MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MARIA LUIZA DA COSTA SANTOS

ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE AÇAÍ E ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca leucadendron:* UMA ABORDAGEM *IN VITRO* PARA APLICAÇÃO TÓPICA

OURO PRETO
2025

MARIA LUIZA DA COSTA SANTOS

ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE AÇAÍ E ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca leucadendron:* UMA ABORDAGEM *IN VITRO* PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Coorientador: Me. Lucas Resende Dutra Sousa

OURO PRETO
2025

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Luiza da Costa Santos

Atividade Antimelanoma de nanoemulsão contendo Óleo de Açaí e Óleo Essencial de *Melaleuca leucadendron*: uma abordagem in vitro para aplicação tópica

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica

Aprovada em 05 de setembro de 2025

Membros da banca

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Viviane Flores Xavier - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Universidade Federal de Ouro Preto
Me. Lucas Resende Dutra Sousa - co-orientador - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 16/09/2025

Documento assinado eletronicamente por **Orlando David Henrique dos Santos**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/09/2025, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0978813** e o código CRC **AC9437BD**.

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: (31)3559-1069 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Este trabalho certamente não surgiu de uma trajetória solitária, mas sim de um tecido de encontros, de laços e de memórias que me sustentaram até aqui. Agradeço, antes de tudo, aos meus pais, ao meu irmão e a toda minha família, pelo apoio constante, mesmo que distante, que me deu coragem de continuar mesmo nos dias em que tudo parecia que não me levaria a algum lugar. À minha vida republicana, que transformou a dureza do caminho em leveza compartilhada, marcada por uma história enraizada na cidade de Ouro Preto, que me acolheu com suas ladeiras, cultura e afetos.

Aos amigos que caminharam comigo, tanto os que se fizeram presente de corpo como àqueles que se fizeram presentes de alma. Todo meu carinho e reconhecimento a vocês pela companhia, pelas conversas e pela amizade que foi construída durante minha trajetória acadêmica e fora dela.

Ao meu orientador e coorientador, que abriram a porta para que eu participasse de um estudo que ganhou horizontes ao poder ser publicado e ter tanta importância para a ciência e saúde das pessoas. Aos colegas de laboratório, aos professores da Escola de Farmácia e a todos que dividiram salas, bancadas e dúvidas, deixo minha gratidão.

Este não foi um percurso fácil. Houve incertezas, desistências e tentativas. Mas, como um encontro já esperado, o tema deste trabalho caiu sobre mim como uma luva: unindo o que me move e o que eu gosto, tornou-se parte de quem sou e do que desejei construir. Se hoje chego até aqui, é porque muitos estiveram comigo. Este TCC é também deles.

RESUMO

O melanoma cutâneo constitui um dos tipos mais agressivos de câncer de pele e apresenta aumento de incidência em diferentes regiões do mundo. A elevada mortalidade e as limitações das terapias disponíveis justificam a busca por novas estratégias terapêuticas. Compostos naturais, como óleos essenciais, possuem atividades antioxidantes, fotoprotetoras e citotóxicas relatadas em literatura, mas sua aplicação direta sofre restrições devido à baixa solubilidade em água, volatilidade e instabilidade. A nanotecnologia oferece alternativas para superar tais limitações. Este trabalho tem como objetivo desenvolver e avaliar *in vitro* a atividade antimelanoma de uma nanoemulsão contendo óleo de *Euterpe oleracea* (açaí) e óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*. O óleo essencial obtido por hidrodestilação é caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As nanoemulsões produzidas pelo método de emulsificação por inversão de fases são caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta, estabilidade, comportamento reológico e morfologia. A atividade citotóxica é avaliada em fibroblastos L-929 e em linhagens de melanoma murino B16-F10 pelo ensaio de sulforodamina B. O rendimento do óleo essencial corresponde a 0,59% em relação à massa fresca, com predominância de hinesol (28,74%) e β-terpineol (17,09%). As nanoemulsões apresentam tamanho médio de aproximadamente 200 nm, distribuição homogênea, estabilidade à centrifugação e comportamento pseudoplástico com tixotropia. Nos ensaios de viabilidade celular, a nanoemulsão contendo óleo essencial demonstra maior citotoxicidade seletiva contra células de melanoma em comparação ao óleo essencial isolado. Os resultados evidenciam que a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* associada ao óleo de açaí exerce efeito antimelanoma *in vitro*, com manutenção parcial da viabilidade de células não tumorais.

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is one of the most aggressive types of skin cancer and shows an increasing incidence in different regions of the world. The high mortality rate and the limitations of available therapies justify the search for new therapeutic strategies. Natural compounds, such as essential oils, have antioxidant, photoprotective, and cytotoxic activities reported in the literature, but their direct application is restricted due to low water solubility, volatility, and instability. Nanotechnology offers alternatives to overcome these limitations. This work aims to develop and evaluate *in vitro* the anti-melanoma activity of a nanoemulsion containing *Euterpe oleracea* (açaí) oil and *Melaleuca leucadendron* essential oil. The essential oil obtained by hydrodistillation is characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The nanoemulsions produced by the phase inversion emulsification method are characterized in terms of particle size, polydispersity index, zeta potential, stability, rheological behavior, and morphology. The cytotoxic activity is evaluated in L-929 fibroblasts and in B16-F10 murine melanoma cell lines using the sulforhodamine B assay. The yield of the essential oil corresponds to 0.59% in relation to the fresh mass, with a predominance of hinesol (28.74%) and β-terpineol (17.09%). The nanoemulsions show an average size of approximately 200 nm, homogeneous distribution, stability under centrifugation, and pseudoplastic behavior with thixotropy. In cell viability assays, the nanoemulsion containing essential oil demonstrates higher selective cytotoxicity against melanoma cells compared to the isolated essential oil. The results show that the nanoemulsion containing *Melaleuca leucadendron* essential oil associated with açaí oil exerts an *in vitro* anti-melanoma effect, with partial maintenance of non-tumor cell viability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

1.1 Pele humana e o desenvolvimento de um melanoma 8

1.2 Estresse oxidativo e radiação UV no desenvolvimento do melanoma 9

1.3 Epidemiologia do melanoma cutâneo 10

1.4 Prevenção e tratamentos 11

1.5 Óleos essenciais como tratamento alternativo 12

1.6 Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* 12

1.7 Óleo de *Euterpe oleracea* Mart. 13

1.8 Nanotecnologia como alternativa de aplicação 14

2 OBJETIVO 16

2.1 Objetivo geral 16

2.2 Objetivos específicos 16

3 MATERIAL E MÉTODOS 16

3.1 Material vegetal 16

3.2 Obtenção do óleo essencial - hidrodestilação 17

3.3 Caracterização por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas 17

3.4 Desenvolvimento das nanoemulsões 18

3.5 Teste de Centrifugação 18

3.6 Teste de Polidispersidade (IDP) 19

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão 20

3.8 Teste Reológico 20

3.9 Teste de Citotoxicidade 20

3.9.1 Cultura Celular 20

3.9.2 Método Sulforodamina B 21

3.9.3 Índice de Seletividade 22

3.10 Análise Estatística 22

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 22

4.1 Rendimento da extração do óleo essencial 22

4.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas 24

4.3 Nanoemulsão 27

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão, Teste de Centrifugação e IDP 27

4.3.2 Comportamento Reológico 30

4.3.3 Teste de Citotoxicidade **32**
5 CONCLUSÃO **34**
REFERÊNCIAS **36**

INTRODUÇÃO

1.1 Pele humana e o desenvolvimento de um melanoma

A pesquisa científica dedicada à pele por décadas revela sua extrema complexidade em níveis microscópicos e moleculares, desvelando um ecossistema dinâmico que transcende sua função primária como apenas sendo uma barreira física. Enquanto o maior órgão do corpo humano devido a sua área superficial folicular e interfolicular (Williams; Nakatsuji; Sanford; Vrbanac; Gallo, 2017), a pele desempenha um papel essencial como interface essencial entre o ambiente interno e externo, protegendo continuamente o organismo contra estímulos nocivos, como microorganismos, radiação ultravioleta, linfócitos T gama delta e células de Langerhans (Williams; Nakatsuji; Sanford; Vrbanac; Gallo, 2017; Grice; Segre, 2011). Ela apresenta em sua composição células como os fibroblastos, localizadas na hipoderme, que conferem a funcionalidade de adaptação a diferentes condições em que o organismo pode estar exposto, junto aos adipócitos, células de gordura. A hipoderme consiste principalmente em tecido conjuntivo frouxo, sendo rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, conferindo-lhe propriedades semelhantes às mucosas (Nguyen; Qiu; Cui; Goh; Mwangi; David; Mukundan; Brombacher; Locksley; Chawla, 2011). Já na camada basal, os queratinócitos desempenham um papel central na manutenção da integridade da pele, proliferando para formar as camadas espinhosa e granulosa. Na camada granulosa, essas células terminam sua diferenciação como corneócitos, compreendendo a camada córnea ou estrato córneo (SC), uma barreira essencial de permeabilidade e antimicrobiana. (Wong et al., 2016). Em relação à pigmentação, os melanócitos são responsáveis por sua produção, sendo derivadas de um grupo de células embrionárias altamente migratórias chamadas crista neural (Erickson; Reedy, 1998). Elas passam por diversas etapas de desenvolvimento, podendo ainda passar a adquirir um fenótipo maligno, resultado da acumulação de características específicas ao longo do processo. Cada fase apresenta particularidades histológicas que refletem alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas (MUTHUSAMY et al., 2006). Mutações em genes reguladores do crescimento, a produção de fatores de crescimento de forma autócrina e a perda de receptores de adesão comprometem a sinalização intracelular, tornando os melanócitos menos responsivos ao controle exercido pelos queratinócitos. Com isso, passam a proliferar e se disseminar, culminando na formação de nevos, que são as pintas ou sinais aparentes na pele.

Quando originados de um nevo benigno, esses melanócitos podem passar a apresentar crescimento anormal, seguido pelo surgimento de bordas irregulares, alterações de coloração

e, frequentemente, uma resposta inflamatória local. Nessa fase, a lesão é classificada como displásica (Gray-schopfer et al., 2007), com possibilidade de ser um melanoma, um tipo de câncer agressivo e fatal de pele.

1.2 Estresse oxidativo e radiação UV no desenvolvimento do melanoma

Dentro dessa complexidade cutânea, deve-se compreender o fenômeno do estresse oxidativo, desempenhando um papel significativo na fisiologia e patologia da pele. Caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, e os sistemas de defesa antioxidante, o estresse oxidativo é central para a manutenção do equilíbrio redox ideal das células. Disfunções nesse equilíbrio podem resultar em elevação dos níveis de ROS, desencadeando estresse oxidativo e sinalização celular anômala, ou na redução dos níveis de ROS, perturbando a homeostase cellular (Rinnerthaler et al., 2015). O estresse oxidativo é uma característica proeminente em diversas condições patológicas, incluindo o câncer, evidenciando o papel ambivalente das ROS na iniciação, progressão e disseminação dessa doença (Chaudhary et al., 2023). Além disso, o envelhecimento da pele, tanto cronológico quanto influenciado pelo ambiente, está associado ao estresse oxidativo, especialmente no fotoenvelhecimento induzido por exposição crônica à radiação UV, que acarreta na elevação dos níveis de ROS na pele. Vale ressaltar que o UV é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de câncer de pele, uma vez que essa radiação pode causar danos diretos ao DNA celular, levando a mutações genéticas e, consequentemente, ao surgimento de células cancerígenas. A produção aumentada de ROS, principalmente devido à exposição solar, pode desencadear ainda mais esse processo, potencialmente contribuindo para o desenvolvimento do câncer (D'orazi; Jarret; Amaro-ortiz; Scott, 2013).

A partir desse conhecimento, a atenção com o melanoma aumenta, sendo este o tipo mais fatal de câncer de pele, cuja incidência tem apresentado um aumento preocupante (Kaminski; Kazimierczak; Kolenda, 2022). Concomitantemente ao papel essencial do estresse oxidativo em condições patológicas, é importante explorar a interseção entre o estresse oxidativo e a carcinogênese cutânea, especialmente no contexto do melanoma, enfatizando a necessidade de uma abordagem realista em relação ao momento e à forma como o estresse oxidativo contribui para as doenças cutâneas. A melanina, principal pigmento da pele, desempenha um papel dual na proteção contra danos induzidos pela radiação UV e na modulação do comportamento do melanoma. A síntese de melanina está intimamente ligada à

geração de ROS, estabelecendo uma correlação complexa entre os processos de melanogênese e estresse oxidativo.

1.3 Epidemiologia do melanoma cutâneo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que a incidência de câncer tem crescido de forma acelerada, registrando aproximadamente 18,1 milhões de novos diagnósticos e cerca de 9,6 milhões de óbitos. Entre as neoplasias de maior ocorrência destacam-se os cânceres de pele, englobando tanto o melanoma quanto os não melanomas, estes últimos representados principalmente pelo carcinoma basocelular (CBC) e pelo carcinoma espinocelular (CEC) (Krishnaiah; Sarbatly, 2011). O melanoma revela disparidades significativas nas taxas de incidência e mortalidade em diferentes regiões do mundo, com Austrália, Nova Zelândia, Noruega, Suécia e Holanda figurando entre as nações com as taxas mais elevadas, visto que esses países diferem quanto aos fatores ambientais que podem contribuir com a manifestação da doença (Bolick; Geller, 2021). Essa realidade é agravada pelo aumento contínuo da incidência, especialmente em homens, ressaltando a necessidade de recursos adicionais para enfrentar o crescente desafio representado pelo melanoma. Dados do estudo revelam que, de 2001 a 2017, as taxas de incidência de melanoma em homens aumentaram acentuadamente em comparação com mulheres, destacando a necessidade premente de abordagens específicas de gênero na pesquisa e intervenção. Além disso, a análise por faixa etária evidencia aumentos estatisticamente significantes nas taxas de melanoma para grupos com 35 anos ou mais, enquanto houve uma diminuição para indivíduos de 20 a 29 anos. Essas variações sugerem a importância de estratégias de prevenção adaptadas a diferentes faixas etárias. A distribuição geográfica das taxas de incidência nos Estados Unidos, com diferenças marcantes entre os estados, ressalta a necessidade de pesquisas adicionais e campanhas de saúde pública específicas em áreas com taxas crescentes (Gudenkauf; Thrift, 2020). No que diz respeito à mortalidade, observa-se uma diminuição nas taxas ajustadas por idade de 2008 a 2017, embora permaneça uma disparidade significativa entre os sexos, com os homens apresentando taxas de mortalidade mais elevadas. Além disso, os custos associados ao tratamento do melanoma são exorbitantes, estimados em cerca de $3.3 bilhões anualmente nos Estados Unidos, sublinhando a urgência de intervenções eficazes para prevenir o impacto econômico crescente dessa doença (Us Department Of Health And Human Services, 2016).

1.4 Prevenção e tratamentos

Como forma de prevenção, a utilização de filtros solares com fator de proteção solar (FPS) igual ou superior a 30 é reconhecida como estratégia para reduzir a incidência de melanoma ao longo do tempo. Esses produtos atuam na proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta, prevenindo mutações e danos oxidativos que podem levar à transformação neoplásica das células cutâneas (Bolick; Geller, 2021). Apesar de sua importância, cresce a preocupação em relação a certos filtros solares convencionais, como a oxibenzona e o octinoxato, que apresentam potencial de absorção cutânea e possível interferência no sistema endócrino, afetando o equilíbrio hormonal. Além disso, estudos destacam impactos ambientais relacionados ao uso desses compostos, incluindo toxicidade para organismos marinhos e danos a recifes de corais, o que reforça a necessidade de alternativas seguras e sustentáveis (Downs et al., 2016).

Já a ressecção cirúrgica permanece como o principal pilar no tratamento do melanoma localizado, visando remover tanto o tumor quanto os tecidos circundantes saudáveis. Estratégias como a biópsia do linfonodo sentinela complementam essa abordagem, oferecendo informações sobre a presença de células malignas. Entretanto, em casos de melanoma metastático, a cirurgia, embora possa ser aplicada para a remoção de tumores secundários, não é curativa, exigindo intervenções terapêuticas adicionais. Historicamente, a quimioterapia emergiu como a principal opção para pacientes com melanoma metastático. Contudo, as primeiras tentativas, datadas do século XX, revelaram-se limitadas em eficácia e frequentemente associadas a efeitos colaterais severos. A descoberta de agentes quimioterápicos mais eficazes, como a dacarbazina em 1975, trouxe avanços, mas respostas parciais e toxicidade significativa ainda persistiram (Davis; Shalin; Tackett, 2019).

Recentes progressos na compreensão das bases moleculares do melanoma possibilitaram o desenvolvimento de terapias-alvo, destacando os inibidores de BRAF, como vemurafenibe e dabrafenibe, aprovados para melanomas com mutações BRAF. Apesar de sua eficácia inicial, a resistência secundária frequentemente compromete sua durabilidade, incentivando a pesquisa para novas combinações terapêuticas. A imunoterapia surge como um marco revolucionário no tratamento do melanoma metastático, integrando-se de maneira coesa com as estratégias cirúrgicas tradicionais. A complexidade da resposta imune, particularmente na distinção entre células não tumorais e cancerosas, é explorada por terapias que visam os checkpoints imunológicos. Anticorpos anti-PD-1, anti-PD-L1/2 e anti-CTLA-4, como nivolumabe, pembrolizumabe e ipilimumabe, mostraram eficácia notável, proporcionando

respostas duradouras em uma parcela significativa de pacientes. Novas estratégias de tratamento também abordam desafios específicos, como a dissecação completa do linfonodo regional (CLND). Estudos recentes, como DeCOGSLT (2016) e MSLT-II (2017), questionaram a utilidade rotineira da CLND, evidenciando que, em pacientes com SLNB positiva, a CLND imediata não aumenta a sobrevida específica para melanoma. Essas descobertas impactam diretamente a prática clínica, redirecionando o foco para abordagens menos invasivas e preservadoras. Adicionalmente, esses estudos concentram-se em terapias combinadas, como a combinação de anti-CTLA4 com inibidores de PD-1, demonstrando prolongamento da sobrevida em melanoma avançado. Abordagens inovadoras, incluindo terapia direcionada, vírus oncolíticos e transplante fecal, expandem as opções terapêuticas, prometendo resultados promissores no horizonte do tratamento do melanoma.

1.5 Óleos essenciais como tratamento alternativo

Nesse cenário, abordagens complementares, como compostos fitoquímicos provenientes de plantas, ganham espaço, especialmente aquelas derivadas de produtos naturais (Park; Pezzuto, 2002). Estudos apontam que os óleos essenciais (OEs) são capazes de aumentar o FPS de protetores solares já existentes devido ao seu sistema conjugado de ligações químicas insaturadas (Zhou et al., 2023), tornando-os não apenas complementos cosméticos, mas também agentes funcionais no contexto da fotoproteção e do combate ao estresse oxidativo. Além disso, a diversidade de compostos presentes nos OEs favorece múltiplos mecanismos de ação contra células tumorais, incluindo indução de apoptose, modulação de vias de sinalização e inibição da proliferação celular. Entre os componentes mais investigados estão carvacrol, *D*-limoneno, geraniol e α-humuleno, que exibiram citotoxicidade seletiva em várias linhagens de câncer, incluindo modelos de melanoma (Gautam; Mantha; Mittal; 2014). Diversos OEs de plantas foram avaliados quanto à atividade inibitória de crescimento em linhagens de melanoma murino e humano, destacando-se a capacidade citotóxica de OEs de plantas como *Platycladus orientalis, Prangos asperula, Cupressus sempervirens ssp. pyramidalis, Salvia bracteata Bank & Sol,* e *Salvia rubifolia Boiss* em diferentes linhagens de melanoma. Estudos específicos revelaram que o OE de *Tridax procumbens L* exerce efeitos inibitórios significativos na formação de nódulos tumorais e vasos sanguíneos em modelos murinos de melanoma, aumentando expressões de p53 e caspase-3. Da mesma forma, o OE de *Plectranthus amboinicus (Lour)* aumentou as expressões de p53 e caspase-3, inibindo a formação de nódulos tumorais e vasos sanguíneos em modelos de melanoma (Pavithra; Mehta;

Verma, 2019). Outras pesquisas avaliaram os efeitos antitumorais de OEs em modelos de melanoma, como *Pituranthos tortuosus (Coss.) Maire, Zornia brasiliensis Vogel.* e *Annona vepretorum Mart*. Resultados consistentes apontaram para a inibição do crescimento tumoral, indução de apoptose e supressão de processos invasivos. Importante notar que, apesar dos resultados promissores de estudos pré-clínicos que exploram o potencial dos óleos essenciais no tratamento do melanoma.

1.6 Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

Figura 1. Fotografia da planta *Melaleuca leucadendron* cultivada na Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

Com tantas investigações de mais agentes terapêuticos derivados de fontes naturais como uma alternativa promissora, destaca-se a planta *Melaleuca leucadendron L.*, conhecida pelos seus óleos essenciais ricos em compostos fenólicos, emergindo como um foco de interesse no tratamento do melanoma. Estudos prévios evidenciaram que os compostos fenólicos têm atividades antioxidantes notáveis, sendo amplamente distribuídos em plantas medicinais, frutas e vegetais. A *Melaleuca leucadendron L.* não é exceção, conforme indicado pelos resultados do estudo que revelou altos teores de compostos fenólicos, especialmente no extrato butanólico (BuOH). Esses compostos têm demonstrado atividades biológicas diversas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas seguras (Surh; Yun, 2012). No entanto, a pesquisa específica sobre o potencial antitumoral dos óleos

essenciais de *Melaleuca leucadendron L.* no contexto do melanoma ainda está em desenvolvimento. Dentre os constituintes desses óleos, o eucaliptol (1,8-cineol) é identificado como um componente principal, demonstrando propriedades biológicas notáveis. Em estudos anteriores (Brophy, 1999; An; Huong; Satyal, 2020), o eucaliptol apresentou atividade antiproliferativa contra linhagens celulares malignas, incluindo carcinoma de próstata humano (22Rv1) e câncer de mama humano (MCF-7). Além disso, o eucaliptol é reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas.

1.7 Óleo de *Euterpe oleracea* Mart.

Além do óleo de *Melaleuca leucadendron*, outro óleo que tem destaque pela sua acessibilidade e composição é o óleo de *Euterpe oleracea* Mart., conhecido como óleo de açaí. Ele é obtido a partir da polpa ou da semente do fruto e apresenta composição rica em ácidos graxos insaturados, destacando-se o ácido oleico (ômega-9) e o ácido linoleico (ômega-6), além de fitoesteróis e compostos fenólicos como antocianinas e flavonoides. Essa composição confere ao óleo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, fotoprotetoras e potencial cicatrizante, que o tornam um ingrediente de interesse para formulações voltadas à saúde e estética da pele. Outra característica de interesse é o fato do óleo apresentar altos níveis de antioxidantes, podendo reduzir o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Wiseman e Halliwell, 1996). O efeito fotoprotetor está relacionado à capacidade das antocianinas e polifenóis de absorver radiação ultravioleta, atenuando os danos oxidativos às estruturas cutâneas. Já os ácidos graxos essenciais contribuem para a manutenção da barreira lipídica e para o reparo tecidual, auxiliando na integridade e hidratação da pele (Monge-fuentes, 2014). Apesar do seu potencial terapêutico, o uso direto do óleo de açaí apresenta limitações, como baixa solubilidade em meio aquoso, suscetibilidade à oxidação e volatilização de compostos ativos.

1.8 Nanotecnologia como alternativa de aplicação

Apesar do potencial terapêutico dos óleos essenciais, o uso direto destes apresenta limitações, como baixa solubilidade em meio aquoso, suscetibilidade à oxidação e volatilização de compostos ativos. Para superar essas limitações das terapias disponíveis do câncer melanoma, a nanotecnologia surge como uma nova estratégia de tratamento direcionada por meio de novos nanocarreadores, tais como NPs poliméricas, lipossomas, NPs inorgânicas, NPs

lipídicas sólidas (NLSs), TLNs, nanoemulsões (NEs) e entre outros (Waghule et al., 2020). As nanoemulsões, classificadas como sistemas nanostruturados, configuram-se como alternativas promissoras para a veiculação de óleos essenciais em formulações farmacêuticas (Antunes et al., 2021; Forgiarini; Esquen; González; Solans, 2001). Apresentam propriedades como elevada estabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de possibilitarem administração por diferentes vias, incluindo a dérmica, o que favorece a redução de efeitos adversos e a extensão da ação farmacológica. Por essas características, constituem uma estratégia potencialmente vantajosa para aplicação tópica de óleos essenciais (Donsì; Ferrari, 2016; Monge-fuentes et. al., 2017). Esses compostos naturais, por sua vez, são formados por complexas combinações de substâncias dotadas de diversas atividades biológicas, o que lhes confere ação sobre múltiplos alvos, passível de ser otimizada por meio de nanotecnologia.

Dada a complexidade do sistema cutâneo e a crescente incidência global do melanoma, devido a pele desempenhar sua função como interface entre o ambiente interno e externo, protegendo contra vários estímulos nocivos, incluindo radiação UV associada ao desenvolvimento da doença, há a necessidade de explorar intervenções subjacentes e eficazes dentro de seu tratamento, diminuindo o impacto econômico e os custos associados. A escolha de compostos naturais, como os óleos essenciais é justificada pelas propriedades anti-melanoma comprovadas em estudos pré-clínicos, destacando-se a *Melaleuca leucadendron* L., cujos óleos essenciais, ricos em compostos fenólicos, têm potencial atividade antitumoral. O eucaliptol, um dos componentes principais, demonstrou atividade antiproliferativa em outras linhagens celulares malignas. Além disso, o óleo de açaí, fonte de ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos, possui reconhecida ação antioxidante e fotoprotetora, podendo atuar de forma sinérgica com o óleo essencial no combate aos danos oxidativos e na modulação de vias envolvidas na carcinogênese cutânea. Devido a limitação da aplicação direta desses óleos essesciais por via tópica por fatores como baixa solubilidade em meio aquoso, instabilidade e volatilidade de componentes ativos, justifica-se utilizar a nanotecnologia por meio do desenvolvimento de nanoemulsões como uma abordagem para superar tais barreiras, melhorando a estabilidade, a biodisponibilidade e a penetração cutânea dos compostos bioativos, além de permitir liberação controlada e redução de efeitos adversos.

Dessa forma, ao desenvolver, caracterizar e avaliar *in vitro* a atividade antimelanoma de uma nanoemulsão contendo óleo de açaí e óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*, espera-se gerar evidências que possam subsidiar o avanço de formulações tópicas inovadoras e potencialmente eficazes na prevenção e no tratamento do melanoma, contribuindo para a

ampliação das opções terapêuticas disponíveis e para a valorização de recursos naturais de origem vegetal.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar *in vitro* a atividade anti-melanoma de uma nanoemulsão contendo óleo de açaí e óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron* para aplicação tópica.

2.2 Objetivos específicos

Extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*;

- Formular uma nanoemulsão contendo óleo de açaí e óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*;
- Caracterizar físico-quimicamente a nanoemulsão desenvolvida por meio de análises que determinam tamanho de partícula, índice de polidispersidade, centrifugação e comportamento reológico;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* utilizando fibroblastos L-929 e melanoma B16-F10.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As folhas de *Melaleuca leucadendron* foram coletadas em Ouro Preto, MG, Brasil (20°23′48.8″ S, 43°30′32.5″ O), no campus da Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brasil, onde um espécime voucher (OUPR 41732) foi depositada no Herbário Prof. José Badini. Para acesso, é possível através do registro (aprovação: A2CC35F) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

3.2 Obtenção do óleo essencial - hidrodestilação

A extração do óleo essencial a partir das folhas frescas de *Melaleuca leucadendron* foi realizada por meio do método de hidrodestilação, utilizando o destilador Linax® especialmente projetado para a extração de compostos voláteis (Seibert; Rodrigues; Carneiro et al., 2018). Inicialmente, folhas frescas foram cuidadosamente pesadas e acondicionadas no balão de destilação do aparelho. O procedimento teve duração aproximada de 3 a 6 horas. Durante o aquecimento, o vapor d'água atravessou o material vegetal, arrastando as moléculas aromáticas, que posteriormente se condensaram ao passar por um sistema de refrigeração. O condensado, formado por uma mistura bifásica de água e óleo essencial, foi então coletado no recipiente de separação.

Concluída a destilação, a fase oleosa foi separada da fase aquosa utilizando micropipetas, garantindo a precisão na transferência e evitando contaminação cruzada. O óleo obtido foi transferido para um tubo adequado e submetido à centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, visando a remoção de eventuais resíduos de água presentes na amostra. Após a centrifugação, realizou-se uma segunda etapa de coleta, transferindo o óleo já purificado para um recipiente esterilizado, a fim de minimizar riscos de contaminação microbiana ou química. A quantificação da massa do óleo essencial foi determinada pela diferença entre o peso do recipiente contendo o óleo e o peso inicial do mesmo recipiente vazio. O rendimento foi calculado considerando-se a relação percentual entre a massa do óleo obtido e a massa total inicial do material vegetal utilizado.

3.3 Caracterização por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas

A caracterização química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em equipamento GCMS-QP2020 NX (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando coluna capilar de sílica fundida ZB-5MSi (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, EUA). Para preparo das amostras, 500 μL do óleo essencial foram diluídos em igual volume de diclorometano e injetados no modo split (1:10). As condições operacionais foram: gás de arraste hélio (99,999%) a 1,1 mL/min; volume de injeção de 1 μL; temperatura do injetor a 250 °C; ionização por impacto eletrônico (70 eV); temperaturas da fonte de íons e da linha de transferência ajustadas a 280 °C. O programa de temperatura do forno iniciou em 60 °C, elevando-se até 200 °C em 10 min e depois até 280 °C em 3 min. Para determinação dos índices de retenção, foi injetada mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C9–C25). A

identificação dos constituintes foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos com o banco de dados Wiley, sendo considerados apenas compostos com teor acima de 1% na composição relativa.

3.4 Desenvolvimento das nanoemulsões

Foram preparadas duas nanoemulsões, uma com a adição do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* (NE-EO) e uma sem o óleo essencial, sendo a nanoemulsão controle (NE-B). Foi utilizado o método de emulsificação por inversão de fases paro o preparo de ambas as formulações (Noosidum; Chareonviriyaphap; Chandrapatya, 2014). A composição da NE-EO consistiu em óleo essencial (2% v/v), óleo de *Euterpe oleracea* (Gran Oils Brazil, Santo André, SP, Brasil) (5% v/v) como fase oleosa, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Merck Millipore, São Paulo, Brasil) (88% v/v) como fase aquosa e tensoativos não iônicos BRIJ S2 (éter graxo polioxietileno, Croda, Brasil) (2% m/m) e RH 400 (óleo de rícino hidrogenado PEG-40, OXITENO, São Paulo, Brasil) (3% m/m). A composição NE-B consistiu em óleo de *E. oleracea* (Gran Oils) (5% v/v) como fase oleosa, água ultrapura (90% v/v) como fase aquosa e os mesmos tensoativos não iônicos BRIJ S2 (2% m/m) e RH 400 (3% m/m). A fase oleosa e os tensoativos foram aquecidos a 75 ± 2 °C. A fase aquosa também foi aquecida à mesma temperatura. Após ambas as fases atingirem a temperatura mencionada, o óleo essencial foi adicionado, e a água foi adicionada gradualmente à fase oleosa sob agitação mecânica a 600 rpm por 1 minuto (Fisaton, modelo 713D, São Paulo, Brasil). Após esse tempo, as emulsões foram transferidas para um agitador magnético com aquecimento (Fisaton, São Paulo, Brasil) até o completo resfriamento. Após 24 horas do preparo das nanoemulsões, foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas para avaliação dos atributos organolépticos e da homogeneidade. A nanoemulsão controle ou branca (NE-B) foi preparada da mesma maneira, porém sem a adição de óleo essencial conforme mencionado anteriormente.

3.5 Teste de Centrifugação

A estabilidade física das nanoemulsões foi avaliada por meio do teste de centrifugação. Para isso, o teste foi realizado com base nos seguintes parâmetros padronizados: temperatura, tempo e velocidade (GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2020), no entanto, foi necessário modificações para adaptar o teste às características das amostras. Assim, foi utilizado 2000 μL das nanoemulsões previamente preparadas com 1 dia de maturação após

a produção que foram cuidadosamente transferidos para tubos de centrifugação, assegurando que não houvesse bolhas de ar ou resíduos que pudessem interferir na leitura visual posterior. As amostras foram submetidas a centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, condição que aumenta significativamente a força centrífuga em relação à gravidade, acelerando potenciais processos de instabilidade que normalmente ocorreriam de forma mais lenta durante o armazenamento em repouso. O experimento foi conduzido em triplicata. Após o término da centrifugação, cada tubo foi inspecionado visualmente sob iluminação adequada, observando-se presença ou ausência de separação de fases, formação de creme (fase oleosa concentrada na parte superior) ou sedimentação (fase concentrada na parte inferior).

3.6 Teste de Polidispersidade

O índice de polidispersidade (IDP) foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons no equipamento Zetasizer® Nano Series (Malvern, UK). Para a análise, 20 µL da nanoemulsão foram diluídos em 1980 µL de água ultrapura à temperatura ambiente, com incidência do laser em ângulo de 90°. As medições foram realizadas em triplicata nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 após o preparo das nanoemulsões.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As telas de carbono Lacey, com malha de cobre de 300 (SEM®), foram submetidas ao processo de descarga luminosa (glow discharge) em atmosfera de argônio por um minuto, com corrente de 10 kV, utilizando o metalizador Bal-Tec MED20 (BalTec, Pfäffikon, Suíça). Após a descarga luminosa, 3 µL da amostra foram depositados sobre a tela, e, um minuto depois, o excesso foi removido com papel de filtro. Posteriormente, 3 µL de agente de contraste (acetato de uranila a 2%) foram depositados sobre a grade. Após um intervalo de 30 segundos, o excesso foi novamente removido com papel de filtro, e a grade foi armazenada em uma caixa apropriada até a análise (geralmente realizada em até 24 horas). A análise foi conduzida utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) — Tecnai G2-12 Spirit Biotwin, 120 kV (Thermo Fisher/FEI, Waltham, MA, EUA) — operando a uma voltagem de 60 kV. As imagens foram registradas com uma câmera de dispositivo acoplado por carga (CCD) em uma ampliação de 43.000×.

3.8 Teste Reológico

O comportamento reológico das nanoemulsões foi avaliado por meio de medições controladas utilizando um reômetro Brookfield, modelo DV-III, acoplado a um sistema de cone-e-placa e operado com o software RHEOCALC 3.0 (AMETEK Brookfield, Middleborough, MA, EUA). As análises foram conduzidas à temperatura controlada de 25 °C. Para cada ensaio, utilizou-se o fuso CP 40, compatível com o volume de 500 µL de amostra. O estudo reológico foi realizado em diferentes momentos do armazenamento — dias 1, 7, 14, 21 e 28 após o preparo — permitindo avaliar possíveis alterações estruturais ou de viscosidade ao longo do tempo. A obtenção da curva ascendente foi realizada aplicando-se velocidades de rotação progressivamente crescentes: 10, 46, 82, 118, 164 e 190 rpm. Em seguida, a curva descendente foi obtida reduzindo as velocidades de rotação nos mesmos intervalos, procedimento fundamental para identificar histerese reológica e avaliar fenômenos como tixotropia ou reestruturação interna do sistema após a aplicação de forças cisalhantes (Noosidum; Chareonviriyaphap; Chandrapatya, 2014). A interpretação dos resultados foi baseada no modelo da lei da potência (Power Law), expresso pela equação:

$$\tau = k \cdot \gamma^n$$

Nessa equação, τ representa a tensão de cisalhamento (Pa), k é o índice de consistência ($Pa \cdot s^n$), que fornece uma medida da viscosidade aparente do sistema; γ corresponde à taxa de cisalhamento (s^{-1}), associada à velocidade relativa de movimento entre as camadas do fluido; e n é o índice de fluxo, parâmetro que caracteriza o tipo de comportamento reológico: $n = 1$ indica fluido newtoniano (viscosidade constante, independente da taxa de cisalhamento); $n < 1$ caracteriza fluidos pseudoplásticos ou de afinamento por cisalhamento (viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento); $n > 1$ indica comportamento dilatante (viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento).

3.9 Teste de Citotoxicidade

3.9.1 Cultura Celular

As culturas celulares empregadas nos experimentos compreenderam diferentes linhagens, incluindo células da linhagem de fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de camundongo (NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivada da linhagem L], ATCC CCL-1) e células da linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10, ATCC CRL-6475). Ambas

foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), ao qual se adicionou 10% de soro fetal bovino (FBS, Fetal Bovine Serum, Gibco®, Waltham, MA, EUA), visando fornecer fatores de crescimento e proteínas essenciais para a proliferação celular. Além disso, o meio foi suplementado com gentamicina (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EUA) como agente antimicrobiano, prevenindo a contaminação bacteriana. As culturas foram mantidas em estufa de atmosfera controlada, ajustada para 37 °C, com umidade saturada e uma composição gasosa contendo 5% de CO_2, condição que assegura o tamponamento adequado do meio e o crescimento estável das células.

3.9.2 Método Sulforodamina B

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio com sulforodamina B (SRB) (Skehan; Storeng; Scudiero; Monks; Mcmahon; Vistica Warren; Bokesch; Kenney; Boyd, 1990). As células foram expostas às amostras em diferentes concentrações, sendo o óleo essencial (OE) dissolvido em RPMI contendo 2% de DMSO e as nanoemulsões (NE-OE e NE-B) dissolvidas em RPMI puro. Para as linhagens L-929 e B16-F10, foram testadas seis concentrações, resultando em valores finais de 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00 e 250,00 µg/mL para o OE, e de 390,63; 781,25; 1562,50; 3125,00; 6250,00 e 12.500,00 µg/mL para a NE-OE e a NE-B.Células mantidas na ausência das amostras-teste e na presença de 2% de DMSO foram utilizadas como controle negativo. Após períodos de incubação de 24 e 48 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (20%, frio) por 1 hora a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e deixadas para secar. As células fixadas foram então coradas com SRB a 0,1%, dissolvida em ácido acético a 1%, por 30 minutos. Após a coloração, as placas foram novamente lavadas com ácido acético a 1% e deixadas secar completamente. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de tampão TRIS 10 mmol/L (pH 10,5) para solubilização do corante, mantida à temperatura ambiente por cerca de 30 minuto. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O valor de CC_{50} (concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%) foi calculado por regressão não linear dos dados normalizados, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (Skehan; Storeng; Scudiero; Monks; Mcmahon; Vistica Warren; Bokesch; Kenney; Boyd, 1990). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos conduzidos em triplicata.

3.9.3 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) da linhagem de fibroblastos L-929 e a CC_{50} da linhagem de melanoma B16-F10.

3.10 Análise Estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro–Wilk. Para comparação das variáveis, incluindo índice de polidispersidade e parâmetros reológicos, entre as nanoemulsões contendo óleo essencial (NE-OE) e as nanoemulsões base (NE-B), bem como entre os diferentes dias de análise (1, 7, 14, 21 e 28 após o desenvolvimento de cada formulação), foi utilizado o teste t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento da extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial a partir de material vegetal é um procedimento amplamente empregado na fitoquímica, visando a obtenção de compostos voláteis com potencial aplicação farmacológica, cosmética e alimentícia. Neste trabalho a determinação do rendimento foi conduzida considerando-se a massa total de folhas de *Melaleuca leucadendron* utilizada e a quantidade de óleo essencial obtida após o processo de extração. Por meio do cálculo de rendimento, obteve-se um total de 12,53 g de óleo essencial, correspondendo a um volume de 13,5 mL, a partir de 2,14 kg de folhas frescas de *M. leucadendron* (FIG. 1). Esse resultado representa 0,59% de rendimento em relação à massa fresca do material vegetal processado. O valor obtido reflete características inerentes à própria espécie, como o genótipo, a composição química natural, a densidade e distribuição de tricomas glandulares, além do estágio de desenvolvimento e do período fenológico da planta. Esses fatores se somam às condições de cultivo, às partes que foram selecionas para serem coletadas usadas na extração, ao armazenamento das folhas e às especificidades do método de extração empregado.

Na literatura, os rendimentos da extração do óleo essencial de *M. leucadendron* variam amplamente, evidenciando que o percentual extraído não é um parâmetro fixo e que está sujeito a flutuações decorrentes de fatores ambientais e metodológicos. No estudo de Rizki Arisandi et al. (2023), por exemplo, observa-se uma variação de rendimento entre 0,17% a 0,67% justificada por fatores ambientais. Foi observado maior rendimento em março e menor em agosto, embora ambos os meses pertençam à mesma categoria pluviométrica segundo a classificação da Agência de Meteorologia, Climatologia e Geofísica (BMKG, 2023). Essa diferença está associada ao número de dias de chuva e ao volume total de precipitação, demonstrando que pequenas variações climáticas podem impactar significativamente a biossíntese de metabólitos secundários. Nota-se que nos períodos em que o rendimento estava mais elevado, assemelhando-se aos resultados obtidos nesta pesquisa, a coleta foi executada sob condições semelhantes de cultivo e extração do estudo de Rizki Arisandi et al.. Em contraste, Song et al. (2016) documentaram um rendimento substancialmente superior, de 1,75%, o que representa quase três vezes o valor obtido nessa análise. A variação observada no rendimento de óleo essencial de *M. leucadendron* pode estar também associada não apenas às condições climáticas, mas também ao estágio fenológico das árvores. Estudos indicam que a fase de floração exerce influência significativa na produção de óleos essenciais. Corryanti e Sugito (2015) relataram que a floração de *M. leucadendron* ocorre de janeiro a abril, período em que a planta pode apresentar alterações metabólicas voltadas à reprodução, impactando na síntese e no acúmulo de metabólitos secundários. Assim, essas diferenças podem ocorrer devido a múltiplos aspectos, como já exemplificado nas pesquisas citadas, além da metodologia de extração que pode envolver diferentes tipos de equipamento, tempo de destilação, volume de água utilizado ou pressão interna do sistema. Tais variações reforçam a necessidade de se estabelecer protocolos de cultivo e extração mais padronizados, especialmente quando se objetiva a produção em escala comercial ou na obtenção de lotes para pesquisa farmacológica, diminuindo o impacto ambiental ao se ter resultados maiores com uma colheita estrategicamente e previamente estudada.

Nesse sentido, uma avaliação comparativa de diferentes métodos de extração, como hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, entre outras, adicionalmente aos estudos de sazonalidade pode possibilitar resultados ainda mais benéficos ao elevar o rendimento preservando a integridade química dos constituintes voláteis.

4.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A caracterização química do óleo essencial obtido a partir das folhas de *Melaleuca leucadendron* foi conduzida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) possibilitou a separação e quantificação dos constituintes majoritários e minoritários do óleo essencial, enquanto a espectrometria de massas forneceu informações estruturais que permitiram a identificação de monoterpenos e sesquiterpenos. A Tabela 1 e a Figura 2 ilustram os componentes detectados, seus teores relativos e a distribuição percentual entre as diferentes classes de terpenos. A presença concomitante de monoterpenos e sesquiterpenos indica não apenas a complexidade química do óleo essencial, mas também sugere que suas atividades biológicas observadas podem resultar de interações sinérgicas entre os diversos constituintes, ou ainda da ação específica de cada componente isolado, reforçando a importância de estudos que considerem tanto o efeito global do óleo quanto os mecanismos individuais de ação de cada terpeno. O perfil quantitativo obtido revelou que os monoterpenos representam 43,76% da composição total do óleo essencial, com destaque para o α-pineno (8,19%), β-terpineol (17,09%) e α-terpineol (6,65%) como os principais componentes. Esses compostos são caracterizados por elevada volatilidade e estrutura relativamente simples, frequentemente associados a propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, como é visto em estudo de Karthikeyan et al. (2018), entre outros que abordam suas diversas ações farmacológicas (Limeira; Júnior, 2024). Já os sesquiterpenos, estruturas mais complexas e com maior peso molecular, responsáveis por atividades farmacológicas prolongadas e por contribuírem para a estabilidade e persistência olfativa dos óleos essenciais, corresponderam a 45,78% da composição total, com o hinesol se destacando como o componente mais abundante (28,74%). Estudos em espécies medicinais, como *Atractylodes lancea*, demonstraram que o hinesol, juntamente com outros sesquiterpenos (β-eudesmol e atractilodina), exerce efeitos antiproliferativos, apoptóticos, antimetastáticos e antiangiogênicos por múltiplos mecanismos. Entre eles, destacam-se: a promoção da parada do ciclo celular por meio da modulação de proteínas reguladoras como p16, CDK1, CDK4 e p21 e a indução da apoptose, com aumento da razão Bax/Bcl-2, liberação de citocromo C e ativação de caspases (Sonsomnuek; Tarasuk; Plengsuriyakarn; Boonprasert; Na-Bangchang, 2022; Kotawong; Chajaroenkul; Roytrakul; Phaonakrop; Na-Bangchang, 2021). Essa distribuição equilibrada entre monoterpenos e sesquiterpenos evidencia que o óleo essencial analisado possui um perfil químico diversificado, potencialmente capaz de exercer múltiplos efeitos

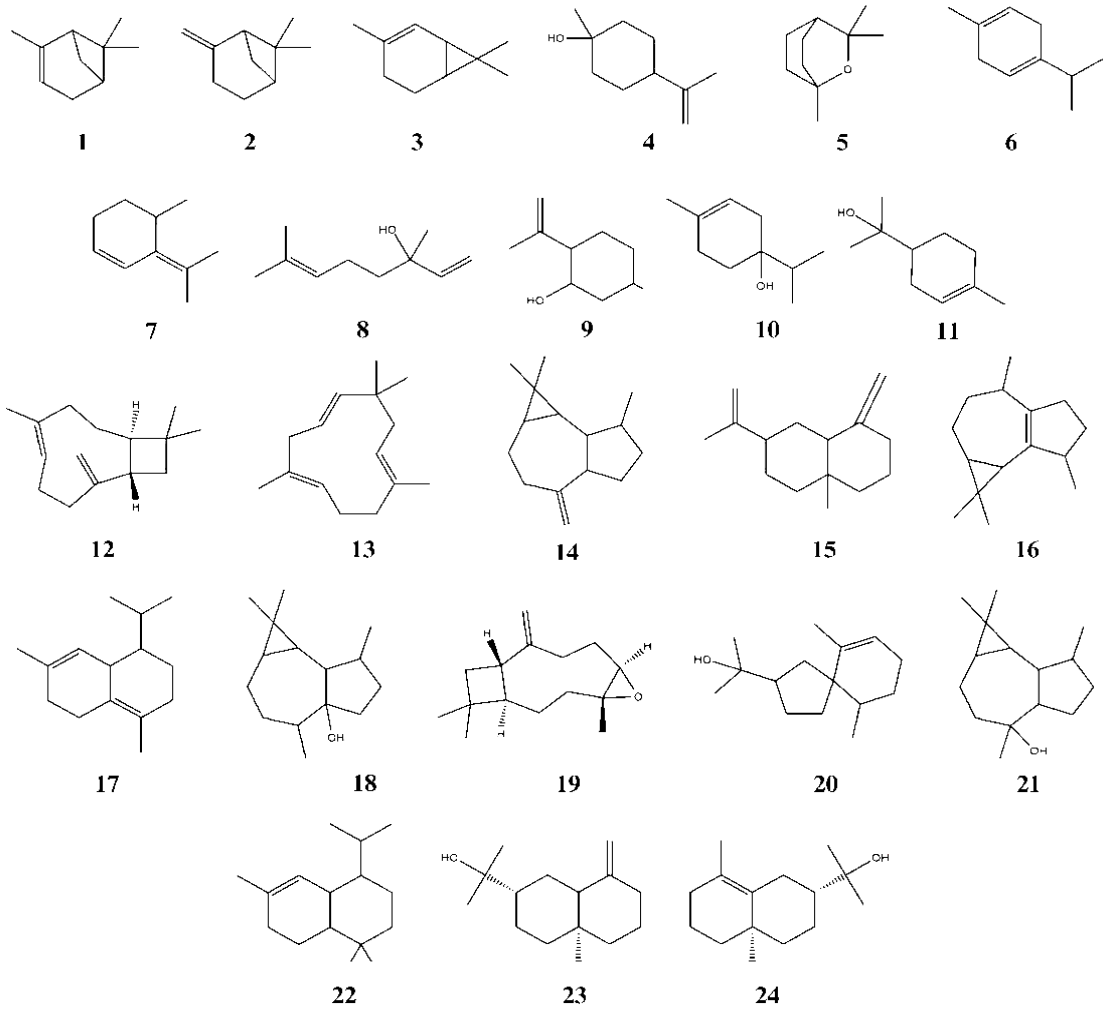
biológicos de maneira complementar ou sinérgica. E assim como o rendimento obtido óleo, a composição química pode variar significativamente em função de diversos fatores extrínsecos e intrínsecos à planta. Fatores ambientais, como condições climáticas, intensidade luminosa, umidade relativa e tipo de solo, podem influenciar a biossíntese de terpenos e modificar a proporção entre os diferentes componentes. Da mesma forma, variáveis fenológicas, incluindo o estágio de desenvolvimento da planta, o período e horário de coleta das folhas, e até mesmo o método de secagem utilizado, podem afetar a volatilização e preservação de compostos sensíveis. Esses aspectos são corroborados pelo estudo de Bautista-Silva et al. (2020), que relataram uma composição majoritariamente formada por monoterpenoides (77,43%) nas folhas de *M. leucadendron*, com α-pineno (9,06%), limoneno (32,00%), 1,8-cineol (17,32%) e viridiforol (14,89%) como os principais constituintes. Apesar de diferenças nos percentuais e na predominância de certos compostos em relação à amostra estudada no presente trabalho, tais variações são esperadas. Assim, o perfil químico do óleo essencial permite analisar e associar com maior propriedade a correlação entre atividades biológicas específicas, como propriedades antioxidantes, fotoprotetoras, antimelanoma e anti-inflamatórias, à quantidade de compostos identificados, sendo que nesta pesquisa a presença de monoterpenos e sesquiterpenos em proporções significativas sugere que a amostra com o óleo essencial tende a atuar em conjunto, modulando respostas celulares por mecanismos diversos, como indução de estresse oxidativo em células tumorais, modulação de vias inflamatórias ou proteção frente a danos oxidativos em células normais.

Tabela 1. Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Melaleuca leucadendron.*

No.	TR (min)	Compostos	Classe	Área (%)	Similaridade
1	5,78	α-pineno	Monoterpeno	8,19	95
2	6,84	β-pineno	Monoterpeno	2,96	95
3	8,02	(+)-2-Careno	Monoterpeno	0,51	93
4	8,60	β-terpineol	Monoterpeno	17,09	89
5	8,66	Eucaliptol	Monoterpeno	2,88	89
6	9,34	γ-terpineno	Monoterpeno	1,43	95
7	10,29	Ciclohexeno, 4-metil-3-(1-metiletilideno)-	Monoterpeno	0,60	93
8	10,68	Linalol	Monoterpeno	1,03	95
9	12,27	Isopulegol	Monoterpeno	0,54	96
10	13,42	Terpinen-4-ol	Monoterpeno	1,88	94
11	14,02	α-terpineol	Monoterpeno	6,65	94
12	21,80	Cariofileno	Sesquiterpeno	2,22	94
13	22,90	α-cariofileno	Sesquiterpeno	0,62	95
14	23,14	Aromadendreno	Sesquiterpeno	0,74	94
15	23,97	β-selinene	Sesquiterpeno	0,83	94
16	24,26	Ledeno	Sesquiterpeno	1,33	91
17	25,10	δ-cadineno	Sesquiterpeno	0,60	90
18	26,55	Palustrol	Sesquiterpeno	1,05	94
19	27,04	Epóxido de cariofileno	Sesquiterpeno	2,23	93
20	27,83	Hinesol	Sesquiterpeno	28,74	88
21	27,97	Viridiflorol	Sesquiterpeno	4,43	92
22	28,81	α-cadinol	Sesquiterpeno	1,00	90
23	29,12	β-selinenol	Sesquiterpeno	0,76	92
24	29,21	Selinenol	Sesquiterpeno	1,23	85

TR: Tempo de Retenção

Figura 2. Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Melaleuca leucadendron*. (1) α-pineno; (2) β-pineno; (3) (+)-2-careno; (4) β-terpineol; (5) eucaliptol; (6) γ-terpineno; (7) ciclohexeno, 4-metil-3-(1-metiletilideno)-; (8) linalol; (9) isopulegol; (10) terpinen-4-ol; (11) α-terpineol; (12) cariofileno; (13) α-cariofileno; (14) aromadendreno; (15) β-selineno; (16) ledeno; (17) δ-cadineno; (18) palustrol; (19) epóxido de cariofileno; (20) hinesol; (21) viridiflorol; (22) α-cadinol; (23) β-selinenol; (24) selinenol.



4.3 Nanoemulsão

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão, Teste de Centrifugação e Índice de Polidispersidade

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é amplamente reconhecida como uma das técnicas mais robustas e precisas para a caracterização de sistemas nanoestruturados, permitindo a obtenção de informações detalhadas sobre a morfologia, a organização estrutural e o tamanho das partículas. Seu princípio baseia-se na interação de um feixe de elétrons de alta

energia com a amostra, produzindo imagens de alta resolução capazes de revelar não apenas a forma externa das partículas, mas também aspectos de sua organização interna e eventuais agregações (Coelho et al., 2014; Marques Borges et al., 2020). Essa capacidade de resolução na escala nanométrica deve ser aplicada no estudo de nanoemulsões devido o desempenho físico-químico e biológico desses sistemas estar relacionado à sua morfologia e dimensões. Com a aplicação da MET foi possível visualizar com clareza as partículas constituintes das nanoemulsões desenvolvidas. Observou-se que a formulação contendo óleo essencial (NE-OE) apresentou morfologia predominantemente ovalada ou esférica, com contornos bem definidos e distribuição relativamente homogênea no campo de análise. Já a formulação controle (NE-B) exibiu morfologia majoritariamente esférica, com partículas uniformes e ausência de aglomeração significativa, indicando boa estabilidade coloidal. Em ambas as formulações, o tamanho médio observado foi de aproximadamente 200 nm, valor consistente com a faixa nanométrica desejada para aplicações farmacotécnicas e cosméticas.

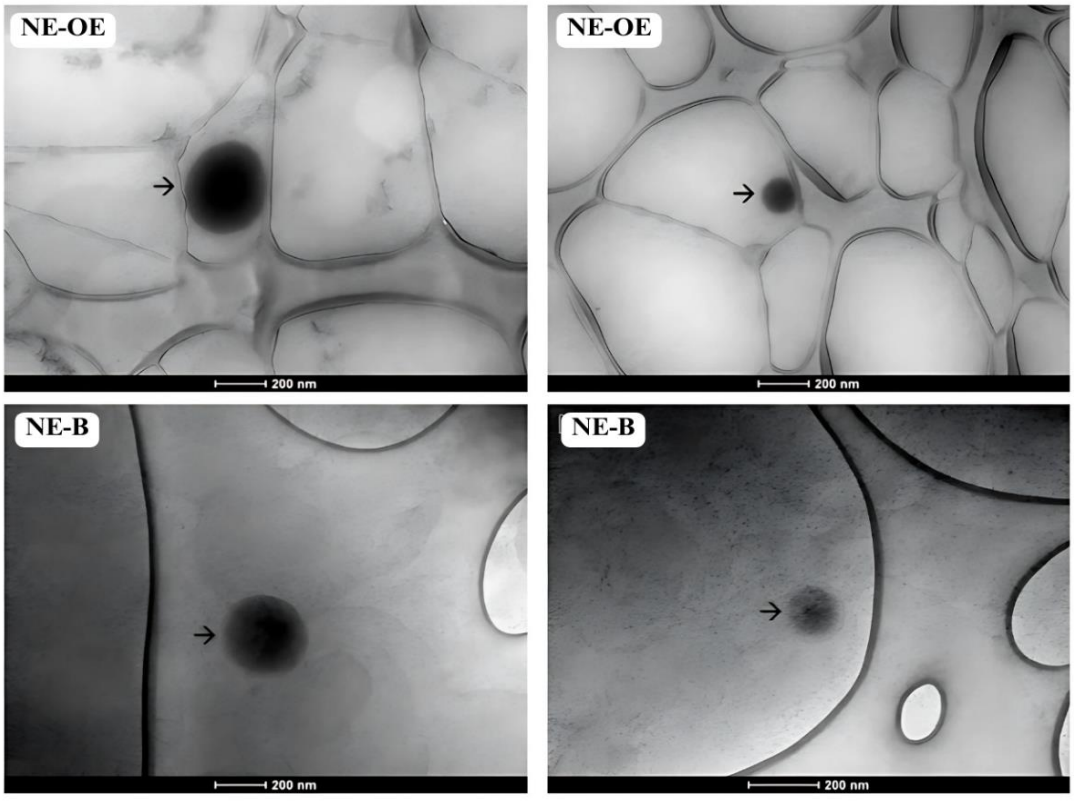
A consistência dos dados obtidos por MET com as medições de diâmetro hidrodinâmico realizadas por espalhamento dinâmico de luz (TAB. 2 e FIG. 3) reforça a confiabilidade dos resultados e evidencia que o método de preparo empregado foi eficiente na obtenção de partículas com dimensões controladas e com baixo índice de polidispersidade. Essa concordância entre técnicas distintas sugere que as partículas mantêm sua integridade estrutural mesmo em meio líquido, e que o tamanho medido em suspensão não sofre variações significativas quando visualizado em condições de vácuo no MET. Esses resultados estão em conformidade com os resultados do teste de centrifugação realizado, na onde não foram observadas evidências de separação de fases ou outros indicadores de instabilidade da nanoemulsão.

Table 2. Valores de tamanho de partícula e índice de polidispersidade das nanoemulsões conforme o período analisado. Resultados expressos como média ± desvio padrão

Período (dias)	Tamanho (nm)		IPD	
	NE-OE	NE-B	NE-OE	NE-B
1	179,5 ± 1,852 ^{aA}	138,2 ± 0,833 ^{aB}	0,23 ± 0,010 ^{aA}	0,15 ± 0,011 ^{aB}
7	184,0 ± 2,676 ^{aA}	137,6 ± 0,954 ^{aB}	0,23 ± 0,031 ^{aA}	0,17 ± 0,004 ^{aA}
14	181,1 ± 0,950 ^{aA}	135,6 ± 0,458 ^{aB}	0,25 ± 0,029 ^{aA}	0,17 ± 0,011 ^{aB}
21	188,6 ± 14,330 ^{aA}	136,1 ± 0,208 ^{aB}	0,27 ± 0,048 ^{aA}	0,18 ± 0,005 ^{bA}
28	180,2 ± 1,305 ^{aA}	137,3 ± 1,185 ^{aB}	0,25 ± 0,014 ^{aA}	0,18 ± 0,004 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa para a mesma amostra em diferentes períodos ($p < 0,05$); letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre NE-OE e NE-B no mesmo período ($p < 0,05$). IPD: Índice de Polidispersão.

Figura 3. Morfologia das nanoemulsões (NE-OE e NE-B) obtida por microscopia eletrônica de transmissão com ampliação de 43.000×. As setas pretas indicam as gotas da nanoemulsão. As barras de escala brancas correspondem a 200 nm.



4.3.2 Comportamento Reológico

Ao analisar o comportamento reológico, obtêm-se parâmetros que influenciam diretamente na homogeneização, na estabilidade e na performance final do produto ao longo do tempo. A reologia permite avaliar como o material se deforma e flui sob diferentes condições de estresse ou cisalhamento, fornecendo informações sobre a estrutura interna do sistema, a interação entre suas partículas e a resistência ao movimento. Esses dados garantem a uniformidade e consistência do produto durante o armazenamento e transporte, além de também permitir a compreensão da resposta da formulação frente à aplicação prática (Rao, 2013; Mehrnia et. al. 2017). Adicionalmente a isso, características sensoriais para a aceitação do produto pelo usuário, tais como espalhabilidade, consistência, fluidez e facilidade de aplicação, estão diretamente relacionadas às propriedades reológicas do sistema. A avaliação dessas propriedades permite correlacionar os parâmetros físicos medidos com a percepção sensorial durante a aplicação tópica, fornecendo informações necessárias para o ajuste da formulação, como viscosidade ideal, densidade aparente e capacidade de espalhamento (TAB. 3) (Zhang; Mcclements, 2018).

Tabela 3. Parâmetros de comportamento reológico da NE-OE e NE-B de acordo com o período analisado. Resultados expressos como média ± desvio padrão.

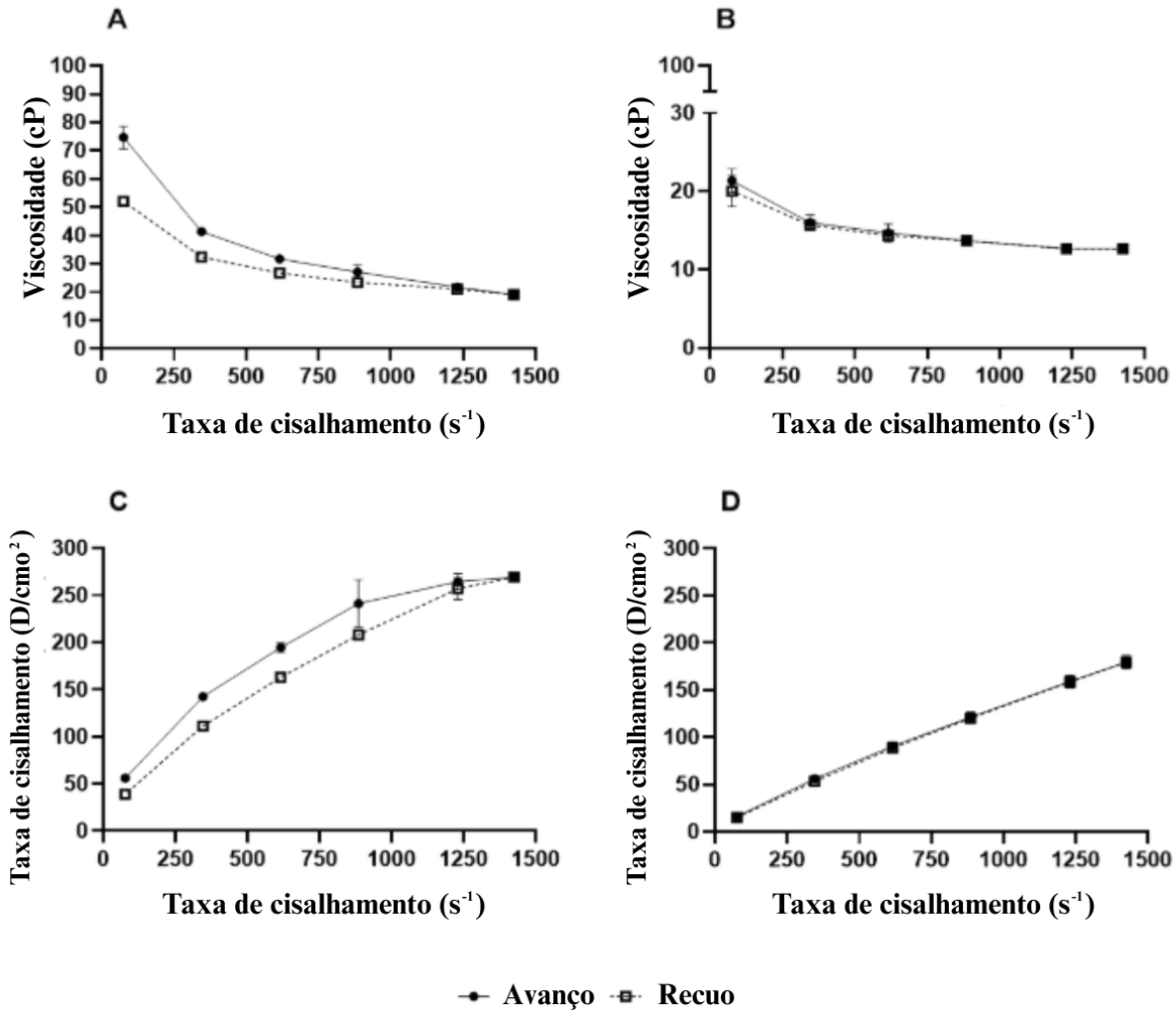
Período (dias)	Índice de Consistência (cP)		Taxa de Fluxo (n)		Confiabilidade (%)	
	NE-OE	NE-B	NE-OE	NE-B	NE-OE	NE-B
1	$240,70 \pm 13,308^{aA}$	$12,63 \pm 1,115^{aB}$	$0,60 \pm 0,006^{aA}$	$0,86 \pm 0,015^{aB}$	$92,6 \pm 0,808$	$97,1 \pm 1,015$
7	$259,66 \pm 28,854^{aA}$	$18,90 \pm 0,916^{bB}$	$0,60 \pm 0,012^{aA}$	$0,87 \pm 0,030^{aB}$	$96,7 \pm 0,404$	$97,7 \pm 0,305$
14	$322,40 \pm 12,322^{bA}$	$25,33 \pm 1,436^{cB}$	$0,61 \pm 0,006^{aA}$	$0,87 \pm 0,010^{aB}$	$92,4 \pm 0,404$	$97,1 \pm 0,289$
21	$343,33 \pm 39,172^{bA}$	$42,23 \pm 1,616^{dB}$	$0,61 \pm 0,026^{aA}$	$0,83 \pm 0,006^{aB}$	$90,5 \pm 1,137$	$98,0 \pm 0,737$
28	$268,20 \pm 5,415^{aA}$	$85,00 \pm 32,568^{eB}$	$0,64 \pm 0,020^{aA}$	$0,75 \pm 0,052^{bA}$	$89,6 \pm 0,472$	$97,3 \pm 0,557$

Diferentes letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significativa entre a mesma amostra em períodos diferentes ($p < 0,05$); diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa entre NE-OE e NE-B no mesmo período ($p < 0,05$).

Dessa forma, a reologia não apenas assegura a qualidade físico-química do produto, mas também contribui para a experiência de uso, sendo um fator determinante para a eficácia

e aceitabilidade de formulações cosméticas e farmacêuticas. O índice de fluxo (n), parâmetro derivado do modelo da lei de potência, apresenta valores unitários apenas em taxas de deformação extremamente baixas ou elevadas, indicando uma aproximação do comportamento newtoniano apenas em condições limite (Costa, 2017). Entretanto, os resultados obtidos para a nanoemulsão contendo óleo essencial (NE-OE) demonstraram valores de n inferiores a 1, caracterizando um comportamento pseudoplástico. Nesse regime, a viscosidade aparente diminui progressivamente com o aumento da taxa de cisalhamento, fenômeno associado à reorganização temporária das partículas ou estruturas internas do sistema (FIG. 4A). A presença de tixotropia foi evidenciada pelo descompasso entre as curvas de avanço e retorno, formando um laço de histerese característico, que indica que a estrutura interna necessita de tempo para se recompor após a aplicação de cisalhamento (FIG. 4C) (Hao; Chen; Chang; Meng; Liu.; Feng, 2018). O ajuste dos dados experimentais ao modelo da lei de potência confirmou que a agitação ou cisalhamento induz uma quebra parcial das ligações intermoleculares e interações estruturais dentro da formulação, facilitando o fluxo do material. Quando o estresse cessou, as interações internas se restabelecem gradualmente, recuperando a viscosidade inicial (Freire, 2024). Este comportamento é esperado em formulações tópicas, pois a redução temporária da viscosidade sob estresse permite que o produto se torne mais fluido durante a aplicação, facilitando a espalhabilidade e promovendo uma cobertura uniforme sobre a superfície cutânea (Moravkova; Filip, 2013). Ao mesmo tempo, a pseudoplasticidade assegura que, em repouso, a formulação retorne a uma viscosidade suficientemente elevada para manter uma camada estável sobre a pele, prevenindo escorrimento excessivo e promovendo boa adesão (Dănilă et. al., 2019). Essa combinação de propriedades confere à formulação um desempenho sensorial otimizado: é possível aplicar uma camada fina e homogênea, com textura agradável, evitando sensação áspera ou inconsistências comuns em produtos farmacêuticos ou cosméticos menos bem formulados.

Figura 4. Curva de fluxo de cisalhamento estável representativa da NE-OE (A) e da NE-B (B); reograma representativo da NE-OE(C) e da NE-B (D).



4.3.3 Teste de Citotoxicidade

No presente estudo, o foco foi caracterizar o impacto das nanoemulsões desenvolvidas tanto em células não tumorais (fibroblastos L-929) quanto em células tumorais (melanoma murino B16-F10) ao avaliar a citotoxicidade. Esta análise define o potencial de um material em induzir efeitos tóxicos *in vitro*, seja por meio do comprometimento da integridade celular ou pela interferência na taxa de proliferação. A partir desses resultados, é possível selecionar formulações com menor ou maior toxicidade para investigações subsequentes *in vivo*, tanto em modelos animais quanto em humanos, a depender do objetivo do estudo. Entre os parâmetros mais utilizados nesses testes, destaca-se a viabilidade celular, que reflete diretamente os

processos metabólicos e estruturais para a sobrevivência das células (Kroll et al., 2009). Devido os óleos essenciais demonstraram ter essa característica, tornaram-se alternativas terapêuticas para o câncer, dado o seu potencial de interferir na tumorigênese e na progressão de diferentes tipos de tumores, incluindo melanomas (Di Martile, 2021). Os resultados obtidos nas avaliações de viabilidade celular (TAB. 4) indicam que tanto o OE quanto a NE-OE exercem efeitos citotóxicos mais pronunciados sobre as células tumorais em comparação às células não tumorais.

Tabela 4. Citotoxicidade do OE, NE-OE e NE-B contra as células L-929, B16-F10, NGM após 24 e 48 h de tratamento. CC_{50}: concentração citotóxica para 50% das células; SI: índice de seletividade; CC_{50}L-929 / CC_{50}B16-F10;

Linhagem celular de pele		**Amostra**		
		OE	**NE-OE**	**NE-B**
L-929 CC_{50}(μg/mL)	24 h	81,10 ± 4,42	2124,33 (42,49 [c]) ± 433,21	3311,00 ± 429,85
	48 h	63,40 ± 1,85	846,33 (16,93 [c]) ± 112,29	2030,10 ± 177,66
B16-F10 CC_{50}(μg/mL)	24 h	60,61 ± 2,16	945,30 (18,91 [c]) ± 82,14	3008,67 ± 40,08
	48 h	44,64 ± 2,00	566,87 (11,34 [c]) ± 31,03	2003,67 ± 111,38
IS	24 h	1,34	2,25	1,10
	48 h	1,42	1,49	1,01

Observou-se que a nanoemulsão contendo óleo essencial (NE-OE) amplificou a citotoxicidade do OE individual contra fibroblastos L-929 e células de melanoma B16-F10 tanto 24 quanto 48 horas após a exposição. Esse aumento na seletividade antitumoral foi evidenciado pelo incremento do índice de seletividade (IS), indicando que a formulação nanoemulsionada aprimora a capacidade do OE de eliminar células tumorais murinas de maneira mais eficiente, enquanto preserva parcialmente a viabilidade de células saudáveis. O efeito superior da NE-OE em relação ao OE isolado pode ser atribuído a múltiplos fatores relacionados às propriedades físico-químicas da nanoemulsão. A presença de partículas nanométricas, carga superficial controlada e maior solubilidade dos constituintes ativos contribui para uma permeabilidade de membrana mais eficiente, permitindo que os bioativos do óleo essencial penetrem rapidamente nas células tumorais, induzindo morte celular em estágios iniciais após a exposição. Considerando que as células tumorais apresentam frequentemente mecanismos de defesa antioxidante e barreiras à penetração de compostos hidrofóbicos, esses resultados foram promissores. Embora não existam relatos específicos

sobre o efeito anti-melanoma do OE de *Melaleuca leucadendron*, evidências da literatura apontam para o potencial de óleos essenciais relacionados. Por exemplo, estudos com *Melaleuca alternifoli*a demonstraram que, quando combinados com inibidores de BRAF e MEK, como dabrafenibe e trametinibe, certos terpenos presentes nesse óleo essencial, como o α-terpineol, terpinoleno e terpinen-4-ol, reduziram de forma sinérgica a viabilidade de células de melanoma por meio da indução de apoptose (Di Martile et al., 2021). Nanoemulsões carregadas com compostos antioxidantes como astaxantina, ou formadas via método de inversão de fase, demonstraram ausência de citotoxicidade em fibroblastos L-929 mesmo em concentrações elevadas e tempos de exposição de até 48 horas. Tais evidências corroboram a segurança da matriz nanoemulsionada desenvolvida neste estudo para aplicações tópicas, reforçando o seu potencial para entrega de bioativos de forma controlada e seletiva, assim como também foi notado no estudo de Subongkot e Ngawhirunpat (2017), no qual utilizou-se sistemas microemulsionados pode aumentar a eficiência de liberação e permeação de fármacos sem intensificar a citotoxicidade. As formulações com ácido all-trans-retinoico (ATRA) não apresentaram diferenças significativas de toxicidade em relação ao ATRA livre, evidenciando que os carreadores são seguros e viabilizam a utilização de compostos com potencial citotóxico em formulações farmacêuticas. Em relação à citotoxicidade contra melanoma, os achados são compatíveis com estudos prévios que relataram eficácia de nanoemulsões em modelos de melanoma. Por exemplo, nanoemulsões contendo óleo de *Euterpe oleracea* mostraram potente fotossensibilização em terapia fotodinâmica, promovendo até 85% de morte celular em B16-F10 sem comprometer células não tumorais (Monge-fuentes et al., 2017). Esses paralelos sugerem que o efeito observado no presente estudo pode se relacionar não apenas ao OE de *M. leucadendron*, mas também a interações potenciais com componentes de outros óleos utilizados, como foi o caso com o óleo de *Euterpe oleracea*. Adicionalmente, estudos envolvendo reformulação de dacarbazina para aplicação tópica demonstraram que a utilização de sistemas nanoestruturados promoveu reduções no tamanho tumoral em modelos de xenotransplante em camundongos até dez vezes superiores às obtidas com formulações convencionais em suspensão (Tagne; Srikanth K; Robert, 2008).

5 CONCLUSÃO

A formulação de nanoemulsão contendo óleo de *Euterpe oleracea Mart.* e óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* desenvolvida neste estudo apresentou propriedades físico-químicas adequadas para aplicação tópica, incluindo tamanho médio de partícula na

faixa nanométrica (~200 nm), índice de polidispersidade reduzido e estabilidade inicial comprovada por ensaios de centrifugação e análise microscópica. A caracterização química do óleo essencial evidenciou a presença de compostos bioativos relevantes, como α-pineno, β-terpineol, α-terpineol e hinesol, com reconhecida ação antioxidante, anti-inflamatória e potencial citotóxico seletivo. A avaliação citotóxica revelou inibição de proliferação em linhagens de melanoma murino (B16-F10) com índices de seletividade favoráveis em relação a fibroblastos e melanócitos humanos não tumorais, sugerindo efeito direcionado sobre células tumorais. A utilização da nanotecnologia demonstrou eficácia em superar limitações associadas ao uso direto dos óleos, como baixa solubilidade em meio aquoso e volatilidade, resultando em sistema estável e com possível liberação controlada dos compostos ativos. Os dados obtidos sustentam a viabilidade técnica da formulação como candidata a produto tópico de interesse farmacêutico para uso complementar na prevenção e tratamento do melanoma. Entretanto, a extrapolação para aplicação clínica requer estudos adicionais, incluindo avaliação de estabilidade a longo prazo, testes de permeação cutânea, análise da farmacodinâmica em modelos animais e investigação de possíveis efeitos adversos sistêmicos. A execução dessas etapas permitirá confirmar a eficácia, segurança e aplicabilidade do sistema em condições reais de uso, possibilitando sua futura incorporação em protocolos terapêuticos ou cosméticos voltados à oncologia cutânea.

REFERÊNCIAS

KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and bioproducts processing, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

WILLIAMS, Michael R. et al. Staphylococcus aureus induces increased serine protease activity in keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology, v. 137, n. 2, p. 377-384, 2017.
GRICE, Elizabeth A.; SEGRE, Julia A. The skin microbiome. Nature reviews microbiology, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011.

NGUYEN, Khoa D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. Nature, v. 480, n. 7375, p. 104-108, 2011.

NGUYEN, Khoa D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. Nature, v. 480, n. 7375, p. 104-108, 2011.

ERICKSON, Carol A.; REEDY, Mark V. 5 Neural Crest Development: The Interplay between Morphogenesis and Cell Differentiation. Current topics in developmental biology, v. 40, p. 177-209, 1998.

MUTHUSAMY, Viswanathan et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. Cancer research, v. 66, n. 23, p. 11187-11193, 2006.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. Melanoma biology and new targeted therapy. Nature, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

RINNERTHALER, Mark et al. Oxidative stress in aging human skin. Biomolecules, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.

CHAUDHARY, Priya et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. Frontiers in chemistry, v. 11, p. 1158198, 2023.

KAMIŃSKI, Kacper; KAZIMIERCZAK, Urszula; KOLENDA, Tomasz. Oxidative stress in melanogenesis and melanoma development. Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2022.

D'ORAZIO, John et al. UV radiation and the skin. International journal of molecular sciences, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and bioproducts processing, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

BOLICK, N. L.; GELLER, A. C. Epidemiology of Melanoma. Hematology/Oncology Clinics of North America, W.B. Saunders, 1 fev. 2021.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES ORAL HEALTH COORDINATING COMMITTEE. US Department of Health and Human Services oral health strategic framework, 2014–2017. Public Health Reports, v. 131, n. 2, p. 242-257, 2016.

THRIFT, Aaron P.; GUDENKAUF, Franciska J. Melanoma incidence among non-Hispanic Whites in all 50 US states from 2001 through 2015. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, v. 112, n. 5, p. 533-539, 2020.

DOWNS, C. A. et al. Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. Archives of environmental contamination and toxicology, v. 70, n. 2, p. 265-288, 2016.

GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K.; MITTAL, Sunil. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. BioMed research international, v. 2014, n. 1, p. 154106, 2014.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, Alka; VERMA, Rama S. Essential oils: from prevention to treatment of skin cancer. Drug discovery today, v. 24, n. 2, p. 644-655, 2019.

SURH, Jeonghee; YUN, Jung-Mi. Antioxidant and anti-inflammatory activities of butanol extract of *Melaleuca leucadendron L*. Preventive nutrition and food science, v. 17, n. 1, p. 22, 2012.

BROPHY, Joseph J. Potentially commercial melaleucas. In: Tea Tree. CRC Press, 1999. p. 247-274.

DAVIS, Lauren E.; SHALIN, Sara C.; TACKETT, Alan J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. Cancer biology & therapy, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 2019.

LEITER, Ulrike et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. The Lancet Oncology, v. 17, n. 6, p. 757-767, 2016.

FARIES, Mark B. et al. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. New England Journal of Medicine, v. 376, n. 23, p. 2211-2222, 2017.

PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M. Botanical in cancer chemo-prevention. Cancer and Metastasis Reviews, v. 31, n. 3–4, p. 231–255, 2002.

ZHOU, Ying et al. Artemisia sieversiana Ehrhart ex Willd. Essential Oil and Its Main Component, Chamazulene: Their Photoprotective Effect against UVB-Induced Cellular Damage and Potential as Novel Natural Sunscreen Additives. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, v. 11, n. 50, p. 17675-17686, 2023.

AN, Nguyen Thi Giang et al. Mosquito larvicidal activity, antimicrobial activity, and chemical compositions of essential oils from four species of Myrtaceae from central Vietnam. Plants, v. 9, n. 4, p. 544, 2020.

WISEMAN, Helen; HALLIWELL, Barry. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, v. 313, n. Pt 1, p. 17, 1996.

MONGE-FUENTES, Victoria; MUEHLMANN, Luis Alexandre; DE AZEVEDO, Ricardo Bentes. Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. Nano reviews, v. 5, n. 1, p. 24381, 2014.

WAGHULE, Tejashree et al. Emerging trends in topical delivery of curcumin through lipid nanocarriers: effectiveness in skin disorders. Aaps Pharmscitech, v. 21, n. 7, p. 284, 2020.

ANTUNES, Amanda S. et al. *In vitro* Photoprotective Evaluation and Development of Novel Nanoemulsion with Chromone Derivative. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 32, p. 1813-1821, 2021.

FORGIARINI, Ana et al. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. Langmuir, v. 17, n. 7, p. 2076-2083, 2001.

DONSÌ, Francesco; FERRARI, Giovanna. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. Journal of biotechnology, v. 233, p. 106-120, 2016.

MONGE-FUENTES, Victoria et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 166, p. 301-310, 2017.

SEIBERT, Janaína Brandão et al. Seasonality study of essential oil from leaves of Cymbopogon densiflorus and nanoemulsion development with antioxidant activity. Flavour and Fragrance Journal, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2019.

NOOSIDUM, Atirach; CHAREONVIRIYAPHAP, Theeraphap; CHANDRAPATYA, Angsumarn. Synergistic repellent and irritant effect of combined essential oils on Aedes aegypti (L.) mosquitoes. Journal of Vector Ecology, v. 39, n. 2, p. 298-305, 2014.

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

ZHANG, Zipei; MCCLEMENTS, David J. Overview of nanoemulsion properties: stability, rheology, and appearance. In: Nanoemulsions. Academic Press, 2018. p. 21-49.

BAUTISTA-SILVA, Jessica P. et al. Melaleuca leucadendra essential oil promotes loss of cell membrane and wall integrity and inhibits bacterial growth: An in silico and *in vitro* approach. Current microbiology, v. 77, n. 9, p. 2181-2191, 2020.

SONG, Ja-Eun et al. Acaricidal and insecticidal activities of essential oils against a stored-food mite and stored-grain insects. Journal of Food Protection, v. 79, n. 1, p. 174-178, 2016.

SEIBERT, Janaína Brandão et al. Seasonality study of essential oil from leaves of Cymbopogon densiflorus and nanoemulsion development with antioxidant activity. Flavour and Fragrance Journal, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2019.

RIBEIRO, Tatiana G. et al. Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. International journal of nanomedicine, p. 877-890, 2014.

MARQUES BORGES, Gabriel Silva et al. Novel self-nanoemulsifying drug-delivery system enhances antileukemic properties of all-trans retinoic acid. Nanomedicine, v. 15, n. 15, p. 1471-1486, 2020.

RAO, M. Anandha. Rheology of fluid, semisolid, and solid foods: principles and applications. Springer Science & Business Media, 2013.

MEHRNIA, Mohammad-Amin et al. Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein. Food Hydrocolloids, v. 66, p. 259-267, 2017.

COSTA, Camila Moreira; NACCACHE, Monica Feijó; VARGES, Priscilla. Caracterização reológica de fluidos complexos. Revista Brasileira de Iniciação Científica, p. 3-28, 2017.

HAO, Zheng-qi et al. Rheological properties and gel characteristics of polysaccharides from fruit-bodies of Sparassis crispa. International Journal of Food Properties, v. 21, n. 1, p. 2283-2295, 2018.

FREIRE I.S. Reologia Escoamento e Deformação da Matéria. Available online: www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjc2NTc= (accessed on 9 April 2024).

MORAVKOVA, Tereza; FILIP, Petr. The influence of emulsifier on rheological and sensory properties of cosmetic lotions. Advances in Materials Science and Engineering, v. 2013, n. 1, p. 168503, 2013.

DĂNILĂ, Elena et al. Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures. Pure and Applied Chemistry, v. 91, n. 9, p. 1493-1507, 2019.

SOUSA, Lucas RD et al. Trypanocidal activity and increased solubility of benznidazole incorporated in PEG 4000 and its derivatives. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 32, n. 6, p. 1162-1172, 2021.

SOUSA, Lucas Resende Dutra et al. Anti-Trypanosoma cruzi potential of vestitol isolated from lyophilized red propolis. Molecules, v. 28, n. 23, p. 7812, 2023.

DI MARTILE, Marta et al. Antitumor effect of Melaleuca alternifolia essential oil and its main component terpinen-4-ol in combination with target therapy in melanoma models. Cell death discovery, v. 7, n. 1, p. 127, 2021.

GUO, Weiqiang et al. The antitumor effect of hinesol, extract from Atractylodes lancea (Thunb.) DC. by proliferation, inhibition, and apoptosis induction via MEK/ERK and NF-κB pathway in non–small cell lung cancer cell lines A549 and NCI-H1299. Journal of Cellular Biochemistry, v. 120, n. 11, p. 18600-18607, 2019.

YANG, Chu-Ching; HUNG, Chi-Feng; CHEN, Bing-Huei. Preparation of coffee oil-algae oil-based nanoemulsions and the study of their inhibition effect on UVA-induced skin damage in mice and melanoma cell growth. International Journal of Nanomedicine, p. 6559-6580, 2017.

MONGE-FUENTES, Victoria et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 166, p. 301-310, 2017.

TAGNE, Jean-Bosco; KAKUMANU, Srikanth; NICOLOSI, Robert J. Nanoemulsion preparations of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft mouse melanoma model. Molecular pharmaceutics, v. 5, n. 6, p. 1055-1063, 2008.

Corryanti, & Sugito. Build a source of superior eucalyptus seeds and seedlings (in Bahasa Indonesia). Cepu: Research and Development Center of Perhutani. 2015.

GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS. 2ª edição. Brasília: Anvisa, 2020. 61 p.

KARTHIKEYAN, Ramasamy et al. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. Life Sciences, v. 212, p. 150-158, 2018.

LIMEIRA, Rebecca Rhuanny Tolentino; JÚNIOR, Fernando José de Lima Ramos. AÇÕES FARMACOLÓGICAS DO α-PINENO E β-PINENO. Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança, v. 22, n. 3, p. 373-388, 2024.

KOTAWONG, Kanawut et al. The proteomics and metabolomics analysis for screening the molecular targets of action of β-eudesmol in cholangiocarcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, v. 22, n. 3, p. 909, 2021.

SONSOMNUEK, Paradon et al. Apoptotic and anti-metastatic effects of Atractylodes lancea (Thunb.) DC. in a Hamster model of cholangiocarcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, v. 23, n. 9, p. 3093, 2022.

KROLL, Alexandra et al. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 72, n. 2, p. 370-377, 2009.

SUBONGKOT, T.; NGAWHIRUNPAT, T. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. International Journal of Nanomedicine, [S. l.], v. 12, p. 5585–5599, 2017.