



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – CAMPUS DOM DELGADO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**BRENDHA ARAÚJO DE SOUSA**

**ATIVIDADE QUÍMICA E BIOLÓGICA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL  
OBTIDO POR EXTRAÇÃO CRUZADA DE *Citrus limonia* Osbeck (LIMÃO-  
CRAVO) e *Laurus nobilis* L. (LOURO)**

**SÃO LUÍS – MA**  
**2022**

BRENDHA ARAÚJO DE SOUSA  
(2018057740)

**ATIVIDADE QUÍMICA E BIOLÓGICA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL  
OBTIDO POR EXTRAÇÃO CRUZADA DE *Citrus limonia* Osbeck (LIMÃO-  
CRAVO) e *Laurus nobilis* L. (LOURO)**

Monografia apresentada ao Curso de Química  
Licenciatura da Universidade Federal do  
Maranhão como requisito para a obtenção do  
título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira  
Everton.

**SÃO LUÍS – MA**  
**2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

---

SOUSA, BRENDA ARAÚJO DE.

ATIVIDADE QUÍMICA E BIOLÓGICA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO POR EXTRAÇÃO CRUZADA DE *Citrus limonia* Osbeck LIMÃO-CRAVO e *Laurus nobilis* L. LOURO / BRENDA ARAÚJO DE SOUSA. - 2022.

41 p.

Coorientador(a): GUSTAVO OLIVEIRA EVERTON.

Orientador(a): VICTOR ELIAS MOUCHREK FILHO.

Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Citrus. 2. Fenóis. 3. Laurus. 4. Nanoemulsão. 5. Óleo essencial. I. EVERTON, GUSTAVO OLIVEIRA. II. MOUCHREK FILHO, VICTOR ELIAS. III. Título.

**BRENDHA ARAÚJO DE SOUSA**

**ATIVIDADE QUÍMICA E BIOLÓGICA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL  
OBTIDO POR EXTRAÇÃO CRUZADA DE *Citrus limonia* Osbeck (LIMÃO-  
CRAVO) e *Laurus nobilis* L. (LOURO).**

Monografia apresentada ao Curso de Química  
Licenciatura da Universidade Federal do  
Maranhão como requisito para a obtenção do  
título de Licenciado em Química.

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

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)**

Doutorado em Química (USP)  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr. Gustavo Oliveira Everton (Coorientador)**

Doutorado em Química (UFMA-IFMA)  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias**

Doutorado em Química (UFSM)  
Universidade Federal do Maranhão



## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à minha avó Antônia Pereira Jeremias da Luz (in memoriam), por ser minha referência pessoal, pela garra e dedicação dada a família.*

*À minha família, que contribuiu para minha formação pessoal me ajudando a percorrer esse caminho e compreendeu a minha ausência.*

*Ao corpo de pesquisadores do Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV), que me abraçou em um momento muito especial e foram de suma importância para esse trabalho, e a cada um dos amigos que fiz durante toda a graduação, que me acompanhou em toda essa jornada.*

*Aos professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação acadêmica e acreditaram na minha capacidade permitindo-me acompanhá-los em alguns momentos.*

*Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho pelo aceite a orientação. E expressar minha sincera gratidão ao meu coorientador Prof. Dr. Gustavo Oliveira Everton pelo seu apoio, suporte e seu conhecimento.*

*E a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse trabalho.*

*“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”*

**Marie Curie**

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar de forma inédita a atividade química e biológica das nanoemulsões bioativas (O/A) incorporadas com o óleo essencial (OE) obtido por extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L. Os materiais vegetativos foram obtidos no município de São Luís (MA). O óleo essencial foi extraído utilizando-se a técnica de hidrodestilação em um sistema extrator de Clevenger modificado. Os constituintes químicos do óleo essencial de *C. limonia* e do óleo essencial de *L. nobilis* foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A determinação dos compostos fenólicos totais do OE foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalente de ácido tânico. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de baixa energia de inversão de fases. A atividade antioxidante foi realizada pelo método de descoloração de radicais hidroxila. A ação anti-inflamatória foi avaliada pelo método de desnaturação proteica de albumina. O conteúdo fenólico total foi de 252,35 mg EAT g<sup>-1</sup> para o OE de *Citrus limonia* e *Laurus nobilis*, sendo um resultado significativo para atividades farmacológicas do óleo essencial. No ensaio de atividade antioxidante obteve-se uma CE<sub>50</sub> de 85,20 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 77,23 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 88,13 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 45,30 mg L<sup>-1</sup> para ação, respectivamente do OE e das nanoemulsões (NOE 1, NOE 2 e NOE 3) de *Citrus limonia* e *Laurus nobilis*, sendo classificada como ação promissora. O óleo essencial estudado obtido por cruzamento e suas nanoemulsões (NOE 1, NOE 2 e NOE 3) apresentaram potencial anti-inflamatório, com CE<sub>50</sub> de 161,84 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 220,07 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 186,85 mg L<sup>-1</sup> e CE<sub>50</sub> de 252,67 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Através dos resultados obtidos, comprovou-se ação antioxidante e anti-inflamatória do óleo essencial obtido por cruzamento das espécies de *Citrus limonia* e *Laurus nobilis* e um aumento do seu potencial quando se tem a incorporação do óleo a nanoemulsões. Trazendo resultados expressivos e inéditos, visto sua ausência na literatura, sendo sua aplicação apreciada e estudos mais profundos incentivados em virtude do seu potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** *Citrus*; *Laurus*; Óleo essencial; Nanoemulsão; Fenóis.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the chemical and biological activity of bioactive nanoemulsions (O/W) incorporated with the essential oil (EO) obtained by cross-extraction of *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L. The vegetative materials were obtained in the city of São Luís (MA). The essential oil was extracted using the hydrodistillation technique in a modified Clevenger extractor system. The chemical constituents of *C. limonia* essential oil and *L. nobilis* essential oil were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The determination of the total phenolic compounds of the EO was performed by the Folin-Ciocalteu method and expressed as tannic acid equivalent. The nanoemulsions were prepared by the low energy method phase inversion. The antioxidant activity was performed by the hydroxyl radical decolorization method. The anti-inflammatory action was evaluated by the protein albumin denaturation method. The total phenolic content was 252.35 mg TAE g<sup>-1</sup> for the EO of *Citrus limonia* and *Laurus nobilis*, being a significant result for pharmacological activities of the essential oil. In the antioxidant activity assay, a EC<sub>50</sub> of 85.20 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 77.23 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 88.13 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 45.30 mg L<sup>-1</sup> was obtained for the action of, respectively, the EO and the nanoemulsions (NEO 1, NEO 2, and NEO 3) of *Citrus limonia* and *Laurus nobilis*, being classified as promising action. The studied essential oil obtained by crossing and its nanoemulsions (NEO 1, NEO 2, and NEO 3) showed anti-inflammatory potential, with EC<sub>50</sub> of 161.84 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 220.07 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 186.85 mg L<sup>-1</sup> and EC<sub>50</sub> of 252.67 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Through the results obtained, the antioxidant and anti-inflammatory action of the essential oil obtained by crossing the species of *Citrus limonia* and *Laurus nobilis* as well as an increase in its potential when the incorporated into nanoemulsions was confirmed. Bringing significant and unprecedented results, since its absence in the literature, its application appreciated, and deeper studies encouraged due to its biotechnological potential.

**Keywords:** *Citrus*; *Laurus*; Essential oil; Nanoemulsion; Phenols.

## LISTA DE SIGLAS

**µg** – Micrograma

**µL** – Microlitro

**CE<sub>50</sub>** – Concentração Efetiva para 50%

**CFT** – Conteúdo Fenólico Total

**CG-EM** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**EAT** – Expresso ácido tânico

**FRAP** – *Ferric Reduciong Antioxidant Power*

**g** – Grama

**h** – Hora

**IC<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória para 50%

**LOEPAV** – Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais

**MAE** – Extração assistida por micro-ondas

**mg** – Miligrama

**mg EAG g<sup>-1</sup>** – Miligramas equivalentes de ácido gálico por grama

**mg EAT g<sup>-1</sup>** – Miligramas equivalentes de ácido tânico por grama

**min** – Minuto

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**m/v** – Massa por volume

**nm** – Nanômetro

**NOE** – Nanoemulsão estável

**O/A** – Óleo em Água

**OE** – Óleo Essencial

**UFMA** – Universidade Federal do Maranhão

**UV/VIS** – Espectroscopia no Ultravioleta Visível

**v/v** – Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO - CAPÍTULO 1- ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>5</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXO A - NORMAS DA REVISTA .....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais expressam sua individualidade química através da produção de metabólitos secundários, que estão diretamente ligados às suas defesas e desenvolvimento (MIRAHMADI et al., 2011). Elas possuem substâncias que são utilizadas desde a antiguidade como forma de tratamento, e quando se fala em algumas etnias e culturas isoladas chega a ser o único recurso para os cuidados da saúde no tratamento de uma série de doenças e vêm sendo estudadas dentro da farmacologia, principalmente na produção de fármacos (VEIGA JUNIOR et al., 2005; CALIXTO, 2005; SARAIVA, 2015; MORESKI, 2018).

Dentre os bioprodutos obtidos de plantas medicinais, destacam-se os óleos essenciais sendo misturas complexas voláteis ou etéreos presentes nas plantas, encontrados nos órgãos das plantas, produzidos normalmente por células secretoras ou grupos de células. Podem apresentar composição química e odores distintos quando obtidos de diferentes partes de um mesmo vegetal, assim como sofrer alterações em seus constituintes devido as diferenças das condições e parâmetros climáticos, ambientais e fatores agrônômicos em que se encontram sofrendo influência em sua qualidade (STEFFENS, 2010; SILVA, 2013).

Através do pressuposto para seleção das espécies a ser investigado, este estudo buscou na literatura plantas medicinais com diferentes composições químicas que ainda não havia estudos relatados para sinergias de atividade biológica, bem como ação de formulações a partir de seus óleos essenciais. Como resultado foram selecionadas as espécies *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L.

*Citrus limonia* Osbeck popularmente conhecido como limão rosa ou limão-cravo, é um fruto do gênero *Citrus*, um híbrido originário da Índia que se adaptou às variadas condições climáticas do Brasil (MIGLIORINI et al., 2016). Suas folhas e suco são utilizadas no combate a resfriados e corizas através de infusões, e possui atividades biológicas conhecidas para essa espécie como: antibacteriana e larvicida que tem como composto majoritário o limoneno (MILLEZI et al., 2014; GOMES et al., 2020). Estudos apontam que os óleos essenciais do pericarpo de frutas cítricas apresentam potencial para tratamento de diversas condições patológicas (AMORIM et al., 2016).

*Laurus nobilis* L. que é uma planta pertencente à família Lauraceae, nativo da Europa e amplamente utilizado na culinária e medicina popular (CAPUTO et al., 2017), tem suas folhas ricas em compostos terpênicos como cineol, linalool, eugenol e carvacrol, com diversas atividades biológicas, dentre elas têm-se atividade

anticancerígena, antimicrobiana, herbicida e inseticida, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, cicatrizante, moluscicida, inseticida e neuroprotetoras (ALEJO-ARMIJO et al., 2017; OVIDI et al., 2021; GUEDOUARI&NABIEV, 2021). Têm relatos que as folhas e frutos de *Laurus nobilis* L. possuem aromas, estimulantes e propriedade narcóticas (ABU-DAHAB et al., 2014).

Os compostos presentes em ambas as plantas apresentadas nesse estudo podem promover ações biológicas, sendo capazes de interagir em diferentes moléculas-alvo (BARBOSA et al., 2015). Com isto, torna-se necessário a busca por alternativas ao tratamento aliado no surgimento de doenças e infecções em conjunto com o aumento de resistência das já existentes, resistência essa que pode vir a ocorrer por diferentes mecanismos sendo uma delas devido ao uso exacerbado de medicamentos e tratamentos convencionais, (RICE, 2006; RICE et al., 2008; FANIN et al., 2020).

Estudos apontam um aumento no potencial da ação de bioativos naturais hidrofóbicos quando trabalhado com nanoemulsões (KENTISH et al., 2008; ANWER et al., 2014) e apresentam vantagens tais como: proteção contra degradação química, solubilidade em água e liberação controlada evitando a perda de controle devido evaporação dos óleos essenciais, diminuição do tamanho das partículas, impulsiona o potencial bioativo dos óleos essenciais, diminuindo consideravelmente a concentração para ação biológica ( FAUSTINO et al., 2020; FELIZARDO et al., 2021).

As nanoemulsões são sistemas de dispersão coloidal termodinamicamente estável em que dois líquidos imiscíveis são misturados para formar uma única fase por meio de um surfactante apropriado e são veículos importantes para a distribuição de compostos bioativos (SHAH et al., 2010; KENTISH et al., 2008), unindo o conceito de produtos naturais a sistema tecnológico (FAUSTINO et al., 2020).

Ainda não se tem relatos sobre trabalhos com foco na ação biológica de óleos essenciais obtidos por extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L. Diante do exposto, o estudo visou avaliar de forma inédita a ação antioxidante e anti-inflamatória da nanoemulsão do óleo essencial cruzado de *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade química e biológica da nanoemulsão do óleo essencial obtido por extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck (Limão-cravo) e *Laurus nobilis* L. (Louro)

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial das cascas de *Citrus limonia* Osbeck e do óleo essencial das folhas de *Laurus nobilis*;
- Quantificar o conteúdo fenólico total do óleo essencial do cruzamento de *Citrus limonia* Osbeck / *Laurus nobilis*;
- Desenvolver nanoemulsões incorporadas com óleo essencial de *Citrus limonia* Osbeck / *Laurus nobilis* L. termodinamicamente estáveis;
- Obter a Concentração Eficiente 50% para ação antioxidante do óleo essencial e nanoemulsões de *Citrus limonia* Osbeck / *Laurus nobilis*;
- Determinar a Concentração Eficiente 50% para ação anti-inflamatória do óleo essencial e nanoemulsões de *Citrus limonia* Osbeck / *Laurus nobilis*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO - CAPÍTULO 1- ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY

**TÍTULO:**

**Atividade química e biológica da nanoemulsão do óleo essencial obtido por extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck (Limão-cravo) e *Laurus nobilis* L. (Louro)**

**Fator de impacto: 0,70**



 Open Access

**Brazilian Archives of Biology and Technology**

Publicação de: Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar

Área: Multidisciplinar

Versão impressa ISSN: 1516-8913 Versão on-line ISSN: 1678-4324

Título anterior: Arquivos de Biologia e Tecnologia

---

Article - Biological and Applied Sciences

# Chemical and biological activity of essential oil nanoemulsion obtained by cross-extraction of *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L.

Received: YYYY.MM.DD; Accepted: YYYY.MM.DD.

\*Correspondence: brendha.araujo@discente.ufma.br; (B.A.S.)

## HIGHLIGHTS

- This research presents for the first time a cross-extraction with two medicinal species.
- The EO of *C. limonia* identifies limonene (40,25%),  $\beta$ -pinene (29,36%) and cimeno (16,33%), and the EO of *L. nobilis* identifies isoeugenol (64,36%), myrcene (12,1%), chavicol (10,22%) and linalool (3,6%).
- The crossed EO of *C. limonia* and *L. nobilis* has a TPC of 252.35 mg TAE g<sup>-1</sup>.
- The nanoemulsion composed of crossed EO of *C. limonia* and *L. nobilis*, formulation NEO 3, has its antioxidant activity classified as very active.
- The crossed EO of *C. limonia* and *L. nobilis* and their nanoemulsions show remarkable anti-inflammatory action.

**Abstract:** This study aimed to evaluate the chemical and biological activity of bioactive nanoemulsions (O/W) incorporated with the essential oil obtained by cross-extraction of *Citrus limonia* and *Laurus nobilis*. OEs were extracted by hydrodistillation. The chemical constituents of *C. limonia* EO and *L. nobilis* EO were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The determination of the total phenolic compounds of the EO was performed by the Folin-Ciocalteu method and expressed as tannic acid equivalent. The nanoemulsions were prepared by the low energy method of phase inversion. Antioxidant activity was performed by the hydroxyl radical decolorization method. The anti-inflammatory action was evaluated by the protein albumin denaturation method. The total phenolic content was 252.35 mg TAE g<sup>-1</sup> for EO of *C. limonia* and *L. nobilis*. The EO obtained by crossing and its nanoemulsions (NEO 1, NEO 2 and NEO 3) presented, respectively, in the assay of antioxidant activity a EC<sub>50</sub> of 85.20 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 77.23 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 88.13 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 45.30 mg L<sup>-1</sup>, and anti-inflammatory potential, with EC<sub>50</sub> of 161.84 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 220.07 mg L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> of 186.85 mg L<sup>-1</sup> and EC<sub>50</sub> of 252.67 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The antioxidant and anti-inflammatory action of the EO obtained by crossing the studied species as well as an increase in its potential when incorporated into nanoemulsions was confirmed. Bringing expressive and unprecedented results, its application is appreciated and deeper studies encouraged due to its biotechnological potential.

**Keywords:** *Citrus*, *Laurus*, Essential oil, Nanoemulsion, Phenols.

## 25 INTRODUCTION

26 Medicinal plants express their chemical individuality through the production of secondary metabolites,  
27 which are directly linked to their defenses and development [1]. They have substances that have been used  
28 since ancient times as a form of treatment, and when talking about some isolated ethnicities and cultures it  
29 is the only resource for health care in the treatment of a series of illnesses and have been studied within  
30 pharmacology, especially in the production of drugs [2, 3, 4, 5].

31 Among the bioproducts obtained from medicinal plants, essential oils stand out as complex volatile or  
32 ether mixtures present in plants, found in plant organs, normally produced by secretory cells or groups of  
33 cells. They can present different chemical composition and odors when obtained from distinct parts of the  
34 same plant, as well as undergo changes in their constituents due to differences in climatic and environmental  
35 conditions and parameters, and agronomic factors in which they are found, influencing their quality [6, 7].

36 Through the assumption for the selection of the species to be investigated, this study sought in the  
37 literature medicinal plants with different chemical compositions that still had no reported studies for synergies  
38 of biological activity, as well as the action of formulations from their essential oils. As a result, the species  
39 *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L. were selected.

40 *Citrus limonia* Osbeck popularly known as pink lemon or lemon-clove, is a fruit of the genus *Citrus*, a  
41 hybrid originally from India that has adapted to the varied climatic conditions of Brazil [8]. Its leaves and juice  
42 are used to combat colds and coryza through infusions, and has biological activities known for this species  
43 as: antibacterial and larvicidal that has as its major compound limonene [9, 10]. Studies point out that the  
44 essential oils pericarp of citrus fruits have potential for treating various pathological conditions [11].

45 *Laurus nobilis* which is a plant belonging to the Lauraceae family, native to Europe and widely used in  
46 cooking and folk medicine [12], has its leaves rich in terpenic compounds such as cineol, linalool and eugenol,  
47 with various biological activities, among them are anticancer, antimicrobial, herbicidal and insecticidal,  
48 antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, healing, molluscicidal and neuroprotective activities [13, 14, 15].  
49 There have been reports that the leaves and fruits of *Laurus nobilis* L. have aromas stimulants and narcotic  
50 properties [16].

51 The compounds present in both plants presented in this study can promote biological actions, being able  
52 to interact in different target molecules [17]. Thus, it is necessary to search for alternatives to treatment  
53 combined with the emergence of diseases and infections together with increased resistance of existing ones,  
54 resistance that can occur by different mechanisms and one of them is due to the exacerbated use of  
55 conventional drugs and treatments [18, 19, 20].

56 Studies indicate an increase in the potential of the action of natural hydrophobic bioactives when working  
57 with nanoemulsions [21, 22] and present advantages such as: protection against chemical degradation, water  
58 solubility and controlled release avoiding the loss of control due to evaporation of essential oils, reduction of  
59 the particle size, boosts the bioactive potential of essential oils, considerably decreasing the concentration  
60 for biological action [23, 24].

61 Nanoemulsions are thermodynamically stable colloidal dispersion systems in which two immiscible  
62 liquids are mixed to form a single phase by means of an appropriate surfactant and are important vehicles  
63 for the distribution of bioactive compounds [25, 21], uniting the concept of natural products with the  
64 technological system [23].

65 There are still no reports about works focusing on the biological action of essential oils obtained by cross-  
66 extraction of *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L. In view of the above, the study aimed to evaluate  
67 in a new way the antioxidant and anti-inflammatory action of the nanoemulsion of *the crossed essential oil of*  
68 *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L.

## 69 MATERIAL AND METHODS

### 70 Obtaining plant material

71 The samples of *Citrus limonia* Osbeck bark and *Laurus nobilis* L. leaves used in this research were  
72 acquired in August 2021. *Citrus limonia* Osbeck bark and *Laurus nobilis* L. leaves were collected in the  
73 municipality of São Luís - MA. After collection, the plant species were transported to the Laboratório de  
74 Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), where they were weighed, crushed and stored  
75 for the extraction of essential oil.

### 76 Essential oil

For extract the essential oil, the hydrodistillation technique was applied with a glass Clevenger extractor coupled to a round bottom flask conditioned on an electric blanket as a heat generating source. 50g of each of the two plant materials were used in the same round-bottomed flask, adding distilled water in the proportion of (1:8). Hydrodistillation was conducted at 100°C for 3h and immediately after the extracted essential oil was collected. The essential oil was dried by percolation with anhydrous sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and centrifuged. These operations were performed in triplicates and the samples were stored in amber glass bottles under 4°C refrigeration. Subsequently submitted to analyses. The species used were also extracted individually and submitted to all the same analyses and essential oil processes obtained by the cross-process.

### Chemical constituents

The constituents of essential oils were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). 1.0 mg of the sample was dissolved in 1000  $\mu\text{L}$  dichloromethane (purity 99.9%).

The conditions of analysis were as it follows: Method: Adams. M; Volume injected: 0.3  $\mu\text{L}$ ; Column : HP-5MS capillary (5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane) (DB-5MS equivalent or CP-Sil 8CB LB/MS), in dimensions (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ); Drag gas : He (99.9995); 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Injector: 280°C, Split mode (1:10); Oven: 40°C (5.0 min.) to 240°C at a rate of 4°C  $\text{min}^{-1}$ , from 240°C to 300°C (7.5 min) at a rate of 8°C. $\text{min}^{-1}$ ; tT= 60.0 min; Detector: IN; EI (70 eV); Scan mode (0.5 sec  $\text{scan}^{-1}$ ); Mass range: 40-500 daltons (one); Transfer line: 280°C; Filament: off 0.0 to 4.0 min; Linear quadrupole type mass spectrometer. For the identification of the compounds in the sample the program AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System) was used.

### Spectrophotometric determination total phenolics

The determination of the total phenolic compounds of the essential oil was performed with adaptation of the Folin-Ciocalteu method [26]. 5 mg of the essential oil diluted in 1 mL of ethanol was used. To this solution were added 7 mL of distilled water, 800  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent (10% v/v) and 2.0 mL of sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20% m/v). After two hours, the reading was performed in a UV-VIS spectrophotometer at a length of 760 nm. The standard curve was expressed in  $\text{mg L}^{-1}$  of tannic acid equivalents (TAE).

### Preparation of nanoemulsions by phase inversion method

The preparation of nanoemulsions was performed according to the adapted methodologies described by [27, 28, 29, 30]. The oil-in-water nanoemulsions were formulated with essential oil (5% v/v), non-ionic surfactant (Tween 20, 5%, 10% and 15% v/v) and water. The required amounts of each constituent of the oily phase (oil + Tween 20) were heated at  $65 \pm 5^\circ\text{C}$ . The aqueous phase was heated separately at  $65 \pm 5^\circ\text{C}$ , providing a primary formulation by the phase inversion method.

The final homogenization was achieved by using a magnetic stirrer, in which the formulation remained in constant agitation at 6000 rpm, until reaching the temperature reduction to  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . The nanoemulsions obtained were taken to the ultrasonic bath at  $60^\circ\text{C}$  for 380 s.

In order to prove stability, the formulated nanoemulsion was submitted to different stress tests [31]. Heating-cooling cycle: the formulated nanoemulsion was maintained at 40 and  $4^\circ\text{C}$ , alternating each temperature for 48 h. The cycle was repeated three times. Freezing-thawing stress: the nanoemulsion was alternated at  $-21$  and  $25^\circ\text{C}$  for 48 h at each temperature. The cycle was repeated three times. The formulations that passed the thermodynamic stress tests were taken for further analyses.

### Antioxidant activity by decolorization of hydroxyl radicals

The antioxidant activity was performed using the spectrophotometric method of elimination of hydroxyl radicals from salicylic acid according to the methods described by [32, 33].

The nanoemulsions and essential oils at different concentrations of 10-100  $\text{mg L}^{-1}$  were dissolved in distilled water and DMSO 0.2%, respectively. 1 mL of salicylic acid (9 mM), 1 mL of ferrous sulfate (9 mM) and 1 mL of hydrogen peroxide (9 mM) were added to these concentrations. Ascorbic acid was used as a positive standard. The reaction mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min in bain marie; after incubation, the absorbance of the mixtures was measured at 510 nm using a UV/VIS spectrophotometer and the  $\text{EC}_{50}$  calculated.

### Anti-inflammatory activity by protein denaturation of albumin

Anti-inflammatory activity was evaluated by the protein denaturation method [34]. The reaction mixture (4 mL) consisted of 2 mL of different concentrations of essential oil and nanoemulsions (100-500 mg L<sup>-1</sup>) and 2 mL of a 10% solution of albumin diluted in PBS and incubated at (37±1) °C for 15 min.

Denaturation was induced by keeping the reaction mixture at 60°C in a bain-marie for 10 minutes. After cooling, the absorbance was measured at 660 nm. The inhibition of protein denaturation was expressed as a percentage and Efficient Concentration 50% (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) capable of inhibiting 50% of denaturation was expressed in mg L<sup>-1</sup>.

## RESULTS

### Chemical constituents

According to the results obtained, Table 1 presents the compounds identified in the essential oil extracted from the peels of *Citrus limonia* Osbeck and in Table 2 the compounds identified in the essential oil extracted from the leaves of *Laurus nobilis* L. As seen in Table 1, 9 components were identified in the EO sample of *Citrus limonia*, with predominance of the class of monoterpenes, being the majority constituent of essential oil limonene with 40.25% of the composition, followed by β-pinene (29.36%) and cymene (16.33%).

**Table 1.** Chemical composition of the essential oil of *Citrus limonia* Osbeck.

Retention time (min)	Compounds	%	Class
3.54	α-pinene	4.52	Monoterpene
4.09	β-pinene	29.36	Monoterpene
4.21	Myrcene	0.55	Monoterpene
4.69	Limonene	40.25	Monoterpene
4.71	Cymene	16.33	Monoterpene
5.90	Linalool	0.94	Monoterpene
7.90	Citral	0.89	Monoterpene
10.46	α-bergamotene	3.66	Sesquiterpene
11.40	β-bisabolene	3.50	Sesquiterpeno

**Source:** Authors (2021).

As can be seen in Table 2, 12 components were identified in the sample, with the majority constituent of the EO being isoeugenol with 64.36%, followed by myrcene (12.1%), chavicol (10.22%) and linalool (3.6%).

**Table 2.** Chemical composition of essential oil of *Laurus nobilis* L.

Retention time (min)	Compounds	%	Class
5.89	α-pinene	0.39	Monoterpene
7.55	Myrcene	12.1	Monoterpene
8.71	p-cymene	1.15	Monoterpene
8.81	Limonene	3.1	Monoterpene
9.03	Eucalyptol	0.63	Monoterpene
9.50	β-ocimene	0.3	Monoterpene
11.50	Linalool	3.6	Monoterpene
14.91	Terpinen-4-ol	0.99	Monoterpene
15.51	α-Terpineol	0.71	Monoterpene
18.44	Chavicol	10.22	Phenylpropanoid
23.22	Isoeugenol	64.36	Phenylpropanoid
25.69	Caryophyllene	2.45	Sesquiterpene

**Source:** Authors (2021).

### 148 Total phenolic content (TPC)

149 The results of phenolic content of essential oils referring to the species of *C. limonia* and *L. nobilis*, as  
 150 well as their bioproducts obtained by their cross-extraction, are presented in Table 3. Phenolic content (TPC)  
 151 was expressed as tannic acid equivalent (mg TAE g<sup>-1</sup> of plant material) in which an equation of the straight  
 152  $y = 0.0586x + 0.600$  with  $R^2 = 0.9998$  was obtained, where  $y$  represents the absorbance and  $x$  the  
 153 concentration of tannic acid equivalents.

154 **Table 3.** Total phenolic content of the essential oil from *C. limonia* e *L. nobilis*.

Essential Oil	TPC (mg TAE g <sup>-1</sup> )	Linear Equation	R <sup>2</sup>
<i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	252.35	$y = 0.0586x + 0.0600$	0.9998
<i>C. limonia</i>	306.47		
<i>L. nobilis</i>	221.79		

155 **Source:** Authors (2021).

### 157 Antioxidant activity

158 Table 4 shows the results related to the antioxidant capacity of essential oils and stable nanoemulsions  
 159 of *C. limonia* and *L. nobilis*, as well as the bioproducts obtained by their cross-extraction referring to the  
 160 Efficient Concentration 50% (EC<sub>50</sub>) in mg L<sup>-1</sup>, from the decolorization hydroxyl radicals method.

161 **Table 4.** Antioxidant capacity of essential oils and nanoemulsions.

Identification	Linear Equation	EC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
EO <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 217.17x - 369.23$	85.20	0.9983
EO <i>C. limonia</i>	$y = 115.72x - 171.79$	59.44	0.9941
EO <i>L. nobilis</i>	$y = 74.376x - 87.373$	70.31	0.9969
NEO 1 <i>C. limonia</i>	$y = 129.53x - 187.87$	68.61	0.9945
NEO 2 <i>C. limonia</i>	$y = 93.037x - 113.42$	57.08	0.9984
NEO 3 <i>C. limonia</i>	$y = 50.293x - 36.601$	52.71	0.9955
NEO 1 <i>L. nobilis</i>	$y = 59.161x - 51.578$	52.12	0.9815
NEO 2 <i>L. nobilis</i>	$y = 18.977x + 22.12$	29.45	0.9985
NEO 3 <i>L. nobilis</i>	$y = 17.414x + 30.337$	13.46	0.9969
NEO 1 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 96.165x - 131.54$	77.23	0.9977
NEO 2 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 52.525x - 52.168$	88.13	0.9998
NEO 3 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 40.315x - 16.765$	45.30	0.9984

162 **Source:** Authors (2021). **Note:** EO – Essential Oil; NEO – Stable nanoemulsion of essential oil formulated by phase  
 163 inversion; 1 – Nanoemulsion composition 5% essential oil, 5% Tween 20 and 90,0% H<sub>2</sub>O; 2 – Nanoemulsion  
 164 composition 5% essential oil, 10% Tween 20 and 85% H<sub>2</sub>O; 3 – Nanoemulsion composition 5% essential oil, 15%  
 165 Tween 20 and 80% H<sub>2</sub>O.

### 167 Anti-inflammatory activity

168 Table 5 shows the results related to the capacity of anti-inflammatory action of essential oils and stable  
 169 nanoemulsions of *C. limonia* and *L. nobilis*, as well as the bioproducts obtained by their cross-extraction  
 170 referring to the Efficient Concentration 50% (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) in mg L<sup>-1</sup>, from the protein albumin denaturation  
 171 method.

172 **Table 5.** Anti-inflammatory action of essential oils and nanoemulsions.

Identification	EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Linear Equation	R <sup>2</sup>
EO <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	161.84	y = 128.08x – 232.94	0.9987
EO <i>C. limonia</i>	431.16	y = 54.883x – 94.597	0.9933
EO <i>L. nobilis</i>	150.49	y = 91.481x – 149.2	0.9971
NEO 1 <i>C. limonia</i>	305.98	y = 59.091x – 96.882	0.9997
NEO 2 <i>C. limonia</i>	187.50	y = 58.156x – 82.189	0.9844
NEO 3 <i>C. limonia</i>	279.67	y = 99.397x – 193.19	0.9839
NEO 1 <i>L. nobilis</i>	153.02	y = 41.908x – 41.558	0.9904
NEO 2 <i>L. nobilis</i>	258.39	y = 137.53x – 281.76	0.9975
NEO 3 <i>L. nobilis</i>	374.29	y = 35.019x – 40.111	0.9999
NEO 1 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	220.07	y = 128.85x – 251.84	0.9976
NEO 2 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	186.85	y = 114.37x – 209.79	0.9888
NEO 3 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	252.67	y = 171.18x – 361.7	0.9917

**Source:** Authors (2021). **Note:** EO – Essential Oil; NEO – Stable nanoemulsion of essential oil formulated by phase inversion; 1 – Nanoemulsion composition 5% essential oil, 5% Tween 20 and 90,0% H<sub>2</sub>O; 2 – Nanoemulsion composition 5% essential oil, 10% Tween 20 and 85% H<sub>2</sub>O; 3 – Nanoemulsion composition 5% essential oil, 15% Tween 20 and 80% H<sub>2</sub>O.

## DISCUSSION

### Chemical constituents

The chemical composition of the EO of the barks of *C. limonia* was similar to other *Citrus* species, such as *C. aurantifolia* and *C. limon* described in the literature previously by [35]. The percentage of limonene is within the expected value for citrus species that can reach 30 to 80% of the total composition [36, 11].

Close results are reported by [37], who identified 18 compounds and observed the presence of limonene in 40.0% of the composition oil of the oil from the leaves of *C. limonia* collected in the region of Rio Verde-GO, and by [10], which also found 18 chemical constituents, having as most abundant the limonene,  $\beta$ -pinene and m-cymene, finding a percentage of 44.75% of limonene for oil samples from the barks of *C. limonia* obtained in the municipality of São José de Ribamar-MA, both chemical characterizations performed through gas chromatographic analysis coupled to mass spectrometry.

However, divergent results for the citrus species studied regarding the amounts of limonene are also observed in previous studies from different places, such as those pointed out by: [9, 11, 35, 38] which presented, respectively, a percentage of 33.67%, 65.7%, 65.69% and 82% of limonene compound. The variability in the chemical composition of essential oils, as well as their quantitative, may be due to the influence of intrinsic and extrinsic factors to which the plant is subjected, as well as its seasonality and age [39, 40, 41].

The substances identified in the GC-MS of the essential oil studied, limonene,  $\beta$ -pinene and linalool are described in the literature because they have the most varied biological activities [42, 43, 44]. And [45], as well as [46] reported on the effects of synergism and/or antagonism of chemical constituents, even in minority percentages in essential oils, show the increase in biological activities starting from synergistic interactions between the most diverse components of a plant or combinations among them.

The components identified in the EO of the leaves of *L. nobilis* in this study are in agreement with those highlighted by [47], who identified 26 chemical components when analyzing the essential oil of *L. nobilis*, also having as main isoeugenol (53.5%), followed by myrcene (16.6%) and chavicol (10.2%), and differ from those presented by [48] in which the results showed as main constituents for the EO obtained from the leaves of *Laurus nobilis* the 1,8-cienol (41.1%), sabinene (6.96%),  $\alpha$ -pinene (5.94%), humulene epoxide II (5.73%) and  $\alpha$ -terpinyl acetate (5.72%). The differences in the essential oil composition in this study and in the other literatures may be due to a number of factors, from the method of processing and extraction of oils to soil characteristics, among others.

The influence of the geographical location and part of the plant used to obtain the oil can be proven by the studies conducted by [16], where they analyzed the EO extracted from the leaves and fruits of *L. nobilis*,



collected from trees cultivated on the campus of the University of Jordan, and obtained differences in quantitative and chemical constituents. Resulting in the identification of 37 compounds for leaves EO, with 1.8-cineole (36.8%),  $\alpha$ -terpinyl acetate (14.6%) and terpinen-4-ol (6.4%) being the main components, while the fruits contained 45 substances, with 29.8% of 1.8-cineol, 6.2% of  $\beta$ -elemene, 5.6% of  $\alpha$ -terpinil acetate and 1.5% of  $\gamma$ -terpineol, being the majority. And [49] identified in the EO obtained from the twigs of *L. nobilis*, cultivated in Bulgaria, 37 volatile constituents being 1.8-cineole (48.5%),  $\alpha$ -terpinil acetate (13.1%) and methyl eugenol (6.6%) the most abundant.

The chromatographic analysis in this study did not identify eugenol, a compound constantly found in this vegetable, but has its isomer (isoeugenol) as the majority, which is also a phenolic compound with various biological properties, as indicated [50, 51]. And although the majority compounds may vary, the literature shows that the EO of this species consists of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids [52, 53, 54], corroborating the results obtained.

### Total phenolic content (TPC)

In accordance with Table 3, the oils used in this study presented an important quantity of phenolic compounds, being noted for the content presented in the oil extracted from the two species that was 252.35 mg TAE g<sup>-1</sup>, noting a high increase in its quantity when compared to the phenolic content presented by *L. nobilis* oil, under the same conditions.

The results obtained for the essential oils under study reveal a higher phenolic content when compared to that obtained by [8], which reported for the total phenolic content for hydroalcoholic extracts of the barks of *C. limonia* a quantity of 196.05  $\pm$  7.67 and 188  $\pm$  7.22 mg GAE g<sup>-1</sup>. And the values obtained in studies of other plants of the same genus as those of [55] that obtained a quantity of 92.08  $\pm$  0.02 mg TAE g<sup>-1</sup> for extract of *Citrus deliciosa* peels and [56] that found for extracts of *Citrus x paradisi* and *Citrus reticulata* peels, respectively, values 162  $\pm$  17.36 mg GAE g<sup>-1</sup> and 121  $\pm$  11.89 mg GAE g<sup>-1</sup>.

Regarding the result obtained for *Laurus nobilis*, [57] pointed out a lower total phenolic content of 174.1  $\pm$  11.6 mg GAE g<sup>-1</sup>, for methanolic extract of *Laurus nobilis*. [58] described for *Laurus nobilis* extracts, obtained via microwave assisted extraction (MAE), a total phenolic content also lowers with a variation of 30.88 to 53.57 mg GAE g<sup>-1</sup> and [59] with 21.56 mg GAE g<sup>-1</sup> also obtained via microwave assisted extraction (MAE).

According to [60] and [61], phenolic compounds show high antioxidant activity *in vitro*, and encompass polar components. And [62] point out that these compounds act as antioxidants, not only because of their ability to donate hydrogen atoms or electrons, but also because of their stable intermediate radicals, which prevent the oxidation of many food ingredients, especially lipids.

It is also described by [63] about the ability that phenolic compounds have to inhibit enzymes active in the course of the inflammatory process. As well, [39] discusses the action of these compounds as antioxidant regulators of cells through the absorption of radiation from their synthesis. The total phenolic contents pointed out in this study can barely be found in the literature, which further emphasizes the importance of this study, mainly due to its beneficial implications related to human health.

### Antioxidant activity

In agreement with Table 4, all essential oils and formulations of nanoemulsions developed by this method presented significant values, proving an effective action and being classified as active, according to the criterion established by [64], which establishes that natural products with EC<sub>50</sub> less than 500 mg L<sup>-1</sup> are defined as active.

With emphasis on nanoemulsions with formulations NEO 3 *L. nobilis* and NEO 2 *L. nobilis* and nanoemulsion NEO 3 *C. limonia* and *L. nobilis* that presented the lowest values for EC<sub>50</sub>. Thus, it is understood that in general, the nanoemulsions significantly increased the potential/efficiency of the action of antioxidant activity, thus proving the existence of an increase in biological potential when worked on nanoemulsions described in the literature. According to [65], the antioxidant activity of a vegetable compound is inversely proportional to the values of EC<sub>50</sub>, in which the lower concentration indicates a greater capacity of the oil to reduce the hydroxyl radical by 50%.

This study also describes in an unprecedented way an essential oil obtained from a cross-extraction, which underscores the importance of this work.

260 However, there are studies that report the performance of plants of the same species and/or the essential  
261 oils individually of *C. limonia* and *L. nobilis* and of the major compounds (limonene,  $\beta$ -pinene), (1.8 cineol,  
262 eugenol), respectively, as antioxidant agents. The literature indicates that species of *Citrus* genus usually  
263 have a good antioxidant activity, such as [66] that studied the essential oil potential of *Citrus medica* L. var.  
264 *Sacodactylis* and the essential oil nanoemulsified by the spontaneous emulsification method, pointing out an  
265 increase in the potential 51.6% for the nanoemulsion and 30.5% of the oil when worked at concentrations of  
266 0.12 mg/mL by DPPH assay.

267 This study showed higher results in relation to the essential oil of *L. nobilis* than those presented by [67],  
268 which obtained an antioxidant activity with  $IC_{50}$  of 4.749 mg mL<sup>-1</sup> using the DPPH method, and by [68] who  
269 obtained a  $IC_{50}$  of 4.00 mg mL<sup>-1</sup> for the essential oil of *L. nobilis* obtained through the steam-dragging method.  
270 Also, according to [60] the action of *L. nobilis* essential oil obtained an inhibited with  $IC_{50}$  of 72.78  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> by  
271 DPPH assay and a  $EC_{50}$  of 14.66  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> by FRAP assay.

272 According to [69], the antioxidant activity of terpenes presents in essential oils, as well as those obtained  
273 in this study, are related to the presence of conjugated double bonds, which occur through the mechanism  
274 of chain breaking, for the removal of free radicals, which according to [70] are defined as substances capable  
275 of delaying or inhibiting the oxidation of oxidizable substrates, and may act in food or biological systems,  
276 showing that the results presented in this study are promising.

### 277 **Anti-inflammatory activity**

278 According to Table 5, all bioproducts tested showed anti-inflammatory action, with the EO of *L. nobilis*  
279 having the lowest  $EC_{50}$ , followed by NEO 1 *L. nobilis*, EO of *C. limonia* and *L. nobilis*, and NEO 2 *C. limonia*  
280 and *L. nobilis*.

281 In the literature, it was also not possible to find data regarding the anti-inflammatory activity of the  
282 essential oil related to this type of synergy presented in this study, obtained by cross-extraction of these  
283 species, and their respective nanoemulsions used in these tests. Demonstrating how much this work is  
284 necessary for further studies.

285 But the use of this type of synergy is shown to be favorable as an anti-inflammatory, because [71]  
286 describe that the synergy of phenolic compounds can exert several anti-inflammatory actions acting in various  
287 ways, while generally drugs have been acting in a specific way.

288 The anti-inflammatory action pointed out for the species under study was also observed in the study  
289 of [11] using models with *in vivo* tests in mice, through formalin-induced paw licking and carrageenan-induced  
290 inflammation in the subcutaneous air pouch (SAP) model, presented satisfactory results for the EO of *C.*  
291 *limonia* with doses of 100 mg kg<sup>-1</sup>, while [72] also using *in vivo* test obtained results with doses of 2 mg kg<sup>-1</sup>  
292 for essential oil of *L. nobilis*.

293 Other nanoemulsions are described in the literature for other plant species, but with lower results,  
294 such as [73] who reported a significant anti-inflammatory action of the nanoemulsion of the essential oil of  
295 the shoots of *Araucaria bidivillii*, in the model of carrageenan-induced rat paw edema, in the oral pathways  
296 of 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>. Using the same *in vivo* method, [74] presented a study with a dose efficacy of 498 mg  
297 kg<sup>-1</sup>, for a nanoemulsion containing essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.

298 According to [75] and [76] protein denaturation is related as a cause of the release of pro-inflammatory  
299 mediators from the body for its defense. They induce inflammatory responses that can harm organs and  
300 systems, causing disease or tissue damage. And according to [77], anti-inflammatory drugs are intended to  
301 soften or prevent an inflammatory reaction.

### 302 **CONCLUSION**

303 The chemical analysis by (GC-MS) quantified limonene as the major of the EO of *C. limonia* and  
304 isoeugenol as the main compound present in the EO of *L. nobilis*. The essential oil obtained by extraction of  
305 *Citrus limonia* Osbeck and *Laurus nobilis* L., as well as their nanoemulsions, showed unprecedented and  
306 satisfactory results in relation to all *in vitro* assays applied, such effects may be due to the phenolic  
307 compounds present or to the synergism among the chemical constituents present in the EO's. Thus, justifying  
308 future research of the studied oils and their respective nanoemulsions for proper application due to their high  
309 biotechnological potential, as well as the expansion of the study of new synergies.

310 **Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors sincerely thanks to Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV-UFMA) and Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

**Conflicts of Interest:** The Authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Mirahmadi SF, Sefidkon F, Aalifar M, Akramian M. Essential Oil Composition of *Tanacetum polycephalum* subsp. *duderanum* (Boiss) Podl., A Plant Endemic from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2011;14(6):742–5.
2. Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*. 2005;28(3):519–28.
3. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):131–4.
4. Saraiva ME, Ulisses AVR de A, Ribeiro DA, Oliveira LGS de, Macêdo DG de, Sousa F de FS de, et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 171:141–53.
5. Bobbo Moreski D, Giacomini Bueno F, Vieira de Souza Leite-Mello E. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*. 2018;22(1).
6. Steffens AH. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial [dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul; 2010.
7. Silva DT da. Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2013.
8. Migliorini AA, Contador MH, Carvalho FK, Marques JA. Polifenóis do limão-cravo: otimização do processo de extração. XXV Encontro Anual de Iniciação Científica & II Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior. 2016.
9. Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2014;16(1):18–24.
10. Gomes PRB, Sousa DA de, Everton GO, Fontenele MA, Marques JNL e, Freitas AC de, et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Citrus limonia* Osbeck bark essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2020;14(7):354–8.
11. Amorim JL, Simas DLR, Pinheiro MMG, Moreno DSA, Alviano CS, da Silva AJR, et al. Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153643.
12. Caputo L, Nazzaro F, Souza LF, Aliberti L, De Martino L, Fratianni F, et al. *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules*. 2017;22(6):930.
13. Alejo-Armijo A, Altarejos J, Salido S. Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*). *Natural Product Communications*. 2017;12(5):1934578X1701200.
14. Ovidi E, Laghezza Masci V, Zambelli M, Tiezzi A, Vitalini S, Garzoli S. *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. *Plants*. 2021;10(4):707.
15. Guedouari R, Nabiev M. Anti-inflammatory activity of different extracts from *Laurus nobilis* growing in Algeria. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*. 2021;7(4).
16. Abu-dahab R, Kasabri V, Afifi FU. Evaluation of the Volatile Oil Composition and Antiproliferative Activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on Breast Cancer Cell Line Models. *Records of Natural Products*. 2014;8(2) :136-147.
17. Barbosa LN, Probst I da S, Teles Andrade BFM, Bérnago Alves FC, Albano M, Ribeiro de Souza da Cunha M de L, et al. *In vitro* Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. *Journal of Oleo Science*. 2015;64(3):289–98.
18. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006;34(5):S11–9.
19. Rice DAK, Mendez-Vigo L. Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2008;129(11):1495–504.
20. Fanin M, Balestrin Fanin ÉLB, Santos IC dos, Lima JS de, Gonçalves APP, Martins LDA. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*. 2020;14(1):24.
21. Kentish S, Wooster TJ, Ashokkumar M, Balachandran S, Mawson R, Simons L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):170–5.
22. Anwer MK, Jamil S, Ibnouf EO, Shakeel F. Enhanced Antibacterial Effects of Clove Essential Oil by Nanoemulsion. *Journal of Oleo Science*. 2014;63(4):347–54.

- 363 23. Faustino CG, de Medeiros FA, Ribeiro Galardo AK, Lobato Rodrigues AB, Lopes Martins R, de Medeiros Souza  
364 Lima Y, et al. Larvicide Activity on *Aedes aegypti* of Essential Oil Nanoemulsion from the *Protium heptaphyllum*  
365 Resin. *Molecules*. 2020;25(22):5333.
- 366 24. Felizardo MGAC, Pereira APM, Lima TP de, Sousa TL de, Guterres CVF, Oliveira JPM, et al. Chemical profile,  
367 stability, and fungicide activity of oil-in-water nanoemulsion (O / A) incorporated with Ba-har essential oil. *Ciência*  
368 e *Natura*. 2021;43:e57.
- 369 25. Shah P, Bhalodia D, Shelat P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*.  
370 2010;1(1):24.
- 371 26. Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2002; 6(1):11-8.
- 372 27. Lima TCP de, Almeida AF de, Pacheco de Oliveira EC, Silva Júnior JOC, Ribeiro Costa RM, Matos AP, et al.  
373 Desenvolvimento de nanogel de *Copaifera reticulata* sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. *Saúde*  
374 e *Pesquisa*. 2020;13(1):181–92.
- 375 28. Sugumar S, Clarke SK, Nirmala MJ, Tyagi BK, MukherjeeA, Chandrasekaran N. Nanoemulsion of eucalyptus oil  
376 and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of entomological research*, 2014;104(3):393-402.
- 377 29. Kubitschek-KM ARJ, Zero JM. Development of jojoba oil (*Simmondsia chinensis* (Link) CK Schneid.) based  
378 nanoemulsions. *Lat. Am. J. Pharm*, 2014;33(3):459-63.
- 379 30. Rodrigues E da CR, Ferreira AM, Vilhena JCE, Almeida FB, Cruz RAS, Florentino AC, et al. Development of a  
380 larvicidal nanoemulsion with *Copaiba* (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.  
381 2014;24(6):699–705.
- 382 31. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of  
383 ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(2):227–  
384 43.
- 385 32. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*.  
386 1989;28(4):1057–60.
- 387 33. Sundararajan R. In vitro antioxidant activity on roots of *Limnophila heterophylla*. *Free Radicals and Antioxidants*.  
388 2016;6(2):178–85.
- 389 34. Padmanabhan P, Jangle SN. Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination  
390 of four medicinal plants. *International journal of basic and applied medical sciences*, 2012;2(1):109-116.
- 391 35. Simas DLR, Amorim SHBM de, Oliveira JM de, Alviano DS, Silva AJR da. Characterization of essential oils of citrus  
392 fruits. *Citrus Research Technology*. 2015;36(1).
- 393 36. Ladaniya MS. Commercial fresh citrus cultivars and producing countries. *Citrus Fruit: Biology, Technology and*  
394 *Evaluation*. Academic Press, San Diego, 2008;13-65.
- 395 37. Estevam EBB, Miranda MLD, Alves JM, Egea MB, Pereira PS, Martins CHG, Esperandim, VR, et al. Composição  
396 química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia*  
397 *Tanaka* (Rutaceae). *Revista Virtual de Química*. 2016;8(6):1842–54.
- 398 38. Cavalcanti ESB, Morais SM de, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants  
399 against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):541–4.
- 400 39. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.  
401 *Química Nova*. 2007;30(2):374–81.
- 402 40. Natta L, Orapin K, Krittika N, Pantip B. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne  
403 bacteria. *International Food Research Journal*, 2008;15(3):337-346.
- 404 41. Silva PT, Santos HS, Teixeira AMR, Bandeira PN, Holanda CL, Vale JPC, et al. Seasonal variation in the chemical  
405 composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. *South*  
406 *African Journal of Botany*. 2019;124:329–32.
- 407 42. Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, Hyun CG. Chemical composition and biological activities of  
408 essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *Journal of Microbiology and*  
409 *Biotechnology*, 2008;18(1):74-79.
- 410 43. Moreira IJA, Serafini MR, Lucca Junior W, Ribeiro EAN, Filho VJS, Passos Junior DB, et al. PROSPECÇÃO  
411 TECNOLÓGICA DA UTILIZAÇÃO DO BETA-PINENO. *Revista Gestão, Inovação e Tecnologias*. 2013;3(2):186–  
412 94.
- 413 44. Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA, et al. Evaluation of  
414 Anti-Inflammatory Activity of *Citrus latifolia* Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models.  
415 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–8.

- 416 45. Neves BM, Bauermann L, Biegelmeyer R, Apel M. Avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de  
417 siphoneugena reitzii d.(myrtaceae) e de monoterpenos isolados. Salão de Iniciação Científica (20.: 2008 out. 20-  
418 24: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.
- 419 46. Casanova LM, Costa SS. Synergistic Interactions in Natural Products: Therapeutic Potential and Challenges.  
420 Revista Virtual de Química. 2017;575–95.
- 421 47. Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, et al. Antifungal activity, mode  
422 of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Archives of Oral  
423 Biology. 2017;73:179–85.
- 424 48. Tomar O, Akarca G, Gök V, Ramadan MF. Composition and Antibacterial Effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.)  
425 Leaves Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2020;23(2):414–21.
- 426 49. Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, et al. Chemical Composition and  
427 Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. Molecules. 2019;24(4):804.
- 428 50. Reis MM. Influência dos sistemas nanoestruturados na fotoestabilidade e na atividade antioxidante dos compostos  
429 fenólicos eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa  
430 Maria; 2012.
- 431 51. Rosa LLS, Galvão LFM, Neto HD, Nóbrega JR, Silva DF, Júnior FA. (2019). Isoeugenol efficacy against  
432 *Staphylococcus aureus*. Int. J. Dev. Res, 2019;9(10):30877-30879.
- 433 52. Basak SS, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on  $\alpha$ -glucosidase and  
434 reactive oxygen species scavenging activity. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 2013;12(2):367.
- 435 53. Cherrat L, Espina L, Bakkali M, García-Gonzalo D, Pagán R, Laglaoui A. Chemical composition and antioxidant  
436 properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their  
437 antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. Journal of the Science of Food  
438 and Agriculture, 2014;94(6), 1197-1204.
- 439 54. Peris I, Blázquez MA. Comparative GC-MS Analysis of Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) Essential Oils in Commercial  
440 Samples. International Journal of Food Properties. 2015;18(4):757–62.
- 441 55. Siahpoosh A, Javedani F. Antioxidative capacity of Iranian Citrus *deliciosa* peels. Free Radicals and Antioxidants.  
442 2012;2(2):62–7.
- 443 56. Li BB, Smith B, Hossain MdM. Extraction of phenolics from citrus peels. Separation and Purification Technology.  
444 2006;48(2):189–96.
- 445 57. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Nasr SB, El Beyrouthy M, & Mnif W. Phytochemical composition and antioxidant activity  
446 of Tunisian *Laurus nobilis*. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 2018;31(6):2397-2402.
- 447 58. Dobroslavić E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V. Polyphenolic characterization and  
448 antioxidant capacity of *Laurus nobilis* L. leaf extracts obtained by green and conventional extraction  
449 techniques. Processes, 2021;9(10):1840.
- 450 59. Rincón E, Balu AM, Luque R, Serrano L. Mechanochemical extraction of antioxidant phenolic compounds from  
451 Mediterranean and medicinal *Laurus nobilis*: A comparative study with other traditional and green novel techniques.  
452 Industrial Crops and Products. 2019;141:111805.
- 453 60. Goudjil MB, Ladjel S, Bencheikh SE, Zighmi S, Hamada D. Study of the chemical composition, antibacterial and  
454 antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. J. chem.  
455 pharm. res, 2015;7(1):379-385.
- 456 61. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo  
457 Lutz, 2007;66(1):1-9.
- 458 62. Silva MLC, Costa RS, Santana ADS, Koblitz MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em  
459 produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias. 2010 Sep 1;31(3):669.
- 460 63. Neves PDO. Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde [dissertação]. Fernando  
461 Pessoa: Universidade Fernando Pessoa; 2015
- 462 64. Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, da Cunha AP. Age-Induced Diminution of Free Radical  
463 Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids. Journal of Agricultural and  
464 Food Chemistry. 2003;51(3):742–5.
- 465 65. Sousa CM de M, Silva HR e, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade  
466 antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova. 2007;30:351–5.
- 467 66. Lou Z, Chen J, Yu F, Wang H, Kou X, Ma C, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil  
468 from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. LWT. 2017;80:371–7.

- 469 67. Ballen, S. C., Rigo, D., Paliga, M., Puton, B. M. S., Cansian, R. L., & Paroul, N. Determinação do potencial  
470 antioxidante (DPPH) e antimicrobiano de extratos vegetais e óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*).  
471 *Perspectiva*,2019;43(163):61-70.
- 472 68. Fernández N J, Damiani N, Podaza EA, Martucci JF, Fasce D, Quiroz F, et al. *Laurus nobilis* L. Extracts against  
473 *Paenibacillus* larvae: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi*  
474 *Journal of Biological Sciences*, 2019;26(5):906-912.
- 475 69. Wojtunik KA, Ciesla LM, Waksmundzka-Hajnos M. Model Studies on the Antioxidant Activity of Common Terpenoid  
476 Constituents of Essential Oils by Means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. *Journal of Agricultural and*  
477 *Food Chemistry*. 2014;62(37):9088–94.
- 478 70. Ferreira AM, Mouchrek Filho VE, Mafrá NSC, Sales EH, Santos Júnior PS, Everton GO. Constituintes químicos,  
479 toxicidade, potencial antioxidante e atividade larvívora frente a larvas de *Aedes aegypti* do óleo essencial de *Aniba*  
480 *rosaeodora* Ducke. *Research, Society and Development*. 2020;9(8).
- 481 71. Ambríz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: Natural alternative in  
482 inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2016;2(1):1131412.
- 483 72. Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential  
484 oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*. 2003;17(7):733–6.
- 485 73. Abdelhameed MF, Asaad GF, Ragab TI, Ahmed RF, El Gendy AENG, El-Rahman A, Elgamal AM, Elshamy AI.  
486 Oral and Topical Anti-Inflammatory and Antipyretic Potentialities of *Araucaria biduwillii* Shoot Essential Oil and Its  
487 Nanoemulsion in Relation to Chemical Composition. *Molecules*. 2021;26(19):5833.
- 488 74. Borges RS, Lima ES, Keita H, Ferreira IM, Fernandes CP, Cruz RAS, et al. Anti-inflammatory and antialgic actions  
489 of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical  
490 constituents. *Inflammopharmacology*. 2018; 26(1):183–95.
- 491 75. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated  
492 diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204–18.
- 493 76. Yesmin S, Paul A, Naz T, Rahman ABMA, Akhter SF, Wahed MII, et al. Membrane stabilization as a mechanism  
494 of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of *Choi* (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*. 2020;6(1).
- 495 77. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its  
496 phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*.  
497 2019; 229:29–45.
- 498



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Article - Biological and Applied Sciences

# Atividade química e biológica de nanoemulsão de óleo essencial obtido por extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L.

Received: YYYY.MM.DD; Accepted: YYYY.MM.DD.

\*Correspondence: brendha.araujo@discente.ufma.br; (B.A.S.)

## DESTAQUES

- Esta pesquisa apresenta pela primeira vez uma extração cruzada com duas espécies medicinais.
- O OE de *C. limonia* identifica o limoneno (40,25%),  $\beta$ -pineno (29,36%) e cimeno (16,33%), e o OE de *L. nobilis* identifica o isoeugenol (64,36%), mirceno (12,1%), chavicol (10,22%) e linalol (3,6%).
- O OE cruzado de *C. limonia* e *L. nobilis* tem um CFT de 252,35 mg EAT g<sup>-1</sup>.
- A nanoemulsão composta por OE cruzado de *C. limonia* e *L. nobilis*, de formulação NOE 3, tem sua atividade antioxidante classificada como muito ativa.
- O OE cruzado de *C. limonia* e *L. nobilis* e a suas nanoemulsões apresentam notável ação anti-inflamatória.

**Resumo:** Este estudo objetivou avaliar a atividade química e biológica das nanoemulsões bioativas (O/A) incorporadas com o óleo essencial obtido por extração cruzada de *Citrus limonia* e *Laurus nobilis*. Os OE's foram extraídos por hidrodestilação. Os constituintes químicos do OE de *C. limonia* e do OE de *L. nobilis* foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A determinação dos compostos fenólicos totais do OE foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalente de ácido tânico. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de baixa energia de inversão de fases. A atividade antioxidante foi realizada pelo método de descoloração de radicais hidroxila. A ação anti-inflamatória foi avaliada pelo método de desnaturação proteica de albumina. O conteúdo fenólico total foi de 252,35 mg EAT g<sup>-1</sup> para o OE de *C. limonia* e *L. nobilis*. O OE obtido por cruzamento e suas nanoemulsões (NOE 1, NOE 2 e NOE 3) apresentaram, respectivamente, no ensaio da atividade antioxidante uma CE<sub>50</sub> de 85,20 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 77,23 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 88,13 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 45,30 mg L<sup>-1</sup>, e potencial anti-inflamatório, com CE<sub>50</sub> de 161,84 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 220,07 mg L<sup>-1</sup>, CE<sub>50</sub> de 186,85 mg L<sup>-1</sup> e CE<sub>50</sub> de 252,67 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Comprovou-se ação antioxidante e anti-inflamatória do OE obtido por cruzamento das espécies estudadas e um aumento do seu potencial quando incorporados a nanoemulsões. Trazendo resultados expressivos e inéditos, sendo sua aplicação apreciada e estudos mais profundos incentivados em virtude do seu potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** *Citrus*, *Laurus*, Óleo essencial, Nanoemulsão, Fenóis.



## 26 INTRODUÇÃO

27 As plantas medicinais expressam sua individualidade química através da produção de metabólitos  
28 secundários, que estão diretamente ligados às suas defesas e desenvolvimento [1]. Elas possuem  
29 substâncias que são utilizadas desde a antiguidade como forma de tratamento, e quando se fala em algumas  
30 etnias e culturas isoladas chega a ser o único recurso para os cuidados da saúde no tratamento de uma  
31 série de doenças e vêm sendo estudadas dentro da farmacologia, principalmente na produção de fármacos  
32 [2, 3, 4, 5].

33 Dentre os bioprodutos obtidos de plantas medicinais, destacam-se os óleos essenciais sendo misturas  
34 complexas voláteis ou etéreos presentes nas plantas, encontrados nos órgãos das plantas, produzidos  
35 normalmente por células secretoras ou grupos de células. Podem apresentar composição química e odores  
36 distintos quando obtidos de diferentes partes de um mesmo vegetal, assim como sofrer alterações em seus  
37 constituintes devido as diferenças das condições e parâmetros climáticos, ambientais e fatores agrônômicos  
38 em que se encontram sofrendo influência em sua qualidade [6, 7].

39 Através do pressuposto para seleção das espécies a ser investigado, este estudo buscou na literatura  
40 plantas medicinais com diferentes composições químicas que ainda não havia estudos relatados para  
41 sinergias de atividade biológica, bem como ação de formulações a partir de seus óleos essenciais. Como  
42 resultado foram selecionadas as espécies *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L.

43 *Citrus limonia* Osbeck popularmente conhecido como limão rosa ou limão-cravo, é um fruto do gênero  
44 *Citrus*, um híbrido originário da Índia que se adaptou às variadas condições climáticas do Brasil [8]. Suas  
45 folhas e suco são utilizadas no combate a resfriados e corizas através de infusões, e possui atividades  
46 biológicas conhecidas para essa espécie como: antibacteriana e larvicida que tem como composto  
47 majoritário o limoneno [9, 10]. Estudos apontam que os óleos essenciais do pericarpo de frutas cítricas  
48 apresentam potencial para tratamento de diversas condições patológicas [11].

49 *Laurus nobilis* L. que é uma planta pertencente à família Lauraceae, nativo da Europa e amplamente  
50 utilizado na culinária e medicina popular [12], tem suas folhas ricas em compostos terpênicos como cineol,  
51 linalool e eugenol, com diversas atividades biológicas, dentre elas têm-se atividade anticancerígena,  
52 antimicrobiana, herbicida e inseticida, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, cicatrizante, moluscicida  
53 e neuroprotetoras [13, 14, 15]. Têm relatos que as folhas e frutos de *Laurus nobilis* L. possuem aromas  
54 estimulantes e propriedade narcóticas [16].

55 Os compostos presentes em ambas as plantas apresentadas nesse estudo podem promover ações  
56 biológicas, sendo capazes de interagir em diferentes moléculas-alvo [17]. Com isto, torna-se necessário a  
57 busca por alternativas ao tratamento aliado no surgimento de doenças e infecções em conjunto com o  
58 aumento de resistência das já existentes, resistência essa que pode vir a ocorrer por diferentes mecanismos  
59 sendo uma delas devido ao uso exacerbado de medicamentos e tratamentos convencionais [18, 19, 20].

60 Estudos apontam um aumento no potencial da ação de bioativos naturais hidrofóbicos quando  
61 trabalhado com nanoemulsões [21, 22] e apresentam vantagens tais como: proteção contra degradação  
62 química, solubilidade em água e liberação controlada evitando a perda de controle devido evaporação dos  
63 óleos essenciais, diminuição do tamanho das partículas, impulsiona o potencial bioativo dos óleos  
64 essenciais, diminuindo consideravelmente a concentração para ação biológica [23, 24].

65 As nanoemulsões são sistemas de dispersão coloidal termodinamicamente estável em que dois líquidos  
66 imiscíveis são misturados para formar uma única fase por meio de um surfactante apropriado e são veículos  
67 importantes para a distribuição de compostos bioativos [25, 21], unindo o conceito de produtos naturais a  
68 sistema tecnológico [23].

69 Ainda não se tem relatos sobre trabalhos com foco na ação biológica de óleos essenciais obtidos por  
70 extração cruzada de *Citrus limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L. Diante do exposto, o estudo visou avaliar de  
71 forma inédita a ação antioxidante e anti-inflamatória da nanoemulsão do óleo essencial cruzado de *Citrus*  
72 *limonia* Osbeck e *Laurus nobilis* L.

## 73 MATERIAL E MÉTODOS

### 74 Obtenção do material vegetal

75 As amostras das cascas de *Citrus limonia* Osbeck e folhas de *Laurus nobilis* L. utilizados nesta pesquisa  
76 foram adquiridos no período de agosto de 2021. Foram coletadas cascas de *Citrus limonia* Osbeck e folhas  
77 de *Laurus nobilis* L. no município de São Luís - MA. Após a coleta, as espécies vegetais foram transportadas  
78 para o Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), onde foram pesadas,  
79 trituradas e armazenadas para a extração do óleo essencial.



## 80 **Extração do óleo essencial**

81 Para extração do óleo essencial, foi aplicada a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger  
82 de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de  
83 calor. Foram utilizadas 50g de cada um dos dois materiais vegetais ao mesmo balão de fundo redondo,  
84 adicionando-se água destilada na proporção de (1:8). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 3h e logo  
85 após recolheu-se o óleo essencial extraído. O óleo essencial foi seco por percolação com sulfato de sódio  
86 anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e centrifugado. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras  
87 armazenadas em vials de vidro âmbar sob refrigeração de 4°C. Posteriormente submetidos as análises. As  
88 espécies utilizadas também foram extraídas individualmente e submetidas a todas as mesmas análises e  
89 processos do óleo essencial obtido por processo cruzado.

## 90 **Constituintes químicos**

91 Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à  
92 espectrometria de massas (CG-EM). Foi dissolvido 1,0 mg da amostra em 1000  $\mu\text{L}$  de diclorometano (pureza  
93 99,9%).

94 As condições de análise foram as seguintes: Método: Adams. M; Volume injetado: 0,3  $\mu\text{L}$ ; Coluna :  
95 Capilar HP-5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano) (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), nas  
96 dimensões (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ); Gás de arraste : He (99,9995); 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Injetor: 280°C, modo  
97 Split (1:10); Forno: 40°C (5,0 min.) até 240°C numa taxa de 4°C  $\text{min}^{-1}$ , de 240°C até 300°C (7,5 min) numa  
98 taxa de 8°C. $\text{min}^{-1}$ ; tT= 60,0 min; Detector: EM; EI (70 eV); Modo varredura (0,5 seg  $\text{scan}^{-1}$ ); Faixa de massas:  
99 40-500 daltons (uma); Linha transferência: 280 °C; Filamento: desligado 0,0 a 4,0 min; Espectrômetro de  
100 massas tipo quadrupolo linear. Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa  
101 AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System).

## 102 **Determinação Espectrofotométrica de Fenólicos totais**

103 A determinação dos compostos fenólicos totais do óleo essencial foi realizada com adaptação do  
104 método de Folin-Ciocalteu [26]. Utilizou-se 5 mg do óleo essencial diluído em 1 mL de etanol. A esta solução  
105 foram adicionados 7 mL de água destilada, 800  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 2,0 mL de  
106 carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20% m/v). Após duas horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-  
107 VIS em comprimento de 760 nm. A curva padrão foi expressa em  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido tânico.

## 108 **Preparo das nanoemulsões por método de inversão de fases**

109 O preparo das nanoemulsões foi realizado de acordo com as metodologias adaptadas descritas por [27,  
110 28, 29, 30]. As nanoemulsões óleo-em-água foram formuladas com o óleo essencial (5%v/v), surfactante  
111 não iônico (Tween 20, 5%, 10% e 15% v/v) e água. As quantidades necessárias de cada constituinte da fase  
112 oleosa (óleo+Tween20) foram aquecidas a  $65 \pm 5$  °C. A fase aquosa foi aquecida separadamente a  $65 \pm$   
113 5 °C, proporcionando uma formulação primária, pelo método de inversão de fases.

114 A homogeneização final foi conseguida utilizando um agitador magnético, no qual a formulação  
115 permaneceu em agitação constante a 6000 rpm, até atingir a redução da temperatura para  $25 \pm 2$  °C. As  
116 nanoemulsões obtidas foram levadas ao banho ultrassônico a temperatura de 60 °C por 380s.

117 Para comprovar a estabilidade, a nanoemulsão formulada foi submetida a diferentes testes de estresse  
118 [31]. Ciclo de aquecimento-resfriamento: foi realizado mantendo a nanoemulsão formulada a 40 e 4 °C,  
119 alternando cada temperatura por 48 h. O ciclo foi repetido três vezes. Estresse de congelamento-  
120 descongelamento: nanoemulsão alternativamente a -21 e 25 °C por 48 h em cada temperatura. O ciclo foi  
121 repetido três vezes. As formulações que passaram nos testes de estresse termodinâmico foram levadas as  
122 análises posteriores.

## 123 **Atividade antioxidante por descoloração de radicais hidroxila**

124 A atividade antioxidante foi feita pelo método espectrofotométrico de eliminação de radicais hidroxila do  
125 ácido salicílico de acordo com os métodos descritos por [32, 33].

126 As nanoemulsões e os óleos essenciais em diferentes concentrações de 10-100  $\text{mg L}^{-1}$  foram  
127 dissolvidos em água destilada e DMSO 0,2%, respectivamente. Foram adicionadas a essas concentrações  
128 1 mL de ácido salicílico (9 mM), 1 mL de sulfato ferroso (9 mM) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (9 mM).  
129 Utilizou-se como padrão positivo ácido ascórbico. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 60 min

em banho-maria; após a incubação, a absorbância das misturas foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro UV/VIS e a  $CE_{50}$  calculada.

### Atividade anti-inflamatória por desnaturação proteica de albumina

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo método de desnaturação proteica [34]. A mistura reacional (4 mL) consistiu em 2 mL de diferentes concentrações do óleo essencial e das nanoemulsões (100-500 mg L<sup>-1</sup>) e 2 mL de uma solução a 10% de albumina diluída em PBS e incubado a (37±1) °C por 15 minutos.

A desnaturação foi induzida mantendo a mistura de reação a 60°C em um banho-maria de água por 10 minutos. Após o resfriamento, a absorbância foi medida em 660 nm. A inibição da desnaturação proteica foi expressa em percentual e a Concentração Eficiente 50% ( $CE_{50}/IC_{50}$ ) capaz de inibir 50% da desnaturação foi expressa em mg L<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS

### Constituintes químicos

De acordo com os resultados obtidos, a Tabela 1 apresenta os compostos identificados no óleo essencial extraído das cascas de *Citrus limonia* Osbeck e na Tabela 2 os compostos identificados no óleo essencial extraído das folhas de *Laurus nobilis* L. Como pode ser visualizado na Tabela 1, 9 componentes foram identificados na amostra do OE de *Citrus limonia*, com predominância da classe dos monoterpenos, sendo o constituinte majoritário do óleo essencial o limoneno com 40,25% da composição, seguido pelo β-pineno (29,36%) e cimeno (16,33%).

**Table 1.** Composição química do óleo essencial de *Citrus limonia* Osbeck.

Tempo de retenção (min)	Componente	%Teor	Classe
3,54	α-pineno	4,52	Monoterpeno
4,09	β-pineno	29,36	Monoterpeno
4,21	Mirceno	0,55	Monoterpeno
4,69	Limoneno	40,25	Monoterpeno
4,71	Cimeno	16,33	Monoterpeno
5,90	Linalol	0,94	Monoterpeno
7,90	Citral	0,89	Monoterpeno
10,46	α-bergamoteno	3,66	Sesquiterpeno
11,40	β-bisaboleno	3,50	Sesquiterpeno

Fonte: Autores (2021).

Como pode ser observado na Tabela 2, foram identificados 12 componentes na amostra, com o constituinte majoritário do OE sendo o isoeugenol com 64,36%, seguido por mirceno (12,1%), chavicol (10,22%) e linalol (3,6%).

**Table 2.** Composição química do óleo essencial de *Laurus nobilis* L.

Tempo de retenção (min)	Componente	%Teor	Classe
5,89	Data α-pineno	0,39	Monoterpeno
7,55	Mirceno	12,1	Monoterpeno
8,71	p-cimeno	1,15	Monoterpeno
8,81	Limoneno	3,1	Monoterpeno
9,03	Eucaliptol	0,63	Monoterpeno
9,50	β-ocimeno	0,3	Monoterpeno
11,50	Linalol	3,6	Monoterpeno
14,91	Terpinen-4-ol	0,99	Monoterpeno
15,51	α-Terpineol	0,71	Monoterpeno
18,44	Chavicol	10,22	Fenilpropanóide
23,22	Isoeugenol	64,36	Fenilpropanóide
25,69	Cariofileno	2,45	Sesquiterpeno

Fonte: Autores (2021).

### Conteúdo fenólico total (CTF)

Os resultados do teor de fenólicos dos óleos essenciais referente as espécies de *C. limonia* e *L. nobilis*, assim como seus bioprodutos obtidos por sua extração cruzada são apresentadas na Tabela 3. O conteúdo fenólico (CFT) foi expresso em equivalente de ácido tânico (mg EAT g<sup>-1</sup> de material vegetal) em que se obteve uma equação da reta  $y = 0,0586x + 0,600$  com  $R^2 = 0,9998$ , onde  $y$  está representando a absorbância e  $x$  a concentração equivalente de ácido tânico.

**Table 3.** Conteúdo fenólico total do óleo essencial de *C. limonia* e *L. nobilis*

Óleo Essencial	CFT (mg EAT g <sup>-1</sup> )	Equação Linear	R <sup>2</sup>
<i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	252,35	$y = 0,0586x + 0,0600$	0,9998
<i>C. limonia</i>	306,47		
<i>L. nobilis</i>	221,79		

Fonte: Autores (2021).

### Atividade antioxidante

A Tabela 4 mostra os resultados relacionados a capacidade antioxidante dos óleos essenciais e nanoemulsões estáveis de *C. limonia* e *L. nobilis*, assim como dos bioprodutos obtido por sua extração cruzada referente a Concentração Eficiente 50% (CE<sub>50</sub>) em mg L<sup>-1</sup>, a partir do método de descoloração de radicais hidroxilas.

**Table 4.** Concentração Eficiente 50% (CE<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) para atividade antioxidante do óleo essencial e nanoemulsões de *C. limonia* e *L. nobilis*.

Identificação	Equação Linear	CE <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
OE <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 217,17x - 369,23$	85,20	0,9983
OE <i>C. limonia</i>	$y = 115,72x - 171,79$	59,44	0,9941
OE <i>L. nobilis</i>	$y = 74,376x - 87,373$	70,31	0,9969
NOE 1 <i>C. limonia</i>	$y = 129,53x - 187,87$	68,61	0,9945
NOE 2 <i>C. limonia</i>	$y = 93,037x - 113,42$	57,08	0,9984
NOE 3 <i>C. limonia</i>	$y = 50,293x - 36,601$	52,71	0,9955
NOE 1 <i>L. nobilis</i>	$y = 59,161x - 51,578$	52,12	0,9815
NOE 2 <i>L. nobilis</i>	$y = 18,977x + 22,12$	29,45	0,9985
NOE 3 <i>L. nobilis</i>	$y = 17,414x + 30,337$	13,46	0,9969
NOE 1 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 96,165x - 131,54$	77,23	0,9977
NOE 2 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 52,525x - 52,168$	88,13	0,9998
NOE 3 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	$y = 40,315x - 16,765$	45,30	0,9984

Fonte: Autores (2021). Nota: OE– Óleo essencial; NOE– Nanoemulsão estável do óleo essencial formulada por inversão de fases; 1 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 5% Tween 20 e 90,0% de H<sub>2</sub>O; 2 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 10% Tween 20 e 85% de H<sub>2</sub>O; 3 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 15% Tween 20 e 80% de H<sub>2</sub>O.

### Atividade anti-inflamatória

A Tabela 5 mostra os resultados relacionados a capacidade de ação anti-inflamatória dos óleos essenciais e nanoemulsões estáveis de *C. limonia* e *L. nobilis*, assim como dos bioprodutos obtido por sua

181 extração cruzada referente a Concentração Eficiente 50% (CE<sub>50</sub>) em mg L<sup>-1</sup>, a partir do método de  
182 desnaturação proteica de albumina.

183 **Table 5.** Concentração Eficiente 50% (CE<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) do óleo essencial e nanoemulsões de *C. limonia* e *L. nobilis* para  
184 ação anti-inflamatória.

Identificação	CE <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Equação Linear	R <sup>2</sup>
OE <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	161,84	y = 128,08x – 232,94	0,9987
OE <i>C. limonia</i>	431,16	y = 54,883x – 94,597	0,9933
OE <i>L. nobilis</i>	150,49	y = 91,481x – 149,2	0,9971
NOE 1 <i>C. limonia</i>	305,98	y = 59,091x – 96,882	0,9997
NOE 2 <i>C. limonia</i>	187,50	y = 58,156x – 82,189	0,9844
NOE 3 <i>C. limonia</i>	279,67	y = 99,397x – 193,19	0,9839
NOE 1 <i>L. nobilis</i>	153,02	y = 41,908x – 41,558	0,9904
NOE 2 <i>L. nobilis</i>	258,39	y = 137,53x – 281,76	0,9975
NOE 3 <i>L. nobilis</i>	374,29	y = 35,019x – 40,111	0,9999
NOE 1 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	220,07	y = 128,85x – 251,84	0,9976
NOE 2 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	186,85	y = 114,37x – 209,79	0,9888
NOE 3 <i>C. limonia</i> e <i>L. nobilis</i>	252,67	y = 171,18x – 361,7	0,9917

185 **Fonte:** Autores (2021). **Nota:** OE– Óleo essencial; NOE– Nanoemulsão estável do óleo essencial formulada por  
186 inversão de fases; 1 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 5% Tween 20 e 90,0% de H<sub>2</sub>O; 2 –  
187 Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 10% Tween 20 e 85% de H<sub>2</sub>O; 3 – Nanoemulsão composição 5% óleo  
188 essencial, 15% Tween 20 e 80% de H<sub>2</sub>O.

## 190 DISCUSSÃO

### 191 Constituintes químicos

192 A composição química do OE das cascas de *C. limonia* foi semelhante a outras espécies de *Citrus*,  
193 como *C. aurantifolia* e *C. limon* descritas na literatura anteriormente por [35]. E o percentual de limoneno  
194 está dentro do valor esperado para espécies cítricas que podem atingir de 30 a 80% da composição total  
195 [36,11].

196 Resultados próximos são relatados por [37], que identificou 18 compostos e observou a presença de  
197 limoneno em 40,0% da composição do óleo das folhas de *C. limonia* coletadas na região de Rio Verde-GO,  
198 e por [10], que também encontrou 18 constituintes químicos, tendo como majoritários o limoneno, β-pineno  
199 e o m-cimeno, encontrando uma porcentagem de 44,75% de limoneno para amostras de óleo das cascas  
200 de *C. limonia* obtidas no município de São José de Ribamar-MA, ambas caracterizações químicas realizadas  
201 através da análise cromatográfica gasosa acoplada a espectrometria de massa.

202 No entanto, resultados divergentes para a espécie cítrica estudada referente as quantidades de  
203 limoneno também são observados em estudos anteriores de diferentes lugares, como os apontados por:  
204 [9,11, 35, 38] que apresentaram, respectivamente, uma porcentagem de 33,67%, 65,7%, 65,69% e 82% do  
205 composto limoneno. A variabilidade na composição química dos óleos essenciais, assim como seus  
206 quantitativos, pode ser devido a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos a que a planta está sujeita,  
207 bem como a sua sazonalidade e idade [39, 40, 41].

208 As substâncias identificadas na CG-EM do óleo essencial estudado, o limoneno, β-pineno e linalol são  
209 descritos na literatura por possuírem das mais variadas atividades biológicas [42, 43, 44]. E [45], assim como  
210 [46] relataram sobre os efeitos de sinergismo e/ou antagonismo de constituintes químicos, ainda que em  
211 porcentagens minoritárias nos óleos essenciais, e apontam o aumento das atividades biológicas partirem de  
212 interações sinérgicas entre os mais diversos componentes de uma planta ou combinações entre elas.

213 Os componentes identificados no OE das folhas de *L. nobilis* nesse estudo estão de acordo com os  
214 destacados por [47], que identificaram 26 componentes químicos ao analisarem o óleo essencial de *L.*  
215 *nobilis*, tendo também como principal o isoeugenol (53,5%), seguido por mircenol (16,6%) e chavicol (10,2%),  
216 e diferem dos apresentados por [48] em que os resultados mostraram como principais constituintes para o  
217 OE obtido das folhas de *Laurus nobilis* o 1,8-cineol (41,1%), sabineno (6,96%), α-pineno (5,94%), epóxido  
218 de humuleno II (5,73%) e α-terpinil acetato (5,72%). As diferenças na composição do óleo essencial neste

estudo e nas demais literaturas, podem ser devidas a uma série de fatores que envolve desde o método de processamento e extração dos óleos até as características do solo, entre outros.

A influência da localização geográfica e da parte da planta utilizada para obtenção do óleo podem ser comprovados pelos estudos realizados por [16], onde analisaram o OE extraído das folhas e frutos de *L. nobilis*, coletados de árvores cultivadas no campus da Universidade da Jordânia, e obtiveram diferenças nos quantitativos e constituintes químicos. Resultando na identificação de 37 compostos para o OE das folhas, sendo o 1,8-cineol (36,8%),  $\alpha$ -terpinil acetato (14,6%) e terpinen-4-ol (6,4%) os principais componentes, enquanto os frutos continham 45 substâncias, com 29,8% de 1,8-cineol, 6,2% de  $\beta$ -elemeno, 5,6% de  $\alpha$ -terpinil acetato e 1,5% de  $\gamma$ -terpineol, sendo os majoritários. E [49] identificou no OE obtido dos galhos de *L. nobilis*, cultivado na Bulgária, 37 constituintes voláteis sendo 1,8-cineol (48,5%),  $\alpha$ -terpinil acetato (13,1%) e metil eugenol (6,6%) os mais abundantes.

A análise cromatográfica nesse estudo não identificou o eugenol, composto constantemente encontrado nesse vegetal, mas tem o seu isômero (isoeugenol) como majoritário, que também é um composto fenólico com várias propriedades biológicas, como apontam [50, 51]. E embora os compostos majoritários possam variar, a literatura mostra que o OE dessa espécie se constitui de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanóides [52, 53, 54], corroborando com os resultados obtidos.

### Conteúdo fenólico total (CTF)

Consonante a Tabela 3, os óleos utilizados nesse estudo apresentaram um quantitativo importante de compostos fenólicos, se atentando para o teor apresentado no óleo extraído a partir das duas espécies que foi de 252,35 mg EAT g<sup>-1</sup>, notando-se um elevado aumento em seu quantitativo se comparado ao teor fenólico apresentado pelo óleo de *L. nobilis*, sob as mesmas condições.

Os resultados obtidos para os óleos essenciais em estudo revelam um superior teor de fenólicos, quando comparado ao obtido por [8], que relatam para o teor total de fenólicos para extratos hidroalcoólicos das cascas de *C. limonia* um quantitativo de 196,05  $\pm$  7,67 e 188  $\pm$  7,22 mg EAG g<sup>-1</sup>. E aos valores obtidos em estudos de outras plantas do mesmo gênero como aos de [55] que obtiveram um quantitativo de 92,08  $\pm$  0,02 mg EAT g<sup>-1</sup> para extrato das cascas de *Citrus deliciosa* e [56] que encontraram para extratos das cascas de *Citrus x paradisi* e *Citrus reticulata*, respectivamente, valores de 162  $\pm$  17,36 mg EAG g<sup>-1</sup> e 121  $\pm$  11,89 mg EAG g<sup>-1</sup>.

Com relação ao resultado obtido para *Laurus nobilis*, [57] apontaram um conteúdo total de fenólicos menor em 174,1  $\pm$  11,6 mg EAG g<sup>-1</sup>, para extrato metanoico de *Laurus nobilis*. [58] descreveram para extratos de *Laurus nobilis*, obtidos via extração assistida por microondas (EAM), um conteúdo fenólico total também inferior com variação de 30,88 a 53,57 mg EAG g<sup>-1</sup> e [59] com 21,56 mg EAG g<sup>-1</sup> obtidos também via extração assistida por microondas (EAM).

Segundo [60] e [61], os compostos fenólicos apresentam uma alta atividade antioxidante *in vitro*, e englobam componentes polares. E [62] apontam que esses compostos atuam como antioxidantes, não apenas por sua capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de muitos ingredientes alimentares, especialmente lipídios.

Também é descrito por [63] sobre a capacidade que os compostos fenólicos têm de inibir enzimas ativas no decorrer do processo inflamatório. Assim como, [39] discorre sobre a atuação desses compostos como reguladores antioxidantes de células através da absorção de radiação a partir de sua sintetização. Os conteúdos fenólicos totais apontados nesse estudo encontram-se pouco divulgado na literatura, o que ressalta ainda mais a importância deste estudo, principalmente devido as suas implicações benéficas relacionadas a saúde humana.

### Atividade antioxidante

Em concordância com a Tabela 4, todos os óleos essenciais e formulações de nanoemulsões desenvolvidas por esse método apresentaram valores significativos, comprovando uma ação efetiva e sendo classificados como ativos, segundo o critério estabelecido por [64], que estabelece que produtos naturais com CE<sub>50</sub> menor que 500 mg L<sup>-1</sup> são definidos como ativos.

Com ênfase para as nanoemulsões com formulações NOE 3 *L. nobilis* e NOE 2 *L. nobilis* e a nanoemulsão NOE 3 *C. limonia* e *L. nobilis* que apresentaram os menores valores para CE<sub>50</sub>. Entendendo-se assim, que no geral as nanoemulsões aumentaram significativamente o potencial/eficiência da ação da atividade antioxidante, comprovando assim, a existência de um aumento do potencial biológico quando

trabalhados em nanoemulsões descritos nas literaturas. De acordo com [65], a atividade antioxidante de um composto vegetal é inversamente proporcional aos valores de  $CE_{50}$ , em que a menor concentração indica uma maior capacidade do óleo em reduzir o radical hidroxila em 50%.

Este estudo também descreve de forma inédita um óleo essencial obtido de uma extração cruzada, o que ressalta a importância deste trabalho.

Entretanto, existem estudos que relatam o desempenho de plantas das mesmas espécies e/ou dos óleos essenciais individualmente de *C. limonia* e de *L. nobilis* e dos compostos majoritários (limoneno,  $\beta$ -pineno), (1,8 cineol, eugenol), respectivamente, como agentes antioxidantes. A literatura aponta que espécies de gênero *Citrus* costumam possuir uma boa atividade antioxidante, como [66] que estudaram o potencial do óleo essencial de *Citrus medica* L. var. *Sacodactylis* e do óleo essencial nanoemulsificado pelo método de emulsificação espontânea, apontando um aumento do potencial 51,6% para a nanoemulsão e 30,5% do óleo quando trabalhados em concentrações de 0,12 mg/mL por ensaio DPPH.

Esse estudo apresentou resultados superiores em relação ao óleo essencial de *L. nobilis* do que os apresentados por [67], que obtiveram uma atividade antioxidante com  $CI_{50}$  de 4,749 mg mL<sup>-1</sup> utilizando o método de DPPH, e por [68] que obtiveram uma  $CI_{50}$  de 4,00 mg mL<sup>-1</sup> para o óleo essencial de *L. nobilis* obtido através do método de arraste a vapor. Ainda segundo [60], a ação do óleo essencial de *L. nobilis* obteve uma inibição com  $CI_{50}$  de 72,78  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> pelo ensaio DPPH e uma  $CE_{50}$  de 14,66  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> pelo ensaio FRAP.

Segundo [69], a atividade antioxidante dos terpenos presentes em óleos essenciais, assim como nos obtidos neste estudo estão relacionadas à presença de ligações duplas conjugadas, que ocorrem através do mecanismo de quebra de cadeia, para a remoção de radicais livres, que de acordo com [70] são definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo atuar em alimentos ou sistemas biológicos, mostrando-se que os resultados apresentados neste estudo são promissores.

## Atividade anti-inflamatória

Conforme a Tabela 5, todos os bioprodutos testados apresentaram ação anti-inflamatória, sendo o OE de *L. nobilis* com a menor  $CE_{50}$ , seguido por NOE 1 *L. nobilis*, OE de *C. limonia* e *L. nobilis* e NOE 2 *C. limonia* e *L. nobilis*.

Na literatura também não foi possível encontrar dados quanto a atividade anti-inflamatória do óleo essencial referente a esse tipo de sinergia apresentada neste estudo, obtido por extração cruzada dessas espécies, e de suas respectivas nanoemulsões utilizados nesses testes. Demonstrando o quanto se faz necessário esse trabalho para posteriores estudos.

Mas, o uso desse tipo de sinergia se mostra favorável como anti-inflamatório, pois [71] descrevem que a sinergia de compostos fenólicos pode exercer diversas ações anti-inflamatórias atuando de várias formas, enquanto geralmente fármacos vêm atuando de maneira específica.

A ação anti-inflamatória apontada para as espécies em estudo também foi observada no estudo de [11] utilizando modelos com ensaios *in vivo* em camundongos, através da lambadura de pata induzida por formalina e inflamação induzida por carragenina no modelo de bolsa de ar subcutâneo (BAS), apresentaram resultados satisfatórios para o OE de *C. limonia* com doses de 100 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto [72] também utilizando teste *in vivo* obtiveram resultados com doses de 2 mg kg<sup>-1</sup> para óleo essencial de *L. nobilis*.

Outras nanoemulsões são descritas na literatura para outras espécies vegetais, porém com resultados inferiores, a exemplo [73] que relataram uma ação anti-inflamatória significativa da nanoemulsão do óleo essencial dos brotos de *Araucaria bidwillii*, no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, nas vias orais de 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>. Utilizando o mesmo método *in vivo*, [74] apresentaram um estudo com uma eficácia em dose de 498 mg kg<sup>-1</sup>, para uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Segundo [75] e [76] a desnaturação de proteínas está relacionada como causa da liberação de mediadores pró-inflamatórios do organismo para sua defesa. Eles induzem respostas inflamatórias que podem prejudicar órgãos e sistemas, causando doenças ou danos aos tecidos. E de acordo com [77], os anti-inflamatórios têm o intuito de amenizar ou impedir uma reação inflamatória.

## CONCLUSÃO

Por fim, a análise química por (CG-EM) quantificou o limoneno como majoritário do OE de *C. limonia* e o isoeugenol como principal composto presente no OE de *L. nobilis*. O óleo essencial obtido por extração de *Citrus limonia* Osbeck (Limão-cravo) / *Laurus nobilis* L. (Louro), assim como suas nanoemulsões,

apresentaram resultados inéditos e satisfatórios frente a todos os ensaios in vitro aplicados, tais efeitos podem ser devido aos compostos fenólicos presentes ou ao sinergismo entre os constituintes químicos presentes nos OE's. Justificando assim, pesquisas futuras dos óleos estudados e de suas respectivas nanoemulsões para aplicação adequada devido ao seu alto potencial biotecnológico, assim como a ampliação do estudo de novas sinergias.

**Financiamento:** Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

**Agradecimento:** Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV-UFMA) e Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

**Conflito de Interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Mirahmadi SF, Sefidkon F, Aalifar M, Akramian M. Essential Oil Composition of *Tanacetum polycephalum* subsp. *duderanum* (Boiss) Podl., A Plant Endemic from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2011;14(6):742–5.
2. Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*. 2005;28(3):519–28.
3. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):131–4.
4. Saraiva ME, Ulisses AVR de A, Ribeiro DA, Oliveira LGS de, Macêdo DG de, Sousa F de FS de, et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;171:141–53.
5. Bobbo Moreski D, Giacomini Bueno F, Vieira de Souza Leite-Mello E. AÇÃO CICATRIZANTE DE PLANTAS MEDICINAIS: UM ESTUDO DE REVISÃO. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*. 2018;22(1).
6. Steffens AH. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial [dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul; 2010.
7. Silva DT da. Óleos essenciais de *Nectandra grandiflora* e *Ocotea acutifolia*: rendimento, composição química e atividades biológicas [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2013.
8. Migliorini AA, Contador MH, Carvalho FK, Marques JA. Polifenóis do limão-cravo: otimização do processo de extração. XXV Encontro Anual de Iniciação Científica & II Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior. 2016.
9. Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2014;16(1):18–24.
10. Gomes PRB, Sousa DA de, Everton GO, Fontenele MA, Marques JNL e, Freitas AC de, et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Citrus limonia* Osbeck bark essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2020;14(7):354–8.
11. Amorim JL, Simas DLR, Pinheiro MMG, Moreno DSA, Alviano CS, da Silva AJR, et al. Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153643.
12. CAPUTO, Lucia et al. *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 930, 2017. Caputo L, Nazzaro F, Souza L, Aliberti L, De Martino L, Fratianni F, et al. *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules*. 2017;22(6):930.
13. Alejo-Armijo A, Altarejos J, Salido S. Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*). *Natural Product Communications*. 2017;12(5):1934578X1701200.
14. Ovidi E, Laghezza Masci V, Zambelli M, Tiezzi A, Vitalini S, Garzoli S. *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. *Plants*. 2021;10(4):707.
15. Guedouari R, Nabiev M. Anti-inflammatory activity of different extracts from *Laurus nobilis* growing in Algeria. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*. 2021;7(4).
16. Abu-dahab R, Kasabri V, Afifi FU. Evaluation of the Volatile Oil Composition and Antiproliferative Activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on Breast Cancer Cell Line Models. *Records of Natural Products*. 2014;8(2) :136-147.
17. Barbosa LN, Probst I da S, Teles Andrade BFM, Bérnago Alves FC, Albano M, Ribeiro de Souza da Cunha M de L, et al. *In vitro* Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. *Journal of Oleo Science*. 2015;64(3):289–98.
18. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006;34(5):S11–9.

- 377 19. Rice DAK, Mendez-Vigo L. Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature. *Archives of*  
378 *Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2008;129(11):1495–504.
- 379 20. Fanin M, Balestrin Fanin ÉLB, Santos IC dos, Lima JS de, Gonçalves APP, Martins LDA. Métodos alternativos no  
380 tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*. 2020;14(1):24.
- 381 21. Kentish S, Wooster TJ, Ashokkumar M, Balachandran S, Mawson R, Simons L. The use of ultrasonics for  
382 nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008;9(2):170–5.
- 383 22. Anwer MK, Jamil S, Ibnouf EO, Shakeel F. Enhanced Antibacterial Effects of Clove Essential Oil by Nanoemulsion.  
384 *Journal of Oleo Science*. 2014;63(4):347–54.
- 385 23. Faustino CG, de Medeiros FA, Ribeiro Galardo AK, Lobato Rodrigues AB, Lopes Martins R, de Medeiros Souza  
386 Lima Y, et al. Larvicide Activity on *Aedes aegypti* of Essential Oil Nanoemulsion from the *Protium heptaphyllum*  
387 Resin. *Molecules*. 2020;25(22):5333.
- 388 24. Felizardo MGAC, Pereira APM, Lima TP de, Sousa TL de, Guterres CVF, Oliveira JPM, et al. Chemical profile,  
389 stability, and fungicide activity of oil-in-water nanoemulsion (O / A) incorporated with Ba-har essential oil. *Ciência*  
390 *e Natura*. 2021;43:e57.
- 391 25. Shah P, Bhalodia D, Shelat P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*.  
392 2010;1(1):24.
- 393 26. Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2002; 6(1):11-8.
- 394 27. Lima TCP de, Almeida AF de, Pacheco de Oliveira EC, Silva Júnior JOC, Ribeiro Costa RM, Matos AP, et al.  
395 Desenvolvimento de nanogel de *Copaifera reticulata* sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. *Saúde*  
396 *e Pesquisa*. 2020;13(1):181–92.
- 397 28. Sugumar S, Clarke SK, Nirmala MJ, Tyagi BK, MukherjeeA, Chandrasekaran N. Nanoemulsion of eucalyptus oil  
398 and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of entomological research*, 2014;104(3):393-402.
- 399 29. Kubitschek-KM ARJ, Zero JM. Development of jojoba oil (*Simmondsia chinensis* (Link) CK Schneid.) based  
400 nanoemulsions. *Lat. Am. J. Pharm*, 2014;33(3):459-63.
- 401 30. Rodrigues E da CR, Ferreira AM, Vilhena JCE, Almeida FB, Cruz RAS, Florentino AC, et al. Development of a  
402 larvicidal nanoemulsion with *Copaiba* (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.  
403 2014;24(6):699–705.
- 404 31. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of  
405 ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(2):227–  
406 43.
- 407 32. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*.  
408 1989;28(4):1057–60.
- 409 33. Sundararajan R. In vitro antioxidant activity on roots of *Limnophila heterophylla*. *Free Radicals and Antioxidants*.  
410 2016;6(2):178–85.
- 411 34. Padmanabhan P, Jangle SN. Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination  
412 of four medicinal plants. *International journal of basic and applied medical sciences*, 2012;2(1):109-116.
- 413 35. Simas DLR, Amorim SHBM de, Oliveira JM de, Alviano DS, Silva AJR da. Characterization of essential oils of citrus  
414 fruits. *Citrus Research Technology*. 2015;36(1).
- 415 36. Ladaniya MS. Commercial fresh citrus cultivars and producing countries. *Citrus Fruit: Biology, Technology and*  
416 *Evaluation*. Academic Press, San Diego, 2008;13-65.
- 417 37. Estevam EBB, Miranda MLD, Alves JM, Egea MB, Pereira PS, Martins CHG, Esperandim, VR, et al. Composição  
418 química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia*  
419 Tanaka (Rutaceae). *Revista Virtual de Química*. 2016;8(6):1842–54.
- 420 38. Cavalcanti ESB, Morais SM de, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants  
421 against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):541–4.
- 422 39. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.  
423 *Química Nova*. 2007;30(2):374–81.
- 424 40. Natta L, Orapin K, Krittika N, Pantip B. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne  
425 bacteria. *International Food Research Journal*, 2008;15(3):337-346.
- 426 41. Silva PT, Santos HS, Teixeira AMR, Bandeira PN, Holanda CL, Vale JPC, et al. Seasonal variation in the chemical  
427 composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. *South*  
428 *African Journal of Botany*. 2019;124:329–32.
- 429 42. Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, Hyun CG. Chemical composition and biological activities of  
430 essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *Journal of Microbiology and*  
431 *Biotechnology*, 2008;18(1):74-79.



- 432 43. Moreira IJA, Serafini MR, Lucca Junior W, Ribeiro EAN, Filho VJS, Passos Junior DB, et al. PROSPECÇÃO  
433 TECNOLÓGICA DA UTILIZAÇÃO DO BETA-PINENO. Revista Gestão, Inovação e Tecnologias. 2013;3(2):186–  
434 94.
- 435 44. Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA, et al. Evaluation of  
436 Anti-Inflammatory Activity of *Citrus latifolia* Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models.  
437 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013:1–8.
- 438 45. Neves BM, Bauermann L, Biegelmeyer R, Apel M. Avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de  
439 siphoneugena reitzii d.(myrtaceae) e de monoterpenos isolados. Salão de Iniciação Científica (20.: 2008 out. 20-  
440 24: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.
- 441 46. Casanova LM, Costa SS. Synergistic Interactions in Natural Products: Therapeutic Potential and Challenges.  
442 Revista Virtual de Química. 2017;575–95.
- 443 47. Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, et al. Antifungal activity, mode  
444 of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Archives of Oral  
445 Biology. 2017;73:179–85.
- 446 48. Tomar O, Akarca G, Gök V, Ramadan MF. Composition and Antibacterial Effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.)  
447 Leaves Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2020;23(2):414–21.
- 448 49. Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, et al. Chemical Composition and  
449 Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. Molecules. 2019;24(4):804.
- 450 50. Reis MM. Influência dos sistemas nanoestruturados na fotoestabilidade e na atividade antioxidante dos compostos  
451 fenólicos eugenol, isoeugenol e dehidrodieugenol [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa  
452 Maria; 2012.
- 453 51. Rosa LLS, Galvão LFM, Neto HD, Nóbrega JR, Silva DF, Júnior FA. (2019). Isoeugenol efficacy against  
454 *Staphylococcus aureus*. Int. J. Dev. Res, 2019;9(10):30877-30879.
- 455 52. Basak SS, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on  $\alpha$ -glucosidase and  
456 reactive oxygen species scavenging activity. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 2013;12(2):367.
- 457 53. Cherrat L, Espina L, Bakkali M, García-Gonzalo D, Pagán R, Laglaoui A. Chemical composition and antioxidant  
458 properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their  
459 antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. Journal of the Science of Food  
460 and Agriculture, 2014;94(6), 1197-1204.
- 461 54. Peris I, Blázquez MA. Comparative GC-MS Analysis of Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) Essential Oils in Commercial  
462 Samples. International Journal of Food Properties. 2015;18(4):757–62.
- 463 55. Siahpoosh A, Javedani F. Antioxidative capacity of Iranian *Citrus deliciosa* peels. Free Radicals and Antioxidants.  
464 2012;2(2):62–7.
- 465 56. Li BB, Smith B, Hossain MdM. Extraction of phenolics from citrus peels. Separation and Purification Technology.  
466 2006;48(2):189–96.
- 467 57. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Nasr SB, El Beyrouthy M, & Mnif W. Phytochemical composition and antioxidant activity  
468 of Tunisian *Laurus nobilis*. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 2018;31(6):2397-2402.
- 469 58. Dobroslavić E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V. Polyphenolic characterization and  
470 antioxidant capacity of *Laurus nobilis* L. leaf extracts obtained by green and conventional extraction  
471 techniques. Processes, 2021;9(10):1840.
- 472 59. Rincón E, Balu AM, Luque R, Serrano L. Mechanochemical extraction of antioxidant phenolic compounds from  
473 Mediterranean and medicinal *Laurus nobilis*: A comparative study with other traditional and green novel techniques.  
474 Industrial Crops and Products. 2019;141:111805.
- 475 60. Goudjil MB, Ladjel S, Bencheikh SE, Zighmi S, Hamada D. Study of the chemical composition, antibacterial and  
476 antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. J. chem.  
477 pharm. res, 2015;7(1):379-385.
- 478 61. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo  
479 Lutz, 2007;66(1):1-9.
- 480 62. Silva MLC, Costa RS, Santana ADS, Koblitz MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em  
481 produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias. 2010 Sep 1;31(3):669.
- 482 63. Neves PDO. Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde [dissertação]. Fernando  
483 Pessoa: Universidade Fernando Pessoa; 2015
- 484 64. Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, da Cunha AP. Age-Induced Diminution of Free Radical  
485 Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids. Journal of Agricultural and  
486 Food Chemistry. 2003;51(3):742–5.

- 487 65. Sousa CM de M, Silva HR e, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade  
488 antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007;30:351–5.
- 489 66. Lou Z, Chen J, Yu F, Wang H, Kou X, Ma C, et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil  
490 from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT*. 2017;80:371–7.
- 491 67. Ballen, S. C., Rigo, D., Paliga, M., Puton, B. M. S., Cansian, R. L., & Paroul, N. Determinação do potencial  
492 antioxidante (DPPH) e antimicrobiano de extratos vegetais e óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*).  
493 *Perspectiva*,2019;43(163):61-70.
- 494 68. Fernández N J, Damiani N, Podaza EA, Martucci JF, Fasce D, Quiroz F, et al. *Laurus nobilis* L. Extracts against  
495 *Paenibacillus* larvae: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi*  
496 *Journal of Biological Sciences*, 2019;26(5):906-912.
- 497 69. Wojtunik KA, Ciesla LM, Waksmundzka-Hajnos M. Model Studies on the Antioxidant Activity of Common Terpenoid  
498 Constituents of Essential Oils by Means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. *Journal of Agricultural and*  
499 *Food Chemistry*. 2014;62(37):9088–94.
- 500 70. Ferreira AM, Mouchrek Filho VE, Mafra NSC, Sales EH, Santos Júnior PS, Everton GO. Constituintes químicos,  
501 toxicidade, potencial antioxidante e atividade larvívica frente a larvas de *Aedes aegypti* do óleo essencial de *Aniba*  
502 *rosaeodora* Ducke. *Research, Society and Development*. 2020;9(8).
- 503 71. Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: Natural alternative in  
504 inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2016;2(1):1131412.
- 505 72. Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential  
506 oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*. 2003;17(7):733–6.
- 507 73. Abdelhameed, MF, Asaad GF, Ragab TI, Ahmed RF, El Gendy AENG, El-Rahman A, Elgamal AM, Elshamy AI.  
508 Oral and Topical Anti-Inflammatory and Antipyretic Potentialities of *Araucaria bidwillii* Shoot Essential Oil and Its  
509 Nanoemulsion in Relation to Chemical Composition. *Molecules*. 2021;26(19):5833.
- 510 74. Borges RS, Lima ES, Keita H, Ferreira IM, Fernandes CP, Cruz RAS, et al. Anti-inflammatory and antialgic actions  
511 of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical  
512 constituents. *Inflammopharmacology*. 2018; 26(1):183–95.
- 513 75. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated  
514 diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204–18.
- 515 76. Yesmin S, Paul A, Naz T, Rahman ABMA, Akhter SF, Wahed MII, et al. Membrane stabilization as a mechanism  
516 of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of *Choi* (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*. 2020;6(1).
- 517 77. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its  
518 phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*.  
519 2019; 229:29–45.
- 520



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, através dos resultados obtidos, foi possível observar o perfil químico do óleo essencial de *Citrus limonia* e de *Laurus nobilis* que possuem componentes com diversas propriedades farmacológicas promissoras para a saúde. O óleo essencial obtido por extração cruzada, assim como sua nanoemulsão apresentaram de forma inédita propriedades significativas para as ações antioxidante e anti-inflamatória. Com isto, o uso do óleo e principalmente das nanoemulsões, pode ser utilizado como mecanismo para melhor distribuição e durabilidade, além do potencial químico e biológico, sendo incentivados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DAHAB, Rana; KASABRI, Violet; AFIFI, Fatma Ulku. Evaluation of the Volatile Oil Composition and Antiproliferative Activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on Breast Cancer Cell Line Models. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, 2014.

ALEJO-ARMIJO, Alfonso; ALTAREJOS, Joaquín; SALIDO, Soffía. Phytochemicals and biological activities of Laurel tree (*Laurus nobilis*). **Natural product communications**, v. 12, n. 5, p. 1934578X1701200519, 2017.

AMORIM, Jorge Luis et al. Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the essential oils of four citrus species. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153643, 2016.

ANWER, Md Khalid et al. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of oleo science**, p. ess13213, 2014.

BARBOSA, Lidiane Nunes et al. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. **Journal of oleo science**, v. 64, n. 3, p. 289-298, 2015.

CALIXTO, João B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CAPUTO, Lucia et al. *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 930, 2017.

FANIN, Mauricio et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 14, n. 1, p. 24-32, 2020.

FAUSTINO, Cleidjane Gomes et al. Atividade Larvicida sobre *Aedes aegypti* da Nanoemulsão de Óleo Essencial da Resina *Protium heptaphyllum*. **Molecules**, v. 25, n. 22, pág. 5333, 2020.

FELIZARDO, M. G. A. C. et al. Chemical profile, stability and fungicide activity of oil-in-water nanoemulsion (O/A) incorporated with Ba-har essential oil. **Ciência e Natura**, v. 43, p. 57, 2021.

GOMES, Paulo Roberto Barros et al. Chemical composition and larvicidal activity of Citrus limonia Osbeck bark essential oil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 7, p. 354-358, 2020.

GUEDOUARI, R.; NABIEV, M. Anti-inflammatory activity of different extracts from Laurus nobilis growing in Algeria. **Algerian Journal of Environmental Science and Technology**, 2021.

KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

MIGLIORINI, A. A. et al. Polifenóis do limão-cravo: Otimização do processo de extração. **XXV Encontro Anual de Iniciação Científico. II Encontro Anual de Iniciação Científico Júnior**. 2016.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra Staphylococcus aureus e Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 18-24, 2014.

MIRAHMADI, Seyed Fazel et al. Essential oil composition of Tanacetum polycephalum subsp. duderanum (Boiss) Podl., A Plant endemic from Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 6, p. 742-745, 2011.

MORESKI, Danieli Bobbo; BUENO, Fernanda Giacomini; DE SOUZA LEITE-MELLO, Eneri Vieira. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 1, 2018.

OVIDI, Elisa et al. Laurus nobilis, Salvia sclarea and Salvia officinalis Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 707, 2021.

RICE, Louis B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S11-S19, 2006.

RICE, Dennis AK; MENDEZ-VIGO, Luke. Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 129, n. 11, p. 1495-1504, 2008.

SARAIVA, Manuele Eufrazio et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic reviews in pharmacy**, v. 1, n. 1, 2010.

SILVA, Daniela Thomas da et al. **Óleos essenciais de Nectandra grandiflora e Ocotea acutifolia: rendimento, composição química e atividades biológicas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

STEFFENS, Andréia Hoeltz. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

## ANEXO A - NORMAS DA REVISTA

### Brazilian Archives of Biology and Technology

#### Scope and policy

The **Brazilian Archives of Biology and Technology (BABT)**, publishes **original articles** and **review articles** in the following areas:

- Agriculture, Agribusiness and Biotechnology;
- Human and Animal Health;
- Biological and Applied Sciences;
- Food /Feed Science and Technology;
- Environmental Sciences;
- Engineering, Technology and Techniques.

When submitting an article, the authors assign the copyright and use of all its content to BABT, if it is approved for publication, but the opinions expressed in the texts are the sole responsibility of the authors.

The corresponding author should be familiar with the BABT journals' editorial policies and is solely responsible for communicating with the journal and managing communication between coauthors. Before submission, the corresponding author ensures that all authors are included in the author list and agree with its order, and that they are aware the manuscript is to be submitted

Similarities will be verified in the manuscripts through a specific plagiarism verification software, providing a report to support the decision regarding the originality

Manuscripts to be considered for publication must be submitted by the authors through the ScholarOne Manuscripts <sup>TM</sup> online system. Please follow these guidelines to ensure that you submission proceeds smoothly.

#### Preprints

BABT journal accepts manuscripts posted on preprint servers of the authors' choice, authors' or institutional websites, and open communications between researchers whether on community preprint servers or preprint commenting platforms.

Preprints are defined as an author's version of a research manuscript prior to formal peer review at a journal, which is deposited on a public server. Preprints may be posted at any time during the peer review process. Posting of preprints is not considered prior publication and will not

jeopardize consideration at our journal. Manuscripts posted on preprint servers will not be considered when determining the advance provided by a study under consideration at BABT journal.

Our policy on posting, licensing, citation of preprints and communications with the media about preprints of primary research manuscripts is summarized below.

Authors should disclose details of preprint posting, including DOI and licensing terms, upon submission of the manuscript or at any other point during consideration at BABT journal. Once the preprint is published, it is the author's responsibility to ensure that the preprint record is updated with a publication reference, including the DOI and a URL link to the published version of the article on the journal website.

Preprints may be cited in the reference list of articles under consideration at Nature Portfolio journals as shown below:

Author(s). Preprints Title [Internet]. Repository Name [Preprint]. Year [consulted on <consultation date>]: Number of pages. Available in: URL

### **Brief guide for submission**

This guide outlines key points for preparing primary research manuscripts for submission to BABT.

To facilitate the preparation of the manuscript, the templates below were created for mandatory use.

- [Cover Letter Template](#)
- [Manuscript Template](#)

### **Cover Letter**

When submitting the article, the authors must send a cover letter to the editor, summarizing the findings of his manuscript, showing that it is in the interest of the Brazilian Archives of Biology and Technology to publish it, that it is original and has been not submitted or published previously elsewhere. Moreover, the cover letter should clearly address Biology or Technology area of Knowledge. And that there are no conflicts of interest associated with the manuscript and meet all applicable standards regarding the ethics of experimentation and research, and there are no duplicate publications, fraud, plagiarism, or concerns about animal or human experimentation.



If the article has already been shared as a preprint, inform in "Comments to Editors" on the Cover Letter

The cover letter must follow the template form attached [here](#).

### **Main Manuscript**

The manuscript must be written in English only. If the authors don't have experience writing in this language, we suggest that the manuscript to be reviewed by an expert before its submission, preferably with scientific experience in the knowledge area.

The BABT journal is strict to the format of initial submissions, it **must** be using the template attached [here](#).

Important: Manuscripts that do not comply with the standards set for submission will be unsubmitted and returned to the authors until it is correct to be sent to the reviewers' appreciation.

All the information must be presented in a **single file .docx** format, including **all author information and ORCID ID's** All the **figures and tables** must be **presented along the text**, and the manuscript must have **less than 15 pages total**.

While using the template please use the Styles gallery to format your manuscript.

A guide to the styles contained in the template is shown below.

#### **Title**

- Must fit on maximum 3 lines in print
- Font: Arial, 20 pt, Bold, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 12 pt,
- Must be precise, clearly reflecting the content of the manuscript. (Put each word in upper case).

#### **Author's name**

- Without titles or graduations, preferably without abbreviations
- Font: Arial, 11 pt, Bold, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 0 pt,
- Corresponding author(s) should be identified with an asterisk.

#### **Author's ORCID**

- Format: <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>
- Font: Arial, 10 pt, Left, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 12 pt,
- It's mandatory to all authors.

IMPORTANT: If there is more than 4 Authors you can put the list in two columns

#### **Affiliation**

- must be submitted in English or Latin languages
- Format: University, College, Department, City, State, Country.
- Font: Arial, 10 pt, Left, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 8 pt,

- It's mandatory to all authors.

### **Highlights**

Research highlights concisely summarize the core findings and provide readers with an overview of the paper. They include three to five bullet points describing the main achievements of the research (e.g., results or conclusions) and highlight what is unique about the study.

- Include 2 to 4 highlights.
- Maximum 85 characters in each highlight including spaces.
- Only the core results of the paper should be covered.
- Write the research highlight in the present tense.
- Be concise and specific.
- Font: Arial, 11 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 12 pt,

### **Abstract**

- Font: Arial, 11 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 12 pt. The word abstract before is Bold.

A single paragraph of about 250 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, **but without headings: Background:** Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; **Methods:** Briefly describe the main methods or treatments applied; **Results:** Summarize the article's main findings; and **Conclusion:** Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article, it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusion.

### **Keywords**

- keyword 1; keyword 2; keyword 3. List three to six pertinent keywords specific to the article; yet reasonably common within the subject discipline.
- Font: Arial, 11 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space After: 12 pt. The word Keywords before is Bold.

### **Graphical Abstract (Optional)**

A Graphical Abstract is a single, concise, pictorial and visual summary of the main findings of the article. This could either be the concluding figure from the article or a figure that is specially designed for the purpose, which captures the content of the article for readers at a single glance.

### **Main Sections**

- Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Patents, References.
- Font: Arial, 11 pt. Bold, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 6 pt.

### **Subsections**

- Subsection
  - Font: Arial, 11 pt. Bold, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 6 pt.
- Subsubsection
  - Font: Arial, 11 pt. Italic, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 6 pt.
- Subsubsubsection
  - Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 6 pt.

### **Introduction**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indent de 0,75cm.

The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The current state of the research field should be reviewed carefully, and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work. References should be numbered in order of appearance and indicated by a numeral or numerals in square brackets, e.g., [1] or [2,3], or [4–6]. See the end of the document for further details on references.

### **Materials and Methods**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indent de 0,75cm.

Material and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on published results. Please note that publication of your manuscript implicates that you must make all materials, data, computer code, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information in cover letter. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. This section may be divided by subheadings as reported below.

### **Results**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indents de 0,75cm.

It should provide a concise and accurate description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusion that can be drawn.

### **Figures Tables and Schemes**

- Put all figures tables and schemes in their correct place in the text

- All figures and tables should be cited in the main text numbered consecutively in Arabic digits as Figure 1, Table 1, etc

### Tables

- Table Caption Font: Arial, 10 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 0 pt.

Each table should be accompanied by a short title sentence describing what the table shows. Further details can be included as footnotes to the table.

- Table Body Font: Arial, 11 pt., Centred, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt.

Vertical and Diagonal lines must not be used in tables

- Table Footer Font: Arial, 10 pt, Centered, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 12 pt.

**IMPORTANT:** The tables must be elaborated and edited in cells, using the resources of the text editor. Observation: Tables in figure format are not accepted, or that contain lines drawn.

Tables that are too large for portrait pages should be placed on a separate page in the sequence they appear in the text, in landscape mode, as in the example page below

### Figures and Schemes

- Figure Caption Font: Arial, 10 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 12 pt.
- If there are multiple panels, they should be listed as: (a) Description of what is contained in the first panel; (b) Description of what is contained in the second panel.
- Images should have a minimum **resolution of 300 dpi**.
- A caption on a single line should be centered.
- Figures should be submitted preferably in color, the texts inside the figures must be legible.
- When figures present different parts, each one must be indicated by uppercase (Fig. 1 A, B, C, etc.).

### Equations and Theorems

- Equations must not be in image format.
- They must be numbered
- Equation: Arial, 11 pt, Centered, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 6 pt. Space After: 6 pt.
- Theorems: Arial, 11 pt, Italic Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 8 pt. The word Theorem n<sup>o</sup> in the beginning of the sentence is Bold
- Proof of Theorems: Arial, 11 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 8 pt. The word Proof of Theorem n<sup>o</sup> in the beginning of the sentence is Bold

### **Discussion**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indents de 0,75cm.
- Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted.

### **Conclusions**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indents de 0,75cm.
- This section is not mandatory but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.

### **Patents**

- Font: Arial, 11 pt., Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. First line indents de 0,75cm.
- This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

### **Funding**

- Arial, 10 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 0 pt. The word Funding in the beginning of the sentence is Bold

Please add: "This research received no external funding" or "This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX". Check carefully that the details given are accurate.

### **Acknowledgments**

- Arial, 10 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 0 pt. The word Acknowledgments in the beginning of the sentence is Bold

In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

### **Conflicts of Interest**

- Arial, 10 pt, Justified, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 12 pt. Space After: 0 pt. The word Conflicts of Interest in the beginning of the sentence is Bold

Declare conflicts of interest or state, "The authors declare no conflict of interest." Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state, "The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the

decision to publish the results". "The "Authors have authorization by the company <Name of the company> to disclose the data and images used in this article"

### **References**

References must be numbered in order of appearance in the text (including citations in tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, Reference Manager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. In the text, reference numbers should be placed in square brackets [ ], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3].

- Arial, 10 pt, Left Aligned, Line Spacing: 1,0 (Simple), Space Before: 0 pt. Space After: 0 pt. Numbered

Reference list should be in Font 10, with organized in numerical order. The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style:

### **References Guide**

Manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the **Vancouver Style**. In this case, authors should follow the guidelines in the link bellow and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here.

[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

**IMPORTANT:** There will be no restrictions on the reference article source language, despite the recommendation be in English, however the title should be translated and presented in English, between brackets

**Important:** Save the file in **.doc or .docx** format.