antimicrobianas sintéticas é um fator determinante no desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos existentes. Com isso, a necessidade de estudos de novas substâncias de origem vegetal vem ganhando relevância na literatura científica (NAIK *et al*, 2010).

Outro fator impactante na saúde pública é o número crescente de casos de câncer. A estimativa de ocorrência de novos casos, biênio 2016-2017, no Brasil será de 600 mil, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, os números de casos novos de câncer chegarão a 420 mil. O Câncer de próstata é o tumor maligno mais comum em homens e a quinta causa de morte por câncer entre homens, com prevalência de 975 mil casos e 300 mil mortes estimadas em 2012 no mundo e, no Brasil representa a principal causa de mortalidade associada ao câncer, com 17.200 mortes e o tipo mais incidente nos homens (32,5%) (IARC, 2012). O aumento das taxas de incidência do câncer de próstata pode ser justificado pelo aumento da expectativa de vida da população e o crescente rastreamento do seu diagnóstico (DAMIÃO, 2015). O número de casos de câncer de próstata em nosso país e no mundo motivam a busca por alternativas para o seu combate.

Com isso, justifica-se a realização de pesquisas relacionadas às atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica, a fim de avaliar a ação do OEC nos microrganismos testados, sua ação antioxidante, viabilidade celular de câncer de próstata e seus efeitos no ciclo celular e apoptose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Cymbopogon citratus*

*Cymbopogon citratus* (figura 1) pertence à família *Poaceae* (antiga *Graminae*), originário da Índia. Em virtude de condições climáticas serem semelhantes à da Índia, essa espécie se dispersou e aclimatou por todo o território brasileiro. É conhecido por diversos nomes populares e dentre os mais comuns estão: capim-cidró, capim-limão, capim-cidreira, capim cidrão, chá-de-estrada, erva-cidreira e citronela-de-java. É uma erva com caule rizomatoso muito ramificado, escuro, curto, semi-subterrâneo e palhoso, medindo de 0,60 a 3 m de altura. As raízes são fibrosas, escuras e numerosas. As folhas são moles, estreitas e longas (0,50 a 1,0 m), aromáticas, com margens ásperas e cortantes (CASTRO & RAMOS, 2003; GOMES & NEGRELLE, 2003).



**Figura 1:** Planta *Cymbopogon citratus*. Fonte: GBENOU et al, 2012.

*C. citratus* tem uma produção mais destacada no Brasil nas regiões Sul e Sudeste, em especial no estado do Paraná, onde seu chá é um dos mais comercializados pelas empresas do ramo. Gomes & Negrelle (2015) realizaram um estudo sobre a cadeia produtiva do *C. citratus*, onde evidenciam que mais de 80% dos produtores agroindustriais não seguem protocolos estabelecidos para sua produção, e desconhecem fatores como obtenção de mudas, época adequada de plantio e colheita, controle de pragas e doenças gerando um baixo rendimento industrial do óleo essencial do mesmo, assim como o transporte e armazenamento inadequados geram perda de qualidade desse óleo quanto aos seus princípios ativos e contaminação por agentes que podem causar danos à saúde dos consumidores.

Em um estudo conduzido por Gomes *et al* (2007) para avaliar a produção de *C. citratus* no estado do Paraná, Brasil, foi verificado que esta é realizada a partir de mudas extrativistas que crescem espontaneamente na beira da estrada, possibilitando contaminações por poluentes, como metais pesados. O preparo do solo era feito de forma manual, sem análise prévia e com presença de doenças fúngicas.

O chá preparado a partir das suas folhas é muito utilizado como antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, ansiolítico, hipnótico, anticonvulsivante, antipirético, diurético e sedativo. É comumente utilizado na medicina popular no Brasil para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso e gastrointestinal. O óleo essencial obtido a partir de folhas frescas desta planta é amplamente utilizado pelas indústrias de perfumes, cosméticos e na medicina tradicional para diversas finalidades (SONKER *et al*, 2014; SANTIN *et al*, 2009; GBENOU *et al*, 2013; BLANCO *et al*, 2009). Costa *et al* (2011) em seu estudo não detectaram efeitos deletérios em funções do fígado ou rim, nas doses testadas. Durante a avaliação de biomarcadores de genotoxicidade e toxicológicos mostrou que *C. citratus* apresenta baixa toxicidade e pode ser considerado seguro em um tratamento a longo prazo com doses de até 100 mg/Kg.

## 2.2 ÓLEO ESSENCIAL (OE)

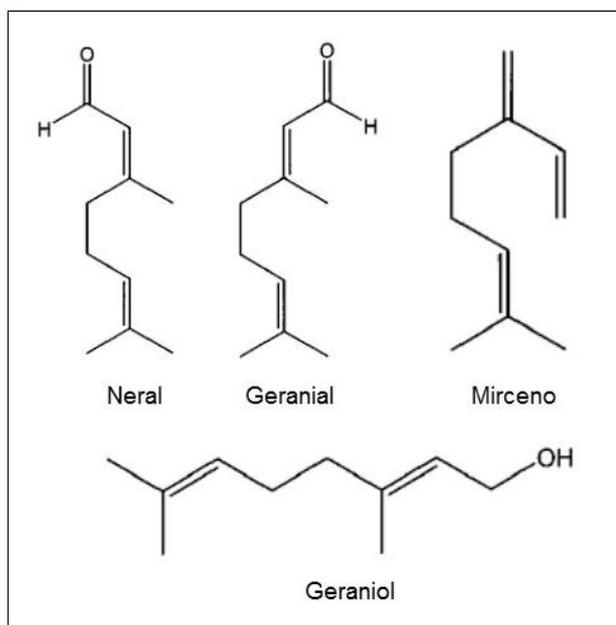
Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais, caracterizados por um odor forte e formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários, em resposta a estressores, com isso, as condições de crescimento podem afetar a produtividade e o teor do OE (CALO *et al*, 2015). Essa mistura de compostos voláteis exerce ações biológicas diferentes em humanos, animais e outras plantas, exercendo atividades como antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida, além de funcionar em uma série de fases de muitas doenças, como o câncer, por exemplo. São também utilizados na preservação de alimentos e como analgésicos, sedativos, medicamentos anti-inflamatórios (BOUKHATEM *et al*, 2014; CARMO *et al*, 2013), antiespasmódicos e anestésicos locais (GORNEMANN *et al*, 2008). Seus componentes são utilizados em perfumes, cosméticos, produtos de limpeza, odontologia, agricultura, assim como flavorizantes de comidas e bebidas. Os óleos essenciais são uma mistura muito complexa, onde cada um pode conter cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Eles são caracterizados por dois ou três componentes presentes em altas concentrações (20 a 70%) se comparados aos outros presentes em quantidades mínimas. Geralmente, esses componentes presentes em maior quantidade são os que determinam a propriedade biológica do óleo essencial (BAKKALI *et al*, 2008; ADORJAN & BUCHBAUER, 2010; BHALLA *et al*, 2013).

Devido a essas propriedades biológicas presentes nos óleos essenciais estarem relacionadas aos seus compostos majoritários, os óleos se tornaram alvo para recuperação dessas substâncias bioativas. Fornari *et al*. (2012) fizeram uma revisão sobre o assunto onde desde o ano de 2000 até 2012, cerca de 4000 artigos apresentavam “óleo essencial” ou “óleo volátil” como palavra-chave e aproximadamente 3000 também incluíam as palavras “bioativo” ou “bioatividade”.

Mais de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais para tratar seus problemas de saúde. Visto isso, o estudo de constituintes das plantas medicinais com grande potencial farmacêutico é de importante valia (GBENOU *et al*, 2013; ADORJAN & BUCHBAUER, 2010).

O óleo essencial de alfazema e lavanda, por exemplo, têm uma produção anual mundial de 200 e 1000 toneladas por ano, respectivamente, onde apresentam grande potencial antioxidante, além de propriedades anti-inflamatórias, anti-mutagênicos, antiviral e antibacteriana (LESAGE-MEESSEN *et al*, 2015).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OEC), é amplamente utilizado como medicamento em regiões tropicais no mundo, especialmente no sudeste asiático. Um total de 16 constituintes químicos representando 93,69% do óleo foram identificados, entre os quais, geranial (27,04%), neral (19,93%) e mirceno (27,04%) foram os principais constituintes encontrados (figura 2) (TZORTZAKIS & ECONOMAKIS, 2007; GBENOU *et al*, 2013; SANTIN *et al*, 2009).



**Figura 2.** Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.  
Fonte: Adaptado de NEGRELLE & GOMES, 2007

Para uma melhor extração de seu óleo essencial é indicado que o *C. citratus* seja coletado no período da manhã (8:00 às 9:00h), no Brasil nos meses de março, abril e setembro onde o índice pluviométrico e temperatura são mais elevados (SANTOS, 2009).

Diferentes formas de secagem da planta *Cymbopogon citratus* foram estudadas por Hanaa *et al* (2012), onde secou as folhas no sol, na sombra e no

forno. Encontrou diferenças quanto ao teor de óleo essencial, onde todas as formas de secagem apresentaram teor inferior, comparando às folhas frescas, excetuando o percentual de mirceno na secagem ao sol, com valores superiores às folhas frescas. Quanto a análise de seus compostos, todas as apresentações (folhas frescas e secas) apresentaram os mesmos compostos majoritários, mas com diferenças quantitativas (tabela 1).

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em diferentes métodos de secagem das suas folhas

Composto	Folhas frescas	Secagem ao sol	Secagem na sombra	Secagem no forno
Mirceno	15,69 %	16,16 %	14,49 %	15,42 %
Neral	34,98 %	30,08 %	34,52 %	31,28 %
Geranial	40,72 %	31,53 %	39,86 %	37,24 %

Fonte: Adaptado de Hanaa *et al*, 2012

## 2.2.2 Propriedades químicas e biológicas dos óleos essenciais

Óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Tymus vulgaris* apresentam um elevado potencial de conservação de alimentos sendo eficaz contra micotoxinas de *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum* e *Penicillium verrucosum*. Além de terem se mostrado mais ativos que o conservante sintético sorbato de potássio, com atividade antifúngica. Com isso, sua aplicação na agroindústria é indicada para preservação natural de alimentos, com uma alta atividade antifúngica (NGUEFACK *et al*, 2012).

Segundo a literatura, o OEC apresentou atividade antibacteriana e antifúngica para diversos microrganismos, que resumidamente estão catalogados no quadro 1.

Quadro 1. Microrganismos onde o óleo essencial de capim-limão se mostrou efetivo quanto a susceptibilidade

Classificação	Microrganismos	Origem	Referências
Bactérias Gram -	<i>Escherichia coli</i>	CIP 105182 - ATCC 8739	Bassolé <i>et al</i> , 2011 Naik <i>et al</i> , 2010 Santos <i>et al</i> , 2009
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Naik <i>et al</i> , 2010
	<i>Salmonella entérica</i>	CIP 105150	Bassolé <i>et al</i> , 2011
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 9027	Santos <i>et al</i> , 2009
Bactérias Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144 - ATCC 6538	Bassolé <i>et al</i> , 2011 Naik <i>et al</i> , 2010 Santos <i>et al</i> , 2009
	<i>Bacillus cereus</i>	-	Naik <i>et al</i> , 2010
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Naik <i>et al</i> , 2010
	<i>Enterococcus fecalis</i>	CIP 103907	Bassolé <i>et al</i> , 2011
	<i>Listeria monocytogenes</i>	CRBIP13.134	Bassolé <i>et al</i> , 2011
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CIP 104725	Bassolé <i>et al</i> , 2011
	<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	Viuda-Martos <i>et al</i> , 2010
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	Isolado de uvas	Sonker <i>et al</i> , 2014
	<i>Aspergillus flavus</i>	Isolado de uvas	Sonker <i>et al</i> , 2014
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Isolado de uvas	Sonker <i>et al</i> , 2014
	<i>Candida albicans</i>	Isolado de candidíase vulvovaginal	Santos <i>et al</i> , 2009
	<i>Candida tropicalis</i>	Isolado de candidíase vulvovaginal	Santos <i>et al</i> , 2009
-; não informado			

Sonker *et al.* (2014) estudaram o efeito do OEC na redução da gravidade de doenças e possibilidade como conservante para a manutenção da qualidade de uvas pós-colheita. Os resultados mostraram que o OEC aumentou a vida de prateleira das uvas em até 10 dias. Ele também se mostrou potente inibidor do crescimento de fungos e de secreção de micotoxinas.

Naik *et al.* (2010) encontraram que o OEC foi efetivo para todos os organismos testados, com exceção da *Pseudomona aeruginosa*. Organismos gram-positivos

(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) foram mais susceptíveis ao OEC do que os organismos gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *P. aeruginosa*). A atividade antibacteriana encontrada foi aumentando progressivamente com o aumento da concentração do óleo.

Tzortzakis *et al.* (2007) demonstraram que OEC teve ação fungicida para *Colletotrichum cocodes*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*.

No estudo de Santin *et al.* (2009) o OEC no tratamento de parasitas, resultou em um efeito dose-dependente na inibição da proliferação de *Leishmania amazonenses*.

Bassolé *et al.* (2011) mostram que o OEC apresentou maior atividade para *Enterococcus fecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella dysenteriae*, dentre os microrganismos avaliados. Comparando a atividade do óleo com a dos antibióticos padrão tetraciclina e eritromicina, o óleo se mostrou mais efetivo para *E. fecalis*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *S. dysenteriae* para ambos os antibióticos e para *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* para eritromicina.

Viuda-Martos *et al* (2010) relataram que o OEC apresentou grande atividade antibacteriana para *Listeria innocua* com um halo de inibição de 49 mm, utilizando método de disco-difusão. *L. innocua* é uma bactéria gram-positiva não-patogênica presente no ambiente, solo e fontes de alimentos e podem sobreviver à condições extremas de pH e temperatura e, ambientes hipersalinos.

O OEC pode ser considerado um importante antifúngico. Teste na sua fase de vapor demonstraram vantagens ao seu uso na fase líquida, apresentando uma maior potência com doses inferiores além de poder ser usado como descontaminante no ar, em hospitais por exemplo (BOUKHATEM *et al*, 2014).

Com a crescente industrialização de alimentos e com a distância cada vez maior entre o produtor e o consumidor, mecanismos para prolongar a vida de prateleira desses alimentos, de modo a diminuir perdas nutricionais e retardar o processo de oxidação, vêm sendo utilizados. A indústria de alimentos utiliza

conservantes sintéticos para tal, mas a sua segurança vem sendo cada vez mais questionada. Com isso a intensa procura por antioxidantes naturais como substitutos. As principais fontes de antioxidantes naturais são os compostos fenólicos presentes em diferentes partes das plantas, como: frutas, legumes, nozes, sementes, folhas, raízes e cascas (JIROVETZ *et al*, 2006).

O uso de fontes mais naturais com propriedades antioxidantes, como os óleos essenciais, tem sido utilizado de modo a aumentar a vida de prateleira de produtos alimentares ricos em lipídios, melhorando assim sua estabilidade (HAZZIT *et al*, 2006).

Os compostos fenólicos estão muito presentes no reino vegetal, exercendo funções de proteção a plantas e vegetais contra ação de microrganismos, predadores, raio ultravioleta e outras pressões ambientais. Diversos fatores influenciam a acumulação desses compostos fenólicos nas plantas e um dos mais importantes é a exposição da planta ao sol, proporcionando seu aumento relativo. A fase de pós-colheita é crucial para manutenção desses compostos, onde o cuidado com a forma de secagem das plantas medicinais e seu armazenamento adequado são fundamentais para evitar a degradação desses compostos bioativos. O *Cymbopogon citratus* apresenta em sua composição ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, fenóis e taninos (COSTA *et al*, 2016).

Um dos compostos majoritários presentes no OEC é o citral, um monoterpene aldeído que confere odor característico do capim-limão e está presente de forma predominante em sua composição. É formado por dois isômeros, neral e geranial e é responsável pelas propriedades biológicas relacionadas ao óleo essencial de capim-limão (LIANG *et al*, 2004).

As metodologias para análise da atividade antioxidante baseiam-se em diferentes fundamentos. Os testes de DPPH, ABTS e FRAP têm como fundamento a transferência de elétrons. O ensaio ABTS gera o radical ABTS de cor azul/verde que pode ser reduzido pelos antioxidantes. O DPPH baseia-se na redução do DPPH de cor violeta. O FRAP é diferente dos outros por não existir radicais livres envolvidos, ocorre a redução do  $Fe^{+3}$  em  $Fe^{+2}$ . Devido à complexidade das reações envolvidas na atividade antioxidante, recomenda-se a utilização de duas ou mais

técnicas, a fim de se determinar a capacidade antioxidante de uma amostra, visto que uma única técnica não conseguiria determinar de forma isolada (FLOEGEL, et al, 2011).

Outra propriedade muito importante que vêm sendo estudada é a atividade citotóxica dos óleos essenciais. Óleo essencial obtido a partir de folhas frescas de *Zanthoxylum rhoifolium*, uma planta encontrada na Amazônia, demonstrou atividade citotóxica às linhagens de células cancerosas A-549 (carcinoma de fígado humano) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano). Esse efeito foi atribuído ao sinergismo entre os diferentes compostos presentes no óleo, uma vez que eles isolados não demonstraram o mesmo efeito satisfatório. Essa planta não apresentou efeito em células não-tumorais de rim de macaco e macrófagos de rato, o que sugere que esse óleo essencial tem uma atividade biológica seletiva interessante para as células tumorais (SILVA *et al*, 2007).

Halabi & Sheikh (2014) em seus resultados sugeriram um efeito antiproliferativo do extrato etanólico de *C. citratus* em linhagens de células cancerosas humanas de mama (MCF-7) e ovário (COAV).

## 2.3 CÂNCER

O câncer caracteriza-se pelo crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos. O crescimento de células cancerosas ocorre de forma incontrolável, formando mais novas células anormais. Essa proliferação pode ser controlada ou não controlada. O crescimento controlado, caracteriza-se pelo aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais. Já no crescimento não controlado tem-se uma massa anormal de tecido, mesmo após cessarem o seu estímulo inicial, e são denominadas neoplasias. As neoplasias, podem ser *in situ* ou invasivo, e na prática são denominadas de tumores. Esses tumores podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos ocorrem devido a um crescimento organizado, de forma geral lenta, expansiva e com limites bem nítidos, tem por característica não invadirem tecidos vizinhos. Os tumores malignos ou neoplásicos tem como característica um crescimento descontrolado de células

modificadas, que podem romper a membrana basal, atacar e invadir tecidos ao redor e provocar uma metástase. O tratamento para esses tumores também pode danificar células saudáveis e devido a isso, o tratamento alternativo (com uso de plantas) tem sido utilizado como tratamento adjuvante ao tratamento oficial (radioterapia, quimioterapia e cirurgia). Fontes naturais correspondem direta ou indiretamente a mais de 60% dos agentes anticancerígenos (MELO, 2011; INCA, 2012).

Em 2012, foram 14,1 milhões de casos novos de câncer, com 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer no mundo (tabela 2). Onde 8 milhões de novos casos (57%), 5,3 milhões de mortes por câncer (65%) e 15,6 milhões de pessoas vivendo com câncer (47,85%), ocorreram em países menos desenvolvidos. Em todas as idades, a incidência de câncer em homens foi 25% maior do que em mulheres (IARC, 2012). No Brasil, foram diagnosticados em 2014, 576.580 novos casos de câncer, sendo 52,43% em homens e 47,56% em mulheres, de todas as idades, com maior representação na região sudeste (51,98%), seguidos das regiões sul (20,17%), nordeste (17,18%), centro-oeste (7,18%) e norte (3,47%) (INCA, 2014).

Tabela 2: Incidência e Mortalidade Estimada de Câncer Mundial para ambos os sexos, em 2012

Câncer	Incidência			Mortalidade		
	Número	(%)	Taxa	Número	(%)	Taxa
Pulmão	1.824.701	13	23,1	1.589.925	19,4	19,7
Mama	1.671.149	11,9	43,1	521.907	6,4	12,9
Colorretal	1.360.602	9,7	17,2	693.933	8,5	8,4
Próstata	1.094.916	7,8	30,7	307.481	3,7	7,8
Estômago	951.594	6,8	12,1	723.073	8,8	8,9
Fígado	782.451	5,6	10,1	745.533	9,1	9,5
Todos os cânceres, excetuando câncer de pele não-melanoma	14.067.894	100	182,0	8.201.575	100	102,4

\* taxa bruta por 100 mil habitantes para todas as idades.

Fonte: Adaptado de IARC, 2012.

No Brasil, no biênio 2016-2017, as neoplasias de próstata (61.200 casos), pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral serão as mais frequentes nos

homens brasileiros, enquanto nas mulheres as neoplasias de mama (57.600 casos), cólon e reto, colo do útero, pulmão e estômago prevalecerão (figura 3) (INCA, 2016).

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

**Figura 3.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma. Fonte: INCA, 2016

No Brasil, foi estimado para o ano de 2016, 61.200 novos casos de câncer de próstata com uma maior concentração na região sudeste (tabela 3). A taxa bruta da estimativa de casos novos de câncer no Brasil e suas regiões, está representada na tabela 3. O câncer de próstata representa cerca de 6% do total de mortes por câncer no mundo em homens (INCA, 2016).

Tabela 3: Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer de próstata, segundo localização.

Localização	Estimativa dos Casos Novos			
	Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Região Norte	2.470	29,50	970	38,94
Região Nordeste	14.290	51,84	3.130	54,51
Região Centro-oeste	5.050	67,59	1.180	85,86
Região Sudeste	25.800	62,36	7.450	73,96
Região Sul	13.590	95,63	1.790	99,57
Brasil	61.200	61,82	13.940	64,93

Fonte: Adaptado de INCA, 2016.

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino e está localizada na parte baixa do abdômen. Apresenta um tamanho pequeno e localiza-se abaixo da

bexiga e à frente do reto. Ela circunda a uretra e produz e secreta o líquido prostático, que faz parte do sêmen, que contém espermatozoides (INCA, 2016). Embora seu tamanho seja pequeno, apresenta grande importância clínica, com uma alta frequência de doenças relacionadas, provocando grandes problemas na qualidade de vida dos homens acometidos por elas (SROUGI *et al*, 2008).

A próstata pode sofrer algumas alterações e gerar doenças como a prostatite, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP). A prostatite é uma doença categorizada em 4 tipos e geralmente é ocasionada por infecção bacteriana à glândula da próstata, apresentando sintomas urinários irritativos como frequência urinária, urgência e disúria ou obstrutiva como hesitação, fluxo baixo ou interrompido, além de esvaziamento incompleto, também podem apresentar dor, febre, calafrios, náuseas, entre outros. Seu tratamento varia de acordo com o tipo, mas geralmente são utilizados antibióticos de acordo com o resultado da cultura de bactérias e em alguns casos também são utilizados anti-inflamatórios (SHARP *et al*, 2010). A HPB acomete mais de 50% dos homens com mais de 60 anos de idade, tem como fatores de risco a idade aumentada e a presença dos testículos. Seu desenvolvimento acontece principalmente pela ação da diidrosterona (DHT), que é transformada pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, quando a testosterona adentra na célula epitelial da próstata. A DHT promove a síntese de proteínas envolvidas na proliferação das células epiteliais, levando a outros mecanismos, que em conjunto promovem a proliferação das glândulas prostáticas. Pacientes acometidos pela HPB apresentam os mesmos sintomas irritativos ou obstrutivos, já mencionados anteriormente nos casos de prostatite, mas podem evoluir com outras complicações como retenção urinária, litíase vesical, infecção urinária, insuficiência renal, entre outros. Seu tratamento pode ser tanto farmacológico quanto cirúrgico (SROUGI *et al*, 2008).

O câncer de próstata (CaP) pode apresentar duas formas: a histológica (latente) e a clínica (invasiva). Grande parte dos indivíduos acometidos pelo CaP são assintomáticos e a doença se apresenta de forma latente. Estudos com necropsia identificaram em homens que faleceram por outros motivos, a presença de CaP, mas não em decorrência deste. Os principais fatores de risco associados ao câncer de próstata são: idade maior ou igual a 50 anos e história de pai ou irmão

com câncer da próstata antes de 60 anos de idade. Nos estágios iniciais, é completamente assintomático, no entanto os sinais e sintomas mais frequentes associados ao câncer de próstata são: dificuldade em urinar; urinar várias vezes à noite, dor ao urinar e redução da força e calibre do jato urinário, mas esses sintomas também são comuns nos casos de prostatite e HPB, com isso é necessário avaliar outras formas para se fechar um diagnóstico (INCA, 2002; RHODEN & AVERBECK, 2010; SROUGI *et al*, 2008).

As principais formas de diagnóstico do CaP são o exame digital transretal da próstata, antígeno prostático específico (PSA) e a biópsia por ultrassonografia transretal (USTR). O exame digital transretal prostático positivo para representar CaP é dependente do valor de PSA encontrado no paciente em questão. O PSA é uma glicoproteína sintetizada nas células epiteliais do tecido prostático e uma das formas mais importantes para detectar, estagiar e monitorar o CaP (tabela 4). A biópsia é realizada para obtenção de material necessário para o exame anatomopatológico da próstata, a fim de se confirmar o diagnóstico de câncer (RHODEN & AVERBECK, 2010).

Tabela 4: Valor do antígeno prostático específico (PSA) e risco de câncer de próstata, em pacientes com toque prostático suspeito.

<b>PSA (ng/mL)</b>	<b>Valor preditivo positivo para câncer</b>
0-1	2,8-5%
1-2,5	10,5-14%
2,5-4	22-30%
4-10	41%
>10	69%

Fonte: RHODEN & AVERBECK, 2010

O método mais comum de estagiamento do câncer de próstata é a utilização de um sistema internacional denominado sistema de estagiamento TNM, de fundamental importância para o planejamento terapêutico de cada caso de CaP (tabela 5) (SROUGI *et al*, 2008).

Tabela 5: Classificação do câncer de próstata (TNM 2002)

<b>T – Tumor primário</b>	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor não palpável ou visível por método de imagem
T1a	Tumor em achado histológico incidental (5% ou menos do tecido ressecado)
T1b	Tumor em achado histológico incidental (> 5% do tecido ressecado)
T1c	Tumor identificado por biópsia prostática (ex.: biópsia indicada por aumento do PSA)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor envolve metade de um lobo ou menos
T2b	Tumor envolve mais da metade de um lobo, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor envolve ambos os lados
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni ou bilateral)
T3b	Tumor invade vesícula seminal
T4	Tumor é fixo ou invade estruturas adjacentes (que não as vesículas seminais): colo da bexiga, esfíncter externo, reto, músculos do assoalho pélvico ou parede pélvica
<b>N – Linfonodos regionais</b>	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em linfonodos regionais
<b>M – Metástases à distância</b>	
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância
M1a	Linfonodos não regionais
M1b	Ossos
M1c	Outros sítios

Fonte: Adaptado de RHODEN & AVERBECK, 2010

Dentre os fatores que possivelmente atuam na diminuição do risco do câncer de próstata, destaca-se uma dieta rica em frutas, verduras, legumes, vegetais ricos em carotenoides, grãos e cereais integrais; e pobre em gordura, principalmente as de origem animal (MEDEIROS et al, 2010). Consumo elevado de tomate cozido e produtos derivados têm sido associados a uma diminuição de 35% dos riscos de CaP, isso devido a presença abundante de licopeno. Outro efeito protetor importante para redução dos riscos de ocorrência de CaP vêm sendo associados à uma redução em 32% a 63%, com complementação dietética de vitamina E (800 mg ao dia) e selênio (200 µg ao dia) (SROUGI et al, 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a composição e as atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e investigar sua influência em linhagem celular humana de câncer de próstata.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Coletar e extrair o óleo essencial do *Cymbopogon citratus*;
- Determinar a composição química do óleo extraído;
- Determinar a atividade antioxidante, em diferentes concentrações e métodos do óleo obtido;
- Avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana do óleo essencial, em diferentes concentrações;
- Avaliar a cinética de captação, em função do tempo de incubação, dos padrões do óleo essencial de *C. citratus*, em culturas de células PC-3;
- Avaliar o efeito da incubação isolada do óleo essencial, em função do tempo de incubação e da concentração, sobre a viabilidade celular de linhagem de células PC-3;
- Avaliar os efeitos do óleo essencial sobre as modificações no ciclo celular e no processo de morte celular em linhagem de células PC-3.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Um total de 3100 g de folhas frescas de *Cymbopogon citratus* foram coletadas de uma horta comercial localizada na Vila da Penha, Rio de Janeiro, em maio de 2015 às 7:00h.

### 4.2 AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

#### 4.2.1 Obtenção da fração volátil

A extração do óleo essencial foi realizada na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, por meio de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger (KORENBLUM *et al*, 2013; SANTIN *et al*, 2009). A obtenção do óleo foi feita utilizando 31 amostras de 100 g de folhas frescas da planta. Cada amostra foi acondicionada em balões de 500 mL juntamente com água destilada, que foram submetidos à ebulição por 1 hora. Decorrido esse tempo, coletou-se o óleo essencial, onde se adicionou sulfato de sódio para remover a água presente. Em seguida, estocado sob proteção da luz e do calor para posteriores análises e ensaios biológicos e, calculado seu rendimento.

#### 4.2.2 Identificação dos constituintes do óleo essencial

A identificação dos constituintes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi realizada no Laboratório de Óleos Essenciais da EMBRAPA – Guaratiba/RJ por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Agilent 7890A, detector de massas Agilent 5975C sob as seguintes condições operacionais: temperatura do forno de 60 a 240°C, 3°C/minuto, em coluna Innowax (25m x 0.2mm x 0.2um), hélio como gás de arraste com vazão de 1,0

mL/min. O detector de massas foi operado em modo de ionização eletrônica em 70 eV. A composição percentual foi obtida por normalização do sinal TIC (cromatograma de íons totais). A amostra a ser analisada foi preparada adicionando-se 10 µL do óleo essencial *Cymbopogon citratus* em 1 mL de diclorometano. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros existentes no banco de dados do equipamento.

#### 4.3 ANÁLISE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do OEC foi determinada através da técnica de difusão em ágar (SILVEIRA *et al*, 2009; OSTROSKY, 2008). Foram utilizadas as seguintes concentrações do OEC obtido (v/v): 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%.

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) obtidos da FIOCRUZ/RJ. Para os controles positivo e negativo foram usados gentamicina e dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente.

As placas contendo ágar Mueller Hinton foram preparadas antecipadamente e retiradas da geladeira até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, cilindros de 5 mm de diâmetro foram inseridos na superfície da placa. O inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi adicionado em 100µL de meio ágar e em seguida, distribuído uniformemente sobre a superfície da placa contendo ágar e os cilindros, deixadas em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente 3 minutos e posteriormente os cilindros foram retirados afim de se formar os poços, nos quais foi possível a aplicação das amostras analisadas. Dispensou-se em cada poço devidamente identificado, 30µL dos controles positivo e negativo, assim como cada concentração do OEC (12,5%; 25%; 50%; 75% e 100%), utilizando uma pipeta automática. As placas foram incubadas em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. O resultado foi avaliado através da medição em milímetros do halo de inibição de crescimento, utilizando régua milimetrada, partindo-se da circunferência do poço, até a margem onde há o crescimento de microrganismos. Os testes foram realizados em duplicata.

De acordo com a dimensão do halo os microrganismos foram classificados como: susceptíveis, intermediários ou resistentes (tabela 4) (CLSI, 2015).

Tabela 6: Classificação dos microrganismos de acordo com o halo de inibição (mm)

Cepa padrão	Antibiótico	Classificação de acordo com o halo de inibição (mm)		
		Susceptível	Intermediário	Resistente
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Gentamicina	$\geq 15$	3 - 14	$\leq 2$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gentamicina			

Fonte: Adaptado de CLSI, 2015.

#### 4.4 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.4.1 Atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH

O método DPPH, adaptado por Sánchez-Moreno (2002), é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (figura 5) por compostos com atividade antioxidante, através do decréscimo da absorbância a 515 nm.

A solução de DPPH foi preparada com 2,4mg de DPPH para 100mL de metanol. O volume da solução de DPPH e da amostra é variado sendo sempre o valor total de 3000  $\mu$ L, as concentrações podem ser vistas na tabela 5. A amostra foi colocada em ambiente escuro durante 30 minutos antes da leitura, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 515nm.

Tabela 7: Volumes aplicados para a amostra

<b>Amostra (µL)</b>	<b>Metanol (µL)</b>	<b>DPPH (µL)</b>	<b>Volume final (µL)</b>
<b>100</b>	100	2800	3000
<b>50</b>	150	2800	3000
<b>25</b>	175	2800	3000

A porcentagem de DPPH remanescente será calculada da seguinte forma: % de DPPH remanescente =  $100 \times [\text{DPPH}]_{\text{remanescente}} / [\text{DPPH}]_{\text{inicial}}$ .

#### 4.4.2 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996), com modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzir, em meio ácido (pH=3,6), o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar  $\text{Fe}^{2+}$ , de intensa cor azul.

O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de tampão acetato (300 nM, pH 3,6), TPTZ (10mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,0 ml de  $\text{FeCl}_3$  (20mM) em solução aquosa. Para realização do ensaio, a amostra foi diluída em metanol (v/v) e lida em diferentes concentrações, que pode ser visualizado na tabela 6. Posteriormente a absorbância dos tubos foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 734 nm, em triplicata. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (500 - 1500 µM) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{molFe}^{2+}/\mu\text{L}$  óleo.

Tabela 8: Volumes aplicados para a amostra

<b>Amostra (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Metanol (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Água (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volume final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>100</b>	100	100	2700	3000
<b>50</b>	50	200	2700	3000
<b>25</b>	25	250	2700	3000

#### 4.4.3 Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS•+

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi utilizado como descrito por Rufino *et al.* (2007). O radical ABTS•+ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado, o radical ABTS•+ é diluído em etanol até obter uma medida de absorvância de 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes das amostras de óleo essencial de *C. citratus* foram utilizadas de modo a restar um volume final de 3ml em cada leitura. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão com soluções de Trolox foi produzida.

Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em  $\mu\text{mol}$  de trolox por grama de amostra.

## 4.5 ENSAIO CELULAR

### 4.5.1 Cultura de células e protocolo de tratamento

A linhagem celular de câncer de próstata humana com metástase em osso (PC-3) foi obtida a partir do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cultivada em meio Dulbecco's e meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 2 g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Para cada experimento, todas as células foram plaqueadas em concentração de  $10^4$

células/cm<sup>2</sup> em placas de 6 e 96 poços, para análises de ciclo celular e proliferação celular, respectivamente. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e as células sofreram incubações com diferentes concentrações de óleo essencial de *C. citratus* previamente dissolvidos em DMSO (1:1). Células não tratadas foram incluídas em cada placa. As células foram então incubadas por 24 horas.

#### 4.5.2 Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Foram plaqueadas  $1,0 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *C. citratus*, que variavam de 0,5 a 500 µg/mL. Após 24 h e 48 h de incubação, foram adicionados 10 µL de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (Bio-Rad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula:  $CPIR = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$ .

#### 4.5.3 Ensaio de Ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução fria de Vindelov (Vindelov, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 µg/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos.

As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de fase G0-G1 (2n), fase S (fase > 2n mas < 4n), e fase G2/M (4n) foram adquiridos e analisados utilizando FlowJo. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com EXPO32 software de análise V1.2.

#### 4.5.4 Ensaio de Apoptose

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspendidas em 400 µL de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5 µL de anexina V FITC e 5 µL de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos e, os dados analisados em software FlowJo.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados serão médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 e Statistical 6.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. citratus*

A obtenção do OEC foi feita através do processo de hidrodestilação e o seu rendimento foi de 0,39% em relação à matéria seca do produto, apresentando uma densidade de 0,868 g/mL e volume total de 9,82 mL obtidos a partir de 3100 g de amostra da planta fresca.

Este trabalho forneceu subsídios importantes que demonstraram o potencial do OEC. Inicialmente foi observado um rendimento de 0,39 %, sendo este valor semelhante ao descrito por Costa *et al* (2011) de 0,46 %, mas essa diferença pode ser explicada devido aos diversos fatores que influenciam no seu rendimento, como solo, temperatura, armazenamento e transporte da planta, método de extração, condições da colheita, material vegetal utilizado (folhas frescas ou secas) entre outros (GOMES & NEGRELLE, 2015; HANAA *et al*, 2012).

O OEC obtido teve um total de 26 compostos detectados (anexo A), dentre eles, 4 se destacam como compostos majoritários: geranial (42,10%), neral (33,41%), mirceno (13,49%) e geraniol (3,01%), representando 92,02% dos compostos da amostra (tabela 9). O neral e geranial são isômeros citral, que somados compõem 75,516% do óleo essencial.

Tabela 9: Composição do OEC por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Componente	% do total (concentração)
1	4,260	Mirceno	13,497
16	20,529	Neral	33,410
17	22,484	Geranial	42,106
22	26,720	Geraniol	3,012
		Subtotal	92,025
		Compostos minoritários	5,528
		Não-identificados	2,451
		Total	100

Essas diferentes variáveis também exercem influência sobre a composição do óleo essencial. Os compostos majoritários identificados neste trabalho estão de acordo com outras investigações, onde a concentração de cada composto majoritário encontrado no OEC varia muito, para o composto geranial variaram de 34,4 a 51,46%, para o neral de 19,83 a 37,42%, para o mirceno de 9,47 a 16,5 % e geraniol de 1,28 a 21,17% (tabela 10). Os percentuais identificados dos compostos de maior importância do óleo essencial de *C. citratus* encontrados nesse trabalho são equivalentes aos encontrados por Ribeiro *et al* (2015) e Poonpaiboonpipata (2013).

Tabela 10: Porcentagem dos compostos majoritários no OE de capim-limão

Compostos de Importância	OE analisado	Literatura	Referências
Geranial ( $\alpha$ -citral)	42,106	(34,4 – 51,46)	AHMAD & VILJOEN, 2015; BASSOLÉA et al. 2011; BIDINOTO et al., 2011; BLANCO et al., 2009; COSTA et al., 2011; NEGRELLE & GOMES, 2007; LEIMANN et al, 2009; OCHENG et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVERO-VERBEL et al, 2010; POONPAIBOONPIPATA et al., 2013; RIBEIRO et al, 2015; SILVA et al., 2010; TAK et al., 2016.
Neral ( $\beta$ -citral)	33,410	(19,83 – 37,42)	
Mirceno ( $\beta$ -myrcene)	13,497	(9,47 – 16,5)	
Geraniol	3,012	(1,28 – 21,17)	

Valeriano *et al* (2012) encontraram uma composição de óleo essencial de *C. citratus* bem diferente qualitativamente quanto aos seus componentes, onde o OEC avaliado por eles apresentou uma composição de 65,55% de citral, 4,21% de linalol 2,53% de mirceno.

Nguefak *et al* (2012) analisaram óleo essencial de *Cymbopogon citratus* a partir de folhas secas e sua composição se mostrou bem diferente da avaliada neste trabalho utilizando folhas frescas, assim como seu rendimento (0,8%). Apresentaram como componentes majoritários, o neral (21,2%), geranial (37,7%) enquanto que o mirceno encontrado foi de apenas 2,5% e o geraniol de 0,5%, valores bem abaixo da média encontrada na tabela 10.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO PODER ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do óleo essencial de capim-limão foi avaliada por três diferentes métodos (DPPH, FRAP e ABTS), conforme descrito no item 4.4. Os resultados dos ensaios de DPPH, FRAP e ABTS foram realizados em triplicata e estão apresentados na figura 4.

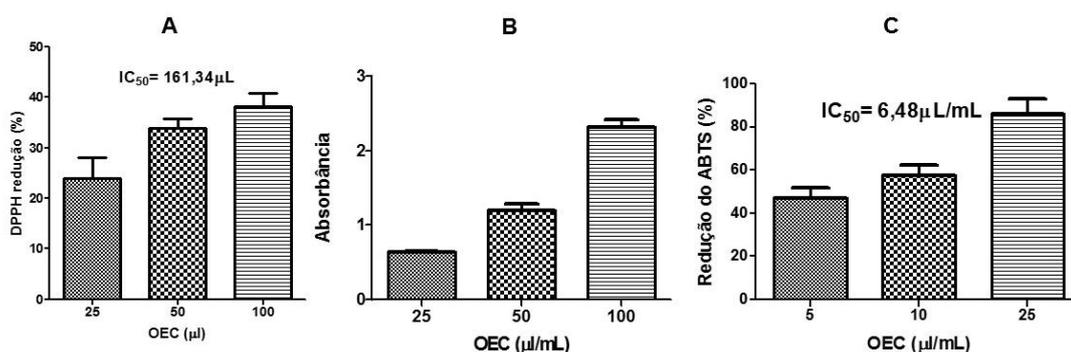


Figura 4: Atividade antioxidante pelo método de DPPH (A), FRAP (B) e ABTS (C) do OEC.

Os resultados observados nos três ensaios apresentaram uma atividade antioxidante de acordo com o aumento de concentração da amostra utilizada na análise.

O resultado do DPPH foi expresso em percentual de inibição do radical com desvio padrão, demonstrando valores percentuais médios de  $23,93 \pm 4,18$ ,  $33,98 \pm 1,78$  e  $38,15 \pm 2,6$  para os valores de 25, 50 e 100 µL OEC respectivamente, além de  $IC_{50}$  de 161,34 µL/mL (figura 5A), onde  $IC_{50}$  representa o valor de concentração a fim de reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH.

Na análise de redução do ferro pelo método FRAP (Figura 5B), observamos os valores de absorbância de 0,63, 1,19 e 2,32 para 25, 50 e 100 µL OEC respectivamente.

Os resultados observados pelo método ABTS (Figura 5C) apresentaram uma redução (%) de 47,04, 57,01 e 86,93 para as concentrações de OEC em 5, 10 e 25 µL/mL respectivamente e valor de  $IC_{50}$  de 6,48 µL/mL.

Quanto a análise da atividade antioxidante o OEC apresentou maiores valores para o método ABTS seguido do FRAP e DPPH, com os respectivos valores de  $83,48 \pm 7,21$  µMol trolox/µL óleo,  $28,25 \pm 0,28$  µMol sulfato ferroso/µL óleo e  $12,58 \pm 2,76$  µMol trolox/µL óleo (tabela 11).

Tabela 11: Valor da Atividade Antioxidante do OEC para os métodos de DPPH, ABTS e FRAP

<b>Análise da Atividade antioxidante</b>	<b>Resultados</b>
DPPH ( $\mu\text{mol trolox}/\mu\text{L}$ óleo)	12,58 $\pm$ 2,76
ABTS ( $\mu\text{mol trolox}/\mu\text{L}$ óleo)	83,48 $\pm$ 7,21
FRAP ( $\mu\text{mol sulfato ferroso}/\mu\text{L}$ óleo)	28,25 $\pm$ 0,28

As diferenças observadas em relação à atividade antioxidante dos compostos nos métodos utilizados também foram observadas por Costa *et al* (2016) e pode ser atribuído à estrutura química da amostra, bem como as características de cada método.

Em estudos envolvendo óleos essenciais, os óleos de *Cananga odorata*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Curcuma longa* apresentaram uma redução do DPPH excelente, entre 63,8  $\pm$  0,45% e 59,6  $\pm$  0,42%, quando comparados ao óleo essencial de referência *Tymus vulgaris* (75,6  $\pm$  0,53%) obtiveram valores bem aproximados, além de serem mais de 2 vezes maior que o valor de Trolox apresentado (28,2  $\pm$  0,20%) (SACCHETTI *et al*, 2005). Jirovetz *et al* (2006) encontraram uma alta atividade antioxidante para óleo essencial de folhas de cravo, com valores IC<sub>50</sub> de 0,08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e inibição de até 91,02%.

Patra *et al* (2016) encontraram para  $\alpha$ -tocoferol um valor de IC<sub>50</sub> de 26,63  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para o método ABTS, comparando com o valor de IC<sub>50</sub> de 6,48  $\mu\text{L}/\text{mL}$  encontrado para o OEC e com uma redução de 86% para a concentração de 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , o OEC demonstrou uma atividade antioxidante superior a um potente antioxidante já conhecido na literatura.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A figura 5 demonstra o resultado da aplicação do óleo essencial sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, onde se observa um efeito positivo sobre *S. aureus* e um efeito negativo sobre *E. coli*. Onde para o *S. aureus* demonstrou efeito sob todas

as concentrações estudadas enquanto a *E. coli* não houve efeito algum para nenhuma das concentrações.

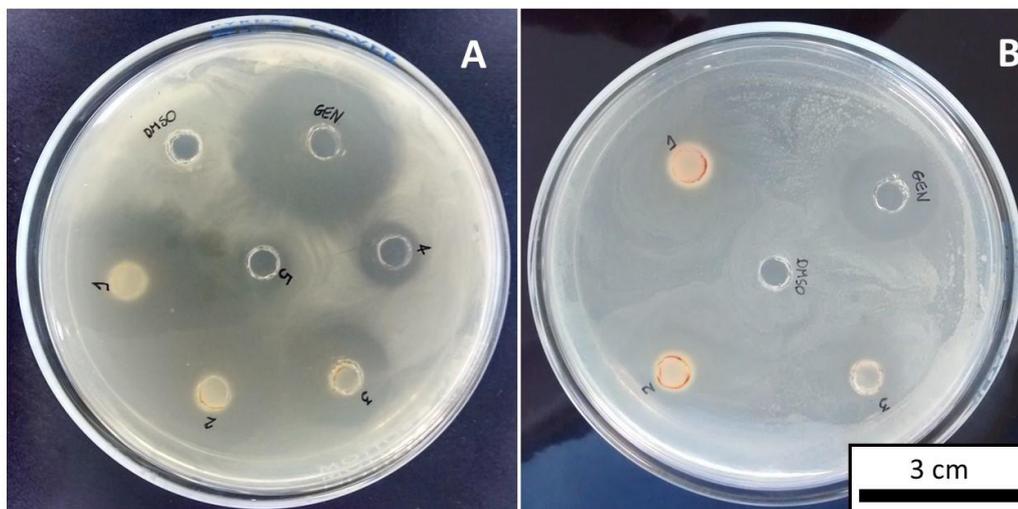


Figura 5: Efeito da aplicação do OEC sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (A) e *Escherichia coli* (B). DMSO = dimetilsulfóxido; GEN = gentamicina; Concentração do óleo representada em números, onde: 1= 100%; 2 = 75%; 3 = 50%; 4 = 25%;

*S. aureus* apresentou susceptibilidade ao OEC de acordo com a CLSI, com os halos  $\geq 15$  mm para todas as concentrações testadas (100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%). Para as concentrações de 25 % e 12,5% os valores dos halos de inibição foi o mesmo, havendo necessidade de se testar concentrações ainda menores e observar se há uma resposta dose dependente. Enquanto que a *E. coli* não apresentou formação de halo, se mostrando resistente ao OEC, de acordo com a CLSI ( $\leq 2$  mm) (tabela 12).

Tabela 12: Diâmetro dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus* frente aos microrganismos testados

Microrganismos	Concentração do inoculo (CFU/mL)	Diâmetro da Zona de Inibição (mm)						
		Gentamicina	DMSO	100 %	75 %	50 %	25 %	12,5 %
Gram <sup>+</sup>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	29	0	29	21	21	15	15
Gram <sup>-</sup>								
<i>Escherichia coli</i>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	16	0	0	0	0	0	0

Aiemsaaard *et al* (2011) determinaram a composição do OEC, onde demonstrou similaridade, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Eles avaliaram a susceptibilidade do OEC assim como seus compostos majoritários para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Somente o óleo se mostrou bactericida contra todas as bactérias testadas. Citral e geraniol foram bacteriostáticos e bactericidas em diferentes concentrações para *S. aureus* e bactericida para as demais bactérias. Isso confirma o sinergismo entre os compostos presentes no OEC. Os óleos essenciais têm uma maior atividade antibacteriana quando comparado com seus constituintes isolados, sugerindo que os compostos presentes em quantidades inferiores possam exercer um efeito sinérgico ou potencializador de sua ação, assim como combinado a outros óleos essenciais (BURT, 2004). O citral isolado também demonstrou atividade antibacteriana para cinco cepas de *E. coli* O157:H7 (944, 932, 380, HI 730 e ATCC 35150) (SHI *et al*, 2016).

O citral isolado demonstrou ser efetivo para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella paratyphi* e *Shigella flexneri*, enquanto que o composto isolado mirceno não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana a esses microrganismos testados, reforçando o conceito de atribuição ao citral das atividades biológicas do OEC (SHAH *et al*, 2011). Neste estudo o *S. aureus* foi susceptível ao OEC, com um halo de inibição igual ao do antibiótico utilizado como controle positivo, enquanto que a *E. coli* se mostrou ser resistente ao óleo essencial,

em acordo com a maior susceptibilidade de bactérias gram-positivas, que gram-negativas, aos óleos essenciais.

Nguefak *et al* (2012) também demonstraram que o OEC teve efeito sinérgico aos OE de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* para um efeito positivo em fungos, onde os compostos de cada um deles é responsável por ações diferentes no microrganismo, mas que juntos trabalham de forma sinérgica, diminuindo a quantidade de OE necessária para um efeito antimicrobiano.

Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis à ação antibacteriana dos óleos essenciais, que as bactérias gram-negativas. Isso porque as bactérias gram-negativas possuem uma membrana exterior em torno da parede da célula, com uma estrutura mais complexa do que as bactérias gram-positivas, o que limita a difusão dos compostos hidrofóbicos em sua cobertura de lipopolissacarídeos. O efeito antimicrobiano dos OEs vem sendo amplamente estudado, mas ainda assim seu mecanismo de ação ainda não está elucidado. Muitos mecanismos têm sido referidos à ação de seus compostos químicos (BURT, 2004). A hidrofobicidade característica dos OEs é importante, permitindo que eles separem os lipídios da membrana celular, tornando a célula mais permeável. Essa interação resulta em uma maior inibição de algumas gram-positivas e gram-negativas (CALO *et al*, 2015).

Estudos de susceptibilidade microbiana utilizando óleos essenciais de mesma planta apresentam resultados pouco conclusivos, onde alguns óleos podem ter uma maior ação em bactérias gram-negativas do que em gram-positivas ou vice-versa. Isso pode ocorrer devido à variedade na composição dos óleos essenciais (ZHANG *et al*, 2016).

Prabuseenivasan *et al* (2006), avaliaram o efeito antimicrobiano de 21 óleos essenciais frente a 4 bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* – ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* – ATCC 15380; *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC – 27853; *Proteus vulgaris* – MTCC – 1771) e 2 bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* – MTCC 441; *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923), utilizando o método de disco-difusão. Dentre os 21 óleos testados, 19 apresentaram atividade em uma ou mais bactérias. Tanto bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas foram sensíveis aos óleos essenciais. *P. aeruginosa* e *P. vulgaris* foram inibidas por 19 óleos, seguidos de *B. subtilis* (18 OE), *S. aureus* (14 OE), *E. coli* (12 OE) e *K.*

*pneumoniae* (9 OE). Em especial o OEC apresentou atividade para *S. aureus* (halo de 11,4 mm), *B. subtilis* (halo de 16,7 mm), *K. pneumoniae* (halo de 8,9 mm), *P. vulgaris* (halo de 14,6 mm), *P. aeruginosa* (halo de 23,4 mm), enquanto que para a *E. coli* não houve nenhuma formação de halo para nenhuma das concentrações testadas, em acordo com o presente estudo. As cepas padrão utilizadas por eles foram as mesmas testadas neste trabalho: 25922 (*E.coli*) e 25923 (*S. aureus*) e obtiveram o mesmo resultado negativo para atividade em *E. coli* e positivo para *S. aureus*, sendo este apresentando um halo menor do que o encontrado neste estudo, de 21 mm, na mesma concentração (50%).

## 5.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA

### 5.5.1 Ensaio sobre a viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT foi utilizado para monitorar a viabilidade celular, onde as células de câncer de próstata (PC-3) foram incubadas com concentrações de 500 a 5 µg/mL de óleo essencial e, analisadas durante os períodos de 24 e 48 após o início do tratamento.

Pode ser observado que o óleo essencial de capim-limão modificou o perfil de crescimento celular após 24 e 48 horas de tratamento (figura 6). O período de 48 horas houve uma maior redução no percentual das células comparando com o período de 24 horas.

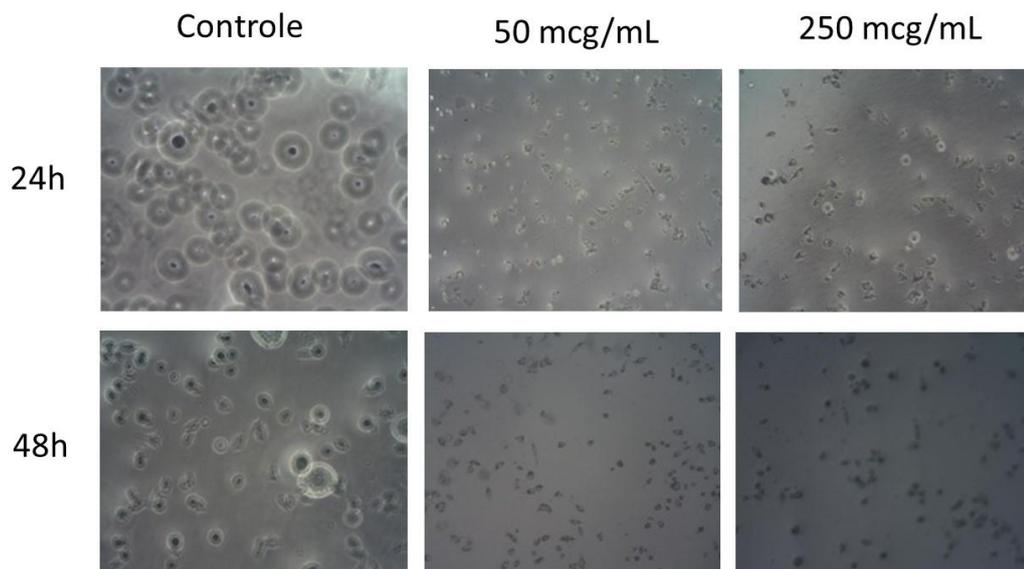


Figura 6: Efeitos do óleo essencial de capim-limão sobre a viabilidade celular da linhagem PC-3 após 24 horas e 48 horas de tratamento. Células PC-3 visualizadas em microscópio não tratadas (Controle) e após tratamento em duas concentrações do OEC

Após 24 horas, o tratamento com o óleo apresentou diminuição da viabilidade celular comparando com o controle, não havendo diferença estatística entre as doses utilizadas ( $p < 0,01$ ). Mesmo com doses muito baixas ( $0,5 \mu\text{g/mL}$ ) o óleo promoveu uma inibição em torno de 50% (figura 7).

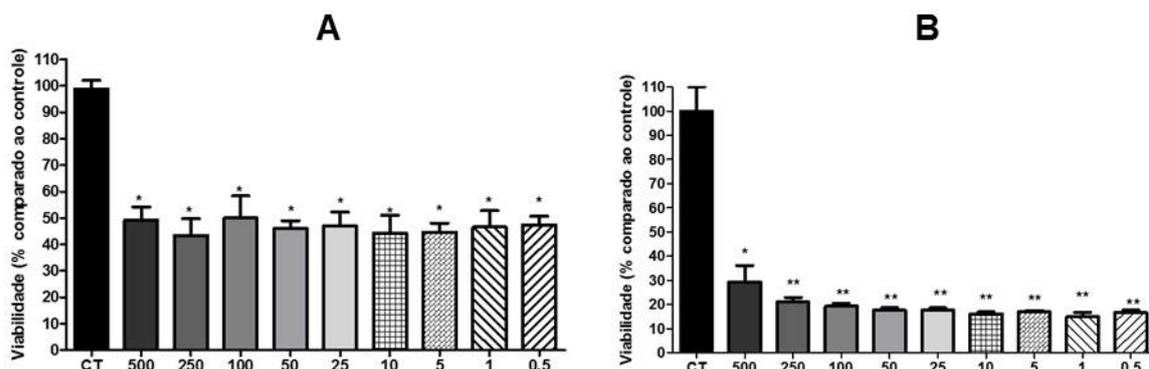


Figura 7. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre a viabilidade de células PC-3 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento em diferentes concentrações (CT = células não-tratadas e 0,5 – 500  $\mu\text{g/mL}$  de OEC). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

No período de 48 horas, a redução da viabilidade celular foi ainda maior que na observada em 24 horas. Para a dose de  $500 \mu\text{g/mL}$  utilizada, o óleo reduziu cerca de 70% da viabilidade celular na linhagem de câncer de próstata, quando

comparadas às células não tratadas (CT), já nas demais doses o óleo apresentou uma redução de cerca 80% comparando com o controle, sem diferença estatística entre elas ( $p < 0,01$ ) (figura 7).

Estes dados indicam que o óleo se mostrou um potente inibidor de crescimento para células de câncer de próstata humana, com resultados já nas primeiras 24 horas e ainda melhores em 48 horas após a incubação do óleo. No período de 48 horas observamos que uma resposta dose dependente, quando a dose de 500  $\mu\text{g/mL}$  apresentou diferença estatística nessa inibição do crescimento.

De acordo com os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, foi observado uma inibição na viabilidade celular utilizando concentrações de OEC de 5  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de 24 e 48 horas de tratamento, com inibição em torno de 50% e 80%, respectivamente. Se demonstrou uma potente redução da viabilidade celular mesmo em doses muito baixas (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) nas primeiras 24 horas, sendo ainda mais eficiente em 48 horas.

Poucos trabalhos com células de câncer de próstata humana foram realizados utilizando óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, fato que justifica a dificuldade em se comparar os resultados obtidos com a literatura. Entretanto, estudos demonstraram ação de óleos essenciais de outras plantas em linhagens celulares de câncer humano. Óleo essencial de *Pinus wallichina* (pinheiro) mostrou atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de leucemia (THP-1), câncer de pulmão (A-549), câncer de fígado (HEP-2), câncer de próstata (PC-3) e câncer de ovário (IGR-OV-1) (DAR *et al*, 2012). Óleo essencial de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) apresentou atividade citotóxica em linhagens celulares humanas de carcinoma de pulmão (SPC-A1), câncer gástrico (SGC-901) e leucemia (K562) (SUN *et al*, 2014). Com isso, os dados sugerem que o OEC possa desempenhar um papel de agente inibidor e preventivo na proliferação em células de câncer de próstata humana.

#### 5.5.2 Efeito do óleo essencial de capim-limão no ciclo celular e sobre a taxa de apoptose.

Com a finalidade de monitorar a influência do óleo essencial de capim-limão sobre o ciclo celular, as células em estudo foram tratadas nas concentrações 50

µg/mL e 250 µg/mL em 24 horas após incubação e, posteriormente, quantificadas quanto ao percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular. A linhagem PC-3 apresentou um aumento no percentual de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, seguido por uma diminuição no total de células presente na fase S e fase G<sub>2</sub>/M, quando tratada com as duas concentrações de OEC estabelecidas, após 24 horas de incubação (Figura 8).

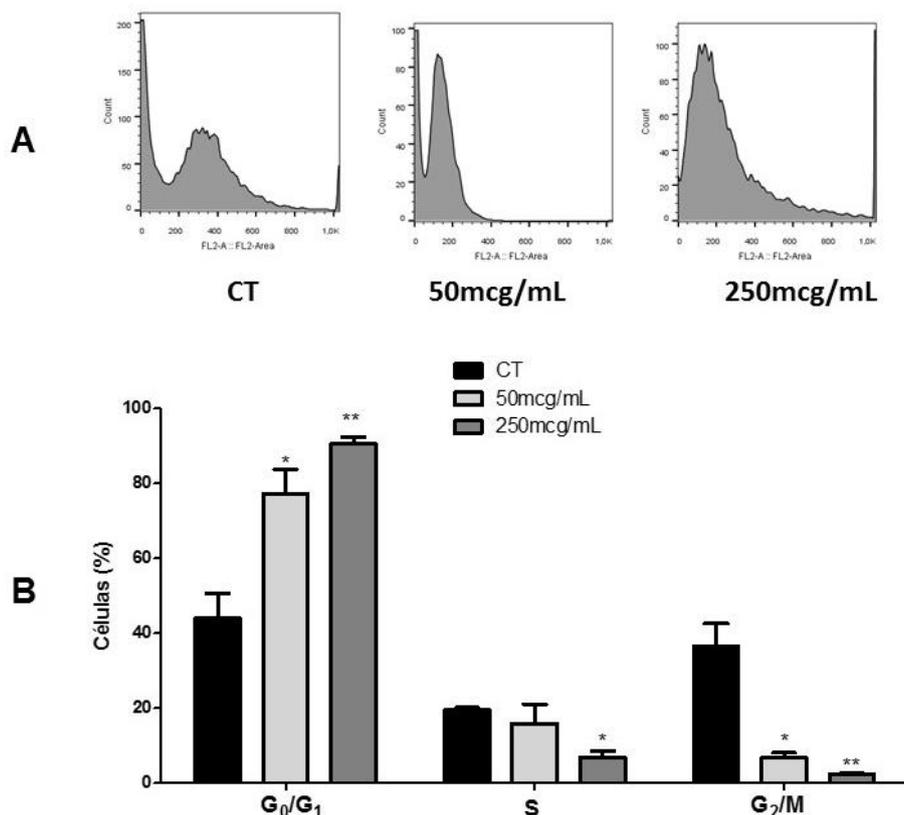


Figura 8: Efeito do OEC sobre a progressão do ciclo celular em célula PC-3 24 horas após o tratamento. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A, de acordo com a concentração do OEC. Os resultados quantitativos do efeito do OEC sobre esta linhagem celular são mostradas em B. O experimento é expresso em média ± desvio padrão, sendo diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com o OEC (50 e 250 µg/mL) \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

Para as fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>/M houve diferença estatística entre todas as células não tratadas e tratadas, enquanto que na fase S não houve diferença estatística entre o controle e o tratamento de 50 µg/mL, mas esses dois tratamentos apresentaram diferença estatística comparando com o tratamento de 250 µg/mL. Os valores na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> foram de 44,02 ± 6,67, 77,30 ± 6,41 e 90,55 ± 1,83, já na fase S foram 19,51 ± 0,58, 15,98 ± 5,05 e 6,93 ± 1,63 e na fase G<sub>2</sub>/M foram 36,46 ± 6,08,

6,72 ± 1,36 e 2,50 ± 0,19, para as células não tratadas, para as células tratadas com 50 µg/mL e 250 µg/mL de óleo, respectivamente.

Com esses resultados podemos observar que o óleo essencial de capim-limão está aumentando o percentual de células na fase G0/G1, diminuindo na fase S com a maior concentração de óleo utilizada e diminuindo também a fase G2/M, ou seja, ele não está deixando o ciclo progredir, impede a proliferação celular.

A quantificação do número de células mortas em processo apoptótico pode ser uma medida útil para avaliar a cinética de células cancerosas. A alteração do equilíbrio entre proliferação celular e morte por apoptose tem sido associado a tumorigênese. Neste ensaio, as células em estudo (PC-3) foram incubadas com óleo essencial de capim-limão (50 µg/mL e 250 µg/mL) durante 24 horas.

Podemos observar os dados sobre a influência do OEC no processo de apoptose na linhagem celular de carcinoma de próstata humana na figura 9 e na tabela 13. O OEC não promoveu diminuição nas células viáveis e nem aumento do percentual de células em apoptose tardia, não havendo diferença estatística entre os três tratamentos (controle, 50 µg/mL e 250 µg/mL). O mesmo ocorre para o percentual de células na apoptose inicial e em células não apoptóticas, não há diferença estatística entre o controle e os tratamentos com OEC.

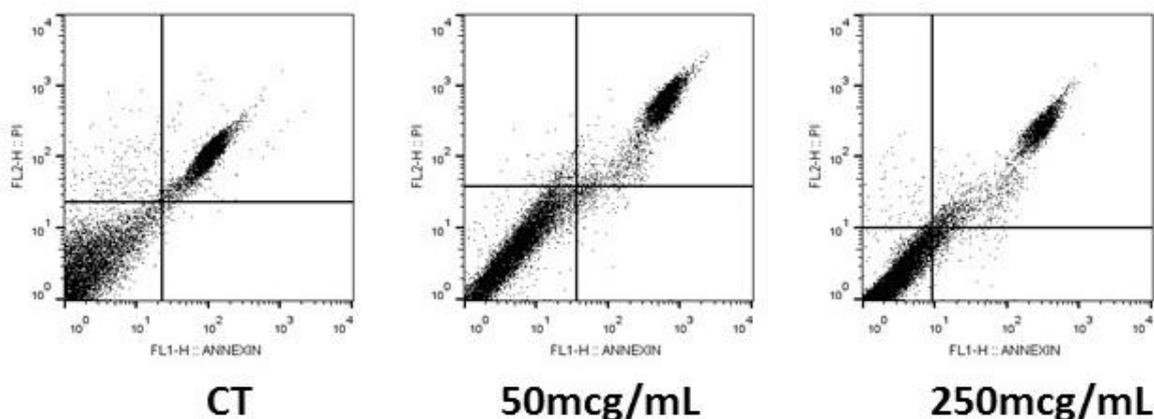


Figura 9: Taxa de aumento relativo de apoptose na linhagem PC-3 tratadas com OEC após 24 horas de tratamento.

Tabela 13: Efeito do óleo essencial de capim-limão (50 e 250 µg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de câncer de próstata após 24 horas de incubação

Fases do processo de morte celular	CT	50 µg/mL	250 µg/mL
Células viáveis (Anexina V- PI -)	66,1 ± 0,42 <sup>a</sup>	71,6 ± 6,78 <sup>a</sup>	73,85 ± 7,70 <sup>a</sup>
Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,57 ± 0,47 <sup>a</sup>	2,32 ± 1,07 <sup>a</sup>	1,35 ± 1,03 <sup>a</sup>
Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	32,2 ± 0,42 <sup>a</sup>	24,8 ± 7,91 <sup>a</sup>	22,85 ± 7,28 <sup>a</sup>
Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,15 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,92 ± 1,36 <sup>a</sup>

Um estudo de Shi *et al* (2016) demonstrou que o composto citral apresentou baixa citotoxicidade em células L-02 (hepatócitos) normais e inibiu as células HepG2 (linhagem celular de câncer de fígado humano) de forma dose-dependente. Soares *et al* (2014) demonstraram que o licopeno inibiu a proliferação celular, promoveu a parada do ciclo celular e aumentou a apoptose em células de câncer de próstata, apresentando um efeito protetor no câncer de próstata.

A perda de controle do ciclo celular normal desempenha um papel importante no surgimento da maioria dos cânceres. A progressão celular do ciclo é um processo altamente ordenado e bem organizado que envolve várias etapas. Na fase G0 não há replicação de célula, nesta fase o DNA apresenta baixa atividade. Na fase G1 há a preparação da célula para a sua multiplicação e preparação para a síntese de DNA na fase S. Durante a fase G1 e S existem diversos mecanismos de regulação para a multiplicação celular, dentre eles, a apoptose (morte celular programada), que provoca a morte da célula, antes que sofra alteração, podendo levar ao câncer. A transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular constitui um compromisso irreversível com a síntese de DNA e proliferação. Na fase G2 há a síntese de componentes para a mitose, que ocorrerá na fase M. Após isso as células se separam, finalizando o ciclo e retornando à fase G0. A célula tumoral não finaliza esse ciclo de replicação celular e passa da fase para a nova fase G1 (ALMEIDA *et al*, 2005; PARK *et al*, 2016. Apesar dos ensaios de apoptose demonstrarem que o OEC não foi capaz de promover morte por apoptose comparados ao grupo controle, o OEC demonstrou aumento da proporção de células em fase G0/G1 e reduziu o

total de células presente nas fases S e G2/M, 24 horas pós-tratamento. Estes dados, sugerem uma parada de ciclo celular em fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a composição química dos compostos majoritários presentes no OEC, de acordo com outros autores, assim como demonstrou atividade antioxidante em todas as análises (DPPH, FRAP e ABTS) e atividade antibacteriana para a cepa de *Staphylococcus aureus*. Pode-se observar a capacidade do OEC em inibir a proliferação celular, promover a parada do ciclo celular, mas não induzir à apoptose em células cancerosas de câncer de próstata humana, sugerindo a utilização do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como um adjuvante ao tratamento quimioterápico.

A detecção de compostos não-identificados e minoritários encontrados no OEC abrem possibilidade para estudos futuros sobre o mecanismo de ação dessas moléculas em bactérias patogênicas e nas células tumorais. Para isso é importante investigar sua possível ação biológica de forma isolada ou sinérgica aos compostos majoritários assim como os mecanismos inibitórios específicos em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estudos complementares do OEC quanto à atividade citotóxica, investigando seu efeito sobre o ciclo celular e apoptose e mecanismos de ação envolvidos, utilizando diferentes concentrações e períodos em outras linhagens celulares são fundamentais para elucidação de sua possível proteção no processo de tumorigênese, assim como avaliar a citotoxicidade do OEC nas quantidades de IC<sub>50</sub> encontradas.

## 7 REFERÊNCIAS

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407–426, 2010.

AHMAD, A; VILJOEN, A. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemongrass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, p. 657–665, 2015.

AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 31-37, 2011.

ALMEIDA, V.L; LEITÃO, A; REINA, L.D.C.B; MONTANARI, C.A; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IADOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BHALLA, Y.; GUPTA, V.K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3643–3653, 2013.

BASSOLÉA, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; OBAME, L. C.; ILBOUDO, A. J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIE, R. C.; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1070-1074, 2011.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BIDINOTTO, L. T.; COSTA, C. A. R. A.; SALVADORI, D. M. F.; COSTA, M.; RODRIGUES, M. A. M.; BARBISAN, L. F. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 536–544, 2011.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS JR, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 265–270, 2009.

BOUKHATEM, M.N.; FERHAT, M.A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H.T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, p. 25431, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223– 253, 2004.

CALO, J.R.; CRANDALL, P.G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARMO, E.S.; CAVALCANTE, N.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, F.O.; GAYOSO, C.W. Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf – therapeutic pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 381-5, 2013.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack, capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. **Porto Alegre: FEPAGRO**, 2003. 31 p. (Boletim FEPAGRO, 11).

COSTA, C. A. R. A.; BIDINOTTO, L. T.; TAKAHIRA, R. K.; SALVADORI, M. F. D.; BARBISAN, L. F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2268–2272, 2011.

COSTA, G; GRANGEIA, H; FIGUEIRINHA, A; FIGUEIREDO, I.V; BATISTA, M.T. Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 738–745, 2016.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015.

DAMIÃO, R.; FIGUEIREDO, R.T.; DORNAS, M.C.; LIMA, D.S.; KOSCHORKE, M.A.B. Hospital Universitário Pedro Ernesto, v. 14, suplemento 1, 2015.

DAR, M.Y; SHAH, W.A; MUBASHIR, S; RATHER, M.A. Chromatographic analysis, anti-proliferative and radical scavenging activity of *Pinus wallichina* essential oil growing in high altitude areas of Kashmir, India. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1228–1233, 2012.

FLOEGEL, A; KIM, D; CHUNG, S; KOO, S.I; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M.R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 34– 48, 2012.

GBENOU, J.D.; AHOUNOU, J.F.; AKAKPO, H.B.; LALEYE, A.; YAYI, E.; GBAGUIDI, F.; BABA-MOUSSA, L.; DARBOUX, R.; DANSOU, P.; MOUDACHIROU, M.; KOTCHONI, S.O. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 1127–1134, 2013.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.2, p. 201-209, 2015.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2003.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p. 80-92, 2007.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B.; FILHO, L.D. Caracterização da produção de capim-limão no estado do Paraná, Brasil. **Scientia Agraria**, v.8, n.4, p.385-390, 2007

GORNEMANN, T.; NAYAL, R.; PERTZ, H.H.; MELZIG, M.F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 166–169, 2008.

HALABI, M.F.; SHEIKH, B.Y. Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 906239, 8 pages, 2014.

HANAA, A.R.M; SALLAM, Y.I; EL-LEITHY, A.S; ALY, S.E. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. **Annals of Agricultural Science**, v. 57, n. 2, p. 113-116, 2012.

HAZZIT, M; BAALIOUAMER, A; FALEIRO, M.L; MIGUEL, M.G. Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 54, p. 6314–6321, 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acessado em: 12/02/2015 às 03:18h.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. ABC do

Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2. ed. rev. e atual. – Rio de Janeiro: **INCA** (2012) 129 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 317-32, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>> Acesso em: 26/10/2016.

JIROVETZ, L; BUCHBAUER, G; STOILOVA, I; STOYANOVA, A; KRASTANOV, A; SCHMIDT, E. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6303–6307, 2006.

KORENBLUM, E.; GOULART, F.R.V.; RODRIGUES, I.A.; ABREU, F.; LINS, ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; VALONI, E.; SEBASTIAN, G.V.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; SELDIN, L. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, v.3, n. 44, 2013.

LEIMANN, F. L; GONÇALVES, O. H; MACHADO, R. A. F; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 430–436, 2009.

LESAGE-MEESSEN, L.; BOU, M.; SIGOILLOT, J.; FAULDS, C.B.; LOMASCOLO. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, p. 3375–3385, 2015.

LIANG, C; WANG, M; SIMON, J.E; HO, C. Antioxidant activity of plant extracts on the inhibition of citral off-odor formation. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 48, p. 308 – 317, 2004.

MEDEIROS, A.P; MENEZES, M.F; NAPOLEÃO, A.A. Fatores de risco e medidas de prevenção do câncer de próstata: subsídios para a enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.64, n. 2, p. 385-8, 2011.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, article ID 365359, 14 pages, 2011.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAIK, M.I.; FOMDA, B.A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 535-538, 2010.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n.1, p.80-92, 2007.

NGUEFAK, J; TAMGUE, O; DONGMO, J.B.L; DAKOLE, C.D; LETH, V; VISMER, H.F; ZOLLO, P.H.A; NKENGFAK, A.E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, p. 377-383, 2012.

OCHENG, F; BWANGA, F; JOLOBA, M; SOFTRATA, A; AZEEM, M; PUTSEP, K; BORG-KARLSON, A; OBUA, C; GUSTAFSSON, A. Essential Oils from Ugandan Aromatic Medicinal Plants: Chemical Composition and Growth Inhibitory Effects on Oral Pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, article ID 230832, 10 pages, 2015.

OLIVEIRA, V. C. S; MOURA, D. M. S; LOPES, J. A. D; ANDRADE, P. P; SILVA, N. H; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Lippia sidoides* Cham. and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053–1059, 2009.

OLIVERO-VERBEL, J; NERIO, L. S; STASHENKO, E. E. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. **Society of Chemical Industry**, v. 66, p. 664-668, 2010.

OSTROSKY, E.A; MIZUMOTO, M.K; LIMA, M.E.L; KANEKO, T.M; NISHIKAWA, S.O; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARK, C; JEONG, J; JEONG, J; KIM, Y; KIM, G; HONG, S; CHOI, Y.H. Ethanol extract of *Kalopanax septemlobus* leaf inhibits HepG2 human hepatocellular carcinoma cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G1 phase. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 344–350, 2016.

PATRA, J.K.; LEE, S.; PARK, J.E.G; BAEK, K. Antioxidant and antibacterial properties of essential oil extracted from an edible seaweed *Undaria pinnatifida*. **Journal of Food Biochemistry**, 2016.

POONPAIBOONPIPATA, T; PANGNAKORN, U; SUVUNNAMEK, U; TEERARAK, M; CHAROENYING, P; LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from

*Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 403– 407, 2013.

PRABUSEENIVASAN, S; JAYAKUMAR, M; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. (2006) **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 39-46, 2006.

PRIOR ET AL. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3273–3279, 2003.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RHODEN, E.L; AWERBECK, M.A. Câncer de próstata localizado. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n.1, p.92-99, 2010.

RIBEIRO, F.W.M; LAURENTINO, L.S; ALVES, C.R; BASTOS, M.S.R; COSTA, J.M.C; CANUTO, K.M; FURTADO, R.F. Chemical Modification of Gum Arabic and Its Application in the Encapsulation of *Cymbopogon citratus* Essential Oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 8, 2015.

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**. EMBRAPA, v. 127, p. 1-4, 2007.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SANTIN, M.R.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FERREIRA, I.C.P.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major componente (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1489–1496, 2009.

SANTOS, A; PADUAN, R.H; GAZIN, Z.C; JACOMASSI, E; D'OLIVEIRA, S; CORTEZ, D.A.G; CORTEZ, L.E.R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 436-441, 2009.

SHAH, G; SHRI, R; PANCHAL, V; SHARMA, N; SINGH, B; MANN, A.S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemongrass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 1, p. 3-8, 2011.

SHARP, V.J.; TAKACS, E.B.; POWELL, C.R. Prostatitis: Diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 82, n. 4, 2010.

SHI, C; ZHAO, X; LIU, Z; MENG, R; CHEN, X; GUO, N. Antimicrobial, antioxidant, and antitumor activity of epsilon-poly-L-lysine and citral, alone or in combination. : **Food & Nutrition Research**, v. 60, 2016

SILVA, M. R; XIMENES, R. M; COSTA, J. G. M; LEAL, L. K. A. M; LOPES, A. A; VIANA, G. S. B. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 381, p. 415–426, 2010.

SILVA, S.L; FIGUEIREDO, P.M; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 281 – 286, 2007.

SILVEIRA, L.M.S; OLEA, R.S.G; MESQUITA, J.S; CRUZ, A.L.N; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SOARES, N.C.P; TEODORO, A.J; OLIVEIRA, F.L; TAKIYA, C.M; JUNIOR, A.P; NASCIUTTI, L.E; LOTSCH, P.F; GRANJEIRO, J.M; FERREIRA, L.B; GIMBA, E.R.P; BOROJEVIC, R. Lycopene induce apoptosis in human prostate cells and alters the expression of Bax and Bcl-2 genes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1290-1297, 2014

SONKER, N.; PANDEY, A.K.; SINGH, P.; TRIPATHI N.N. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Essential Oil as Herbal Preservatives Based on Antifungal, Antiaflatoxin, and Antiochratoxin Activities and *In Vivo* Efficacy During Storage. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 628-634, 2014.

SROUGI, M; RIBEIRO, L.A; PIOVESAN, A.C; COLOMBO, J.R; NESRALLAH, A. Doenças da próstata. **Revista Medicina**, v. 87, n. 3, 2008.

SUN, Z; WANG, H; WANG, J; ZHOU, L; YANG, P. Chemical Composition and Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oil from Leaves of *Mentha piperita* Grown in China. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

TAK, J.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 183–193, 2016.

THANGAM, R.;SATHUVAN, M.; POONGODI, A.; SURESH, V.; PAZHANICHAMY, K.; SIVASUBRAMANIAN, S.; KANIPANDIAN, N.; GANESAN, N.; RENGASAMY, R.; THIRUMURUGAN, R.; KANNAN, S. Activation of intrinsic apoptotic signaling

pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 138–150, 2014.

TZORTZAKIS, N. G., ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 253–258, 2007.

VALERIANO, C; PICCOLI, R.H; CARDOSO, M.G; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VINDELOV LL. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. **Virchows Arch B Cell Pathol**, v. 24, n. 3, p. 227-242, 1977.

VIUDA-MARTOS, M.; GENDY, S.E.G.S.E; SENDRA, E.; FRNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; RAZIK, K.A.A.E.; OMER, E.A.; PÉREZ-ALVAREZ J.A. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Listeria Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063–9070, 2010.

ZANG, Y; LIU, X; WANG, Y; JIANG, P; QUEK, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.



Anexo A - Cromatograma com identificação de compostos presentes no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

