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

Brendha Araújo de Sousa (SOUSA, B. A) [1]*; Gustavo Oliveira Everton (EVERTON, G. O.)[1]
Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho (MOUCHREK FILHO, V. E.)[1].
[1]Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleo Essenciais, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil. *autor.
*Correio eletrônico: asbrendha@gmail.com

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^{-1} 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_{50} de 85,20 mg L^{-1}, CE_{50} de 77,23 mg L^{-1}, CE_{50} de 88,13 mg L^{-1}, CE_{50} de 45,30 mg L^{-1} 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_{50} de 161,84 mg L^{-1}, CE_{50} de 220,07 mg L^{-1}, CE_{50} de 186,85 mg L^{-1} e CE_{50} de 252,67 mg L^{-1}, 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.

INTRODUÇÃO

As plantas expressam sua individualidade química através da produção de metabólitos secundários, que estão diretamente ligados às suas defesas e desenvolvimento, sendo caracterizadas pelo seu caráter medicinal devido as fontes expressivas de metabólitos biologicamente ativos que as constitui (MIRAHMADI et al., 2011; TOHIDI et al., 2019). 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 (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). Estudos apontam que os óleos essenciais do pericarpo de frutas cítricas apresentam potencial para tratamento de diversas condições patológicas (AMORIM et al., 2016). E *Laurus nobilis* L. 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, linalol, eugenol e carvacrol, com diversas atividades biológicas, dentre elas têm-se atividade anticancerígena, antimicrobiana, herbicida e inseticida, moluscicida, inseticida e neuroprotetoras (GUEDOUARI&NABIEV, 2021). Sendo ambas as espécies em potencial detentora de características relevantes para o desenvolvimento desse estudo.

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). Os fármacos fitoterápicos se colocam como opção de tratamento dentro da indústria dos cosméticos e farmacêutica tanto para o tratamento de doenças de origem inflamatórias como para a intenção de combate aos sinais de envelhecimento e cuidados com a pele, devido ao 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, (CHEN et al., 2018; FANIN et al., 2020).

Estudos apontam um aumento no potencial da ação de bioativos naturais hidrofóbicos quando trabalhado com nanoemulsões (ANWER et al., 2014). 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), unindo o conceito de produtos naturais a sistema tecnológico (FAUSTINO et al., 2020).

Ainda não se têm 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.

OBJETIVOS

- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial das cascas de *Citrus limonia* Osbeck e do óleo essencial das folhas de *Laurus nobilis* L.
- 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* 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 antioxidante do óleo essencial e nanoemulsões de *Citrus limonia* Osbeck / *Laurus nobilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

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

Extração dos OE's

Para extração do óleo essencial, foi aplicada a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor. Foram utilizadas 50g de cada um dos dois materiais vegetais ao mesmo balão de fundo redondo, adicionando-se água destilada na proporção de (1:8). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 3h e logo após recolheu-se o óleo essencial extraído. O óleo essencial foi seco por percolação com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e centrifugado. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em vials de vidro âmbar sob refrigeração de 4°C. Posteriormente submetidos as análises. As espécies utilizadas também foram extraídas individualmente e submetidas a todas as mesmas análises e processos do óleo essencial obtido por processo cruzado.

Constituintes químicos

Os constituintes dos OE's foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa AMDIS (*Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System*).

Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais do óleo essencial foi realizada com adaptação do método de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002). Utilizou-se 5 mg do óleo essencial diluído em 1 mL de etanol. A esta solução foram adicionados 7 mL de água destilada, 800 µL do reagente Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3, 20% m/v). Após duas horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de 760 nm. A curva padrão foi expressa em mg L^{-1} de ácido tânico.

Preparo das nanoemulsões por método de inversão de fases

O preparo das nanoemulsões foi realizado de acordo com as metodologias adaptadas descritas por Lima et al. (2020), Sugumar et al. (2014), Kubitschek et al. (2014) e Rodrigues et al. (2014) seguindo o método de inversão de fases. As nanoemulsões óleo-

em-água foram formuladas com o óleo essencial (5%v/v), surfactante não iônico (Tween 20, 5%,10% e 15% v/v) e água. As quantidades necessárias de cada constituinte da fase oleosa (óleo+Tween20) foram aquecidas a 65 ± 5 °C. A fase aquosa foi aquecida separadamente a 65 ± 5 °C. As formulações que passaram nos testes de estresse termodinâmico foram levadas as análises posteriores.

Atividade Antioxidante por descoloração de radicais hidroxila (R-OH·)

A atividade antioxidante foi feita pelo método espectrofotométrico de eliminação de radicais hidroxila do ácido salicílico de acordo com os métodos descritos por Smirnoff&Cumbes (1989) e Sundararajan et al. (2016). As nanoemulsões e os óleos essenciais em diferentes concentrações de 10-100 mg L^{-1} foram dissolvidos em água destilada e DMSO 0,2%, respectivamente. Foram adicionadas a essas concentrações 1 mL de ácido salicílico (9 mM),1 mL de sulfato ferroso (9 mM) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (9 mM). 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 Antioxidante por desnaturação proteica de albumina

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo método de desnaturação proteica de albumina por degradação térmica (PADMANABHAN&JANGLE, 2012). A mistura reacional (4 mL) consistiu em 2 mL de diferentes concentrações do e das nanoemulsões (100-500 mg L^{-1}) e 2 mL de uma solução a 10% de albumina diluída em PBS e incubada a (37±1) °C por 15 minutos. A desnaturação foi induzida mantendo a mistura de reação a 60°C em banho-maria por 10 minutos. Após o resfriamento, a absorbância foi medida em 660 nm em espectrofotômetro UV/VIS. 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^{-1}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constituintes químicos

De acordo com a CG/EM foram identificados como constituintes majoritários na amostra do OE de *Citrus limonia* o limoneno com 40,25% da composição, seguido pelo β-pineno (29,36%) e cimeno (16,33%). E no OE de *Laurus nobilis* L. foram identificados isoeugenol com 64,36%, seguido por mirceno (12,1%), chavicol (10,22%) e linalol (3,6%) como majoritários na amostra.

A composição química do OE das cascas de *C. limonia* foi semelhante a outras espécies de *Citrus*, como *C. aurantifolia* e *C. limon* descritas na literatura anteriormente por Simas et al. (2015). E o percentual de limoneno está dentro do valor esperado para espécies cítricas que podem atingir de 30 a 80% da composição total (LADANIYA, 2008; AMORIM et al., 2016).

Os componentes identificados no OE das folhas de *L. nobilis* nesse estudo estão de acordo com os destacados por Peixoto et al. (2017), que identificaram 26 componentes químicos ao analisarem o óleo essencial de *L. nobilis*, tendo também como principal o isoeugenol (53,5%), seguido por mirceno (16,6%) e chavicol (10,2%) e diferem dos apresentados por Tomar et al. (2020) em que os resultados mostraram como principais constituintes para o OE obtido das folhas de *Laurus nobilis* o 1,8-cineol (41,1%), sabineno (6,96%), α-pineno (5,94%), epóxido de humuleno II (5,73%) e α-terpinil acetato (5,72%).

As substâncias identificadas na CG-EM do óleo essencial estudado, o limoneno, β-pineno e linalol são descritos na literatura por possuírem das mais variadas atividades biológicas (KUMMER et al., 2013; MOREIRA et al., 2013). E Neves et al. (2008), assim como Casanova&Costa (2017) relataram sobre os efeitos de sinergismo e/ou antagonismo

de constituintes químicos, ainda que em porcentagens minoritárias nos óleos essenciais, e apontam o aumento das atividades biológicas partirem de interações sinérgicas entre os mais diversos componentes de uma planta ou combinações entre elas.

As diferenças na composição do óleo essencial neste estudo e nas demais literaturas, podem ser devidas a uma série de fatores, envolvendo desde o método de processamento e extração dos óleos até as características do solo, entre outros.

Fenólicos Totais

Os resultados do teor de fenólicos dos OE's referente as espécies de *C. limonia* e *L. nobilis*, assim como seus bioprodutos obtidos por sua extração cruzada são apresentadas na Tabela 1. O conteúdo fenólico (CFT) foi expresso em equivalente de ácido tânico (mg EAT g^{-1} 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.

Tabela 1 – Conteúdo fenólico total dos óleos essenciais

Óleo Essencial	CFT (mg EAT g^{-1})	Equação Linear	R^2
C. limonia* e *L. nobilis	252,35	y = 0,0586x + 0,0600	0,9998
C. limonia	306,47		
L. nobilis	221,79		

Consonante a Tabela 1, os OE's 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^{-1}, notando-se um elevado aumento em seu quantitativo se comparado ao teor fenólico apresentado pelo OE de *L. nobilis*, sob as mesmas condições.

Os resultados obtidos para os OE's em estudo revelam um superior teor de fenólicos, quando comparado ao obtido por Migliorini et al. (2016), que relatam para o teor total de fenólicos para extratos hidroalcoólicos das cascas de *C. limonia* um quantitativo de 196,05 ± 7,67 e 188 ± 7,22 mg EAG g^{-1}. Com relação ao resultado obtido para *Laurus nobilis*, Dhifi et al. (2018) apontaram um conteúdo total de fenólicos menor em 174,1 ± 11,6 mg EAG g^{-1}, para extrato metanoico de *Laurus nobilis*. Dobroslavić et al. (2021) descreveram para extratos de *Laurus nobilis* obtidos por extração assistida por microondas (EAM) um conteúdo fenólico total com variação de 30,88 a 53,57 mg EAG g^{-1}.

Segundo Goudjil et al. (2015) os compostos fenólicos apresentam uma alta atividade antioxidante *in vitro*, e englobam componentes polares. E Silva et al. (2010) descreve que esses compostos atuam como antioxidantes, não apenas pela 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. Neves (2015) também descreve sob a capacidade dos compostos fenólicos de inibir enzimas ativas no decorrer do processo inflamatório. E como aponta Ambriz-pérez et al (2016), esses compostos podem exercer diversas ações anti-inflamatórias atuando de várias formas, enquanto geralmente fármacos vêm agindo e atuando de maneira mais específica.

Assim como, Gobbo-Neto&Lopes (2007) 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

A Tabela 2 mostra os resultados relacionados a capacidade de redução do radical hidroxila dos óleos essenciais e nanoemulsões, calculando-se a concentração eficiente CE_{50}

em mg L^{-1}, sendo considerada a proporcionalidade inversa da relação entre a atividade de um composto vegetal e valores de CE_{50}.

Tabela 2 - Capacidade antioxidante dos óleos essenciais e das nanoemulsões

Identificação	CE_{50} (mg L^{-1})	R^2
OE *C. limonia* e *L. nobilis*	85,20	0,9983
OE *C. limonia*	59,44	0,9941
OE *L. nobilis*	70,31	0,9969
NOE 1 *C. limonia*	68,61	0,9945
NOE 2 *C. limonia*	57,08	0,9984
NOE 3 *C. limonia*	52,71	0,9955
NOE 1 *L. nobilis*	52,12	0,9815
NOE 2 *L. nobilis*	29,45	0,9985
NOE 3 *L. nobilis*	13,46	0,9969
NOE 1 *C. limonia* e *L. nobilis*	77,23	0,9977
NOE 2 *C. limonia* e *L. nobilis*	88,13	0,9998
NOE 3 *C. limonia* e *L. nobilis*	45,30	0,9984

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_2O; 2 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 10% Tween 20 e 85% de H_2O; 3 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 15% Tween 20 e 80% de H_2O.

Este estudo descreve de forma inédita um óleo essencial obtido de uma extração cruzada, o que ressalta a importância deste trabalho. Em concordância com a Tabela 2, todos os óleos essenciais e formulações de nanoemulsões desenvolvidas por esse método apresentaram valores significativos, comprovando uma ação efetiva frente ao sistema empregado, apontando a existência da capacidade de alteração de processos oxidativos de uma reação. Sendo assim, classificados em ativos segundo o critério estabelecido por Campos et al. (2003), que estabelece que produtos naturais com CE_{50} menor que 500 mg L^{-1} 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_{50}. 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 Sousa et al. (2007), 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 OE em reduzir o radical hidroxila em 50%.

Até onde nossa pesquisa de literatura pôde verificar, a atividade antioxidante dos OE's e nanoemulsões das espécies em estudo não foi encontrada por esse método, no entanto ela aponta que a ação antioxidante pode sofrer alterações devido a efeitos sinérgicos e antagônicos entre componentes presentes nos OE's (MSSILLOU *et al*., 2020). Apontando também que espécies do gênero *Citrus* costumam possuir uma boa atividade antioxidante, como Lou et al. (2017) que estudaram o potencial do OE 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 com inibição diferente em relação ao OE de *L. nobilis* do que os apresentados por Ballen et al. (2019), que obtiveram uma atividade

antioxidante com CI_{50} de 4,749 mg mL^{-1} utilizando o método de DPPH. Ainda segundo Goudjil et al. (2015), a ação do óleo essencial de *L. nobilis* obteve uma inibição com CI_{50} de 72,78 µg mL^{-1} pelo ensaio DPPH e uma CE_{50} de 14,66 µg mL^{-1} pelo ensaio FRAP. A divergência nos valores apresentados pode ser devido a fatores intrínsecos e extrínsecos a que a planta está sujeita, bem como a sazonalidade e idade do vegetal.

Segundo Wojtunik, et al. (2014), 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 Ferreira et al. (2020), 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

A Tabela 3, mostra os resultados relacionados a capacidade de ação anti-inflamatória dos OE e nanoemulsões estáveis de *C. limonia* e *L. nobilis*.

Tabela 3 - Ação anti-inflamatória dos óleos essenciais e das nanoemulsões

Identificação	CE_{50}/IC_{50} (mg L^{-1})	R^2
OE *C. limonia* e *L. nobilis*	161,84	0,9987
OE *C. limonia*	431,16	0,9933
OE *L. nobilis*	150,49	0,9971
NOE 1 *C. limonia*	305,98	0,9997
NOE 2 *C. limonia*	187,50	0,9844
NOE 3 *C. limonia*	279,67	0,9839
NOE 1 *L. nobilis*	153,02	0,9904
NOE 2 *L. nobilis*	258,39	0,9975
NOE 3 *L. nobilis*	374,29	0,9999
NOE 1 *C. limonia* e *L. nobilis*	220,07	0,9976
NOE 2 *C. limonia* e *L. nobilis*	186,85	0,9888
NOE 3 *C. limonia* e *L. nobilis*	252,67	0,9917

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_2O; 2 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 10% Tween 20 e 85% de H_2O; 3 – Nanoemulsão composição 5% óleo essencial, 15% Tween 20 e 80% de H_2O.

Após a realização dos experimentos, o ensaio de concentração eficiente 50% quantificou uma CE_{50} que variou de 150,49 a 431,16 mg L^{-1} para a capacidade de ação das amostras testadas em inibir a desnaturação da albumina por degradação térmica, 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 OE referente a esse tipo de sinergia apresentada neste estudo, obtido por extração cruzada dessas espécies, e de suas respectivas nanoemulsões utilizados nesses testes, mas de acordo com Loe et al. (2018), essa capacidade de inibição pode ser atribuída devido a presença de substâncias bioativas que inibem a inflamação. Demonstrando o quanto se faz necessário esse trabalho para posteriores estudos.

A ação anti-inflamatória apontada para as espécies em estudo também foi observada no estudo de Amorim et al. (2016) utilizando modelos com ensaios *in vivo* em camundongos, através da lambedura de pata induzida por formalina do OE em reduzir a migração celular induzida por carragenina no modelo de bolsa de ar subcutâneo (SAP),

apresentaram resultados satísfatorios para o OE de *C. limonia* com doses de 100 mg kg^{-1}, enquanto, Sayyah et al. (2003) obtiveram resultados com doses de 2 mg kg^{-1} para OE de *L. nobilis* realizando um estudo *in vivo*. O estudo *in vivo* realizado por Guedouari&nabiev (2021), em que a capacidade anti-inflamatória foi avaliada o extrato etanólico das folhas de *L. nobilis* apresentou uma redução de um percentual de inibição de 30,62% no volume da pata, enquanto a atividade do diclofenaco sódico, usado como referência, exibiu um percentual de 17,59% de redução do edema.

Outras nanoemulsões são descritas na literatura para outras espécies vegetais, porém com resultados inferiores, a exemplo Abdelhameed et al. (2021) que relataram uma ação anti-inflamatória significativa da nanoemulsão do óleo essencial dos brotos de *Araucaria bidiwillii*, no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, nas vias orais de 50 e 100 mg kg^{-1}. Utilizando o mesmo método *in vivo*, Borges et al. (2018) apresentaram um estudo com uma eficácia em dose de 498 mg kg^{-1}, para uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Segundo Chen et al. (2018) e Yesmin et al. (2020), 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 Borges et al. (2019), os anti-inflamatórios têm o intuito de amenizar ou impedir uma reação inflamatória.

Conclusões

Por fim, o óleo essencial obtido por extração cruzada, assim como sua nanoemulsão apresentaram de forma inédita propriedades significativas para as ações antioxidante e anti-inflamatória, atenuando possíveis reações desses processos. Os métodos utilizados na obtenção dos quantitativos de CE_{50} para as espécies em estudo frente as atividades analisadas *in vitro* são inéditos, não sendo encontrados relatos na literatura e apresentam resultados expressivos e eficientes. Conclui-se também que o uso do óleo e principalmente das nanoemulsões pode ser utilizado como mecanismo para melhor distribuição e durabilidade, além do seu potencial químico e biológico, sendo incentivados assim futuras pesquisas fitoquímicas e farmacológicas que devem expandir ainda mais os resultados deste estudo abrindo caminhos para novos itens terapêuticos devido principalmente a intensificação de buscas por antioxidantes naturais. Além disso, afirma-se que o produto avaliado possui parâmetros essenciais como o baixo custo, devido ao reaproveitamento de materiais de descarte (cascas), qualificando-o como promissor.

REFERÊNCIAS

ABDELHAMEED, M. F. et al. Oral and Topical Anti-Inflammatory and Antipyretic Potentialities of Araucaria bidiwillii Shoot Essential Oil and Its Nanoemulsion in Relation to Chemical Composition. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5833, 2021.

AMBRIZ-PÉREZ, D. L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016.

AMORIM, J. L. 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, M. K. et al. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of oleo science**, p. ess13213, 2014.

BALLEN, S. C. et al. Determinação do potencial antioxidante (DPPH) e antimicrobiano de extratos vegetais e óleo essencial de louro (Laurus nobilis). **Perspectiva**. v.43, n.163, p.61-70, 2019.

BARBOSA, L. N. 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.

BORGES, R. S. et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of Rosmarinus officinalis L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 183-195, 2018.
BORGES, R. S. et al. Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of ethnopharmacology**, v. 229, p. 29-45, 2019.
CAMPOS, M. G. et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.
CAPUTO, L. et al. Laurus nobilis: Composition of essential oil and its biological activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 930, 2017.
CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.
CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2018.
DHIFI, W. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian Laurus nobilis. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 31, n. 6, p. 2397-2402, 2018.
DOBROSLAVIĆ, E. et al. Polyphenolic characterization and antioxidant capacity of Laurus nobilis L. leaf extracts obtained by green and conventional extraction techniques. **Processes**, v. 9, n. 10, p. 1840, 2021.
FANIN, M. et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por Staphylococcus aureus. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 14, n. 1, p. 24-32, 2020.
FAUSTINO, C. G. et al. Larvicide Activity on Aedes aegypti of Essential Oil Nanoemulsion from the Protium heptaphyllum Resin. **Molecules**, v.25, n.22, p.5333, 2020.
FERREIRA, A. M. et al. Constituintes químicos, toxicidade, potencial antioxidante e atividade larvicida frente a larvas de Aedes aegypti do óleo essencial de Aniba rosaeodora Ducke. **Research, Society and Development**, v.9, n. 8, p. e520985663-e520985663, 2020.
GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
GOUDJIL, M. B. et al. Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian Laurus nobilis Lauraceae. **J. chem. pharm. res**, v. 7, n. 1, p. 379-385, 2015.
GUEDOUARI, R.; NABIEV, M. Anti-inflammatory activity of different extracts from Laurus nobilis growing in Algeria. **Algerian Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 4, 2021.
KUBITSCHEK-KM, Amapá–Rodovia Juscelino; ZERO, Jardim Marco. Development of jojoba oil (Simmondsia chinensis (Link) CK Schneid.) based nanoemulsions. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 33, n. 3, p. 459-63, 2014.
KUMMER. R. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of Citrus latifolia Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, 2013.
LADANIYA, M. S. Commercial fresh citrus cultivars and producing countries. **Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation. Academic Press,San Diego**, p.13-65, 2008.
LIMA, T. C. P. et al. Desenvolvimento de nanogel de Copaifera reticulata sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. **Saúde e Pesquisa**, v. 13, n. 1, 2020.
LOE, G. E. *et al.* Evaluation des activités anti-inflammatoire et antiradicalaire de l'extrait au vin de palme des feuilles de Phragmanthera capitata (Sprengel) S. Balle (Loranthaceae) récoltées sur Psidium guajava au Cameroun. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 233-243, 2018.
LOU, Z. et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis and its nanoemulsion. **LWT**, v. 80, p. 371-377, 2017.
MSSILLOU, I. *et al*. Chemical composition, antioxidant activity, and antifungal effects of essential oil from Laurus nobilis L. flowers growing in Morocco. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020.
MIGLIORINI, A. A. et al. Polifenóis do limão-cravo: Otimização do processo de extração. **XXV Encontro Anual de Iniciação Científico. II Encontro Anual de Inicíação Científico Júnior**. 2016.

MIRAHMADI, S. F. 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.
MOREIRA I. J. A. et al. Prospecção tecnológica da utilização do Beta-pineno. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 2, p. 186-194, 2013.
NEVES, B. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de Siphoneugena reitzii d.(myrtaceae) e de monoterpenos isolados. **Salão de Iniciação Científica (20.: 2008 out. 20-24: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.**, 2008.
NEVES, P. D. O. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, 2015.
PADMANABHAN, P.; JANGLE, S. N. Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. **International journal of basic and applied medical sciences**, v. 2, n. 1, p. 109-116, 2012.
PEIXOTO, L. R. et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of Laurus nobilis Linnaeus essential oil against Candida spp. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.
RODRIGUES, E. C. R. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (Copaifera duckei) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, n.6, p.699-705, 2014.
SAYYAH, M. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis Linn. **Phytotherapy research**, v. 17, n. 7, p. 733-736, 2003.
SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic reviews in pharmacy**, v. 1, n. 1, 2010.
SILVA, D. T. 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.
SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
SIMAS, D. L. R. et al. Characterization of essential oils of citrus fruits. **Citrus Research and Technology**, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.
SMIRNOFF, N; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1057-1060, 1989.
SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
STEFFENS, A. H. **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.
SUGUMAR, S. et al. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against Culex quinquefasciatus. **Bulletin of entomological research**, v.104, n.3, p. 393-402, 2014.
SUNDARARAJAN, R.; KODURU, R. In vitro antioxidant activity on roots of Limnophila heterophylla. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2016.
TOHIDI, B. *et al*. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of Thymus species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89-99, 2019.
TOMAR, O. et al. Composition and antibacterial effects of laurel (Laurus nobilis L.) leaves essential oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.23, n. 2, p. 414-421, 2020.
WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2002
WOJTUNIK, K. A.; CIESLA, L. M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9088-9094, 2014.
YESMIN, S. et al. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (Piper chaba). **Clinical Phytoscience**, v.6, n.1, p.1-10, 2020.