



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

REBECA DIAS DOS SANTOS

**Determinação da atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de goiaba
(*Psidium guajava*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e de suas nanoemulsões**

BRASÍLIA - DF

2025

REBECA DIAS DOS SANTOS

**Determinação da atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de goiaba
(*Psidium guajava*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e de suas nanoemulsões**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BRASÍLIA - DF

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d722d dos Santos, Rebeca Dias
Determinação da atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de goiaba (*Psidium guajava*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e de suas nanoemulsões / Rebeca Dias dos Santos; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador Guilherme Martins Gelfuso. -- Brasília, 2025.
108 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)
-- Universidade de Brasília, 2025.

1. Óleos essenciais. 2. Nanoformulação. 3. Estudos de estabilidade. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Curva de tempo-morte. I. Orsi, Daniela Castilho, orient. II. Gelfuso, Guilherme Martins, co-orient. III. Título.

REBECA DIAS DOS SANTOS

**Determinação da atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de goiaba
(*Psidium guajava*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e de suas nanoemulsões**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (presidente)

Universidade de Brasília/PPGCTS

Profa. Dra. Calliandra Maria de Souza Silva (membro avaliador)

Universidade de Brasília/PPGCTS

Profa. Dra. Vania Silva Carvalho (membro avaliador)

Instituto Federal Goiano/IFG

Profa. Dra. Livia Cristina Lira de Sa Barreto (suplente)

Universidade de Brasília/FCTS

À Deus por toda bondade e bênçãos que têm derramado sobre minha vida, aos meus pais por todo apoio e compreensão e, à minha irmã por todo carinho e suporte.

AGRADECIMENTOS

Ao encerrar mais uma etapa acadêmica não posso deixar de agradecer àqueles que sempre estavam a me apoiar e a me levantar nos momentos mais difíceis.

Agradeço à Deus, por sempre estar ao meu lado e me sustentar em todos os momentos. Agradeço à Ele por ter colocado tantas pessoas boas e gentis perto de mim. Agradeço pelo dom da vida e pela vitória de ter conquistado mais uma etapa.

Sou muito grata à minha mãe, por sempre estar disponível para me ouvir e me ajudar no que for preciso, pelos sacrifícios que faz todos os dias para tornar esse momento possível. Por sua paciência, orações, palavras de força e por ser meu porto seguro em todas as horas; ao meu pai, por seu carinho, amor, e por todas as manhãs que compartilhamos no trânsito; à minha irmã por todas as vezes que me faz rir e por todo o apoio que tem me dado. Quero que todos saibam o quão importante vocês são em minha vida! Sem vocês eu também não teria chegado até aqui!

Ao meu pastor Eliéser, à Juliana e ao Oséias, meus amigos de fé, muito obrigada por todas as orações que têm derramado sobre minha vida! Agradeço também à toda minha família, que sempre esteve orando e torcendo por mim. Tenham certeza de que vocês foram um diferencial nessa trajetória!

Aos pesquisadores e amigos do laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde (FCTS/UnB), agradeço pelos momentos que compartilhamos juntos, pelas surpresas e risadas. Aos meus queridos amigos Daniel, Carla e Letícia, muito obrigada por toda a ajuda durante a confecção desse trabalho. Vocês fazem parte da minha jornada desde a graduação e como foi bom passar por mais essa etapa, cheia de desafios, junto com vocês!

No mestrado, tive a oportunidade de conhecer um novo laboratório, o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC/UnB). Fiz novos amigos e não poderia deixar de agradecê-los aqui. Ao Breno, pesquisador e amigo, agradeço pelo tempo que tem dedicado a mim, pelos ensinamentos e por todo o apoio que tem me dado. Ao João e Rayssa, agradeço por compartilharmos os dois laboratórios (FCTS e LTMAC); como foi bom tê-los conhecido e passado bastante tempo com vocês! Ao Venâncio, pesquisador e amigo, por todos os momentos que compartilhamos juntos, pelas conversas e leveza que elas trouxeram ao laboratório. Ao Samuel, Geisa e demais pesquisadores do laboratório, agradeço pelo tempo que temos passado juntos.

Sempre agradeço a confiança que minha orientadora, professora Daniela, deposita em mim, mesmo com todas as minhas inseguranças! Me sinto abraçada por sua dedicação e comprometimento! A senhora deu um norte na minha vida acadêmica desde a minha graduação.

Hoje, eu olho para trás e percebo o quanto eu evoluí como pesquisadora. A sua paixão pela pesquisa me incentivou a prosseguir nessa jornada acadêmica.

Ao professor Guilherme, meu coorientador, agradeço por ter aberto as portas do LTMAC para a realização do meu trabalho e por me auxiliar nas dúvidas que surgiram. Saiba que seu conhecimento e apoio foram fundamentais para que eu concluísse esse trabalho com êxito.

À professora Izabel, atual coordenadora deste programa, agradeço pelo tempo que dedicou a me ensinar, me corrigir e ajudar com minhas análises. A senhora é um exemplo a ser seguido, uma inspiração!

Agradeço à Universidade de Brasília, pelo espaço concedido à minha pesquisa, à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha bolsa e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo financiamento desta pesquisa.

Para finalizar, quero agradecer a todos os que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho, seja através de envios de livros que me ajudassem a entender o que estava acontecendo nos testes, conversas entre uma curva e outra ou, por meio de orações. Sou grata à Deus pela vida de todos vocês!

“Seja forte e corajoso! Não fique desanimado,
nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus,
estarei com você em qualquer lugar para onde
você for!”

(Josué 1:9)

RESUMO

A goiaba (*Psidium guajava*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*) pertencem à família Myrtaceae e os óleos essenciais extraídos das folhas possuem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Essas características conferem grande potencial para aplicação desses de óleos essenciais nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Porém, a aplicação de óleos essenciais é frequentemente limitada devido à sua volatilidade, baixa solubilidade em água e instabilidade sob várias condições ambientais. Para superar esses desafios, as nanoemulsões surgem como uma solução inovadora, capazes de melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade dos óleos essenciais. Assim, esse estudo teve como objetivo desenvolver nanoemulsões em gel dos óleos essenciais de goiaba e pitanga e determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões. A caracterização química dos óleos essenciais de goiaba e pitanga foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante através dos métodos de ABTS (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e DPPH (ácido 2,2-azinobs-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). As nanoemulsões foram elaboradas e caracterizadas através das análises de tamanho das gotas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. Realizou-se o estudo de estabilidade das nanoemulsões por 30 dias em diferentes temperaturas (4, 40 e 25 °C). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões foi determinada através das seguintes metodologias: método de difusão em ágar; determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo dos óleos essenciais e das nanoemulsões foram realizados contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os principais compostos químicos do óleo essencial de pitanga foram curzereno (34,80%) e germacreno B (11,92%), enquanto o óleo essencial de goiaba apresentou β -cariofileno (25,92%), β -selineno (22,64%) e γ -selineno (19,13%). As nanoemulsões de pitanga e goiaba apresentaram tamanhos de gotículas de 105,30 e 99,50 nm, valores de PDI de 0,32 e 0,43 e potencial zeta de -9,29 e -7,34 mV, respectivamente. Essas nanoemulsões permaneceram estáveis por 30 dias de armazenamento a 25 °C, com tamanhos de gotículas de 104,7 e 103,8 nm, valores de PDI abaixo de 0,50 e sem separação de fases. A nanoemulsão de pitanga exibiu zonas de inibição variando de 8,41 a 15,13 mm contra as bactérias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. Além disso, a nanoemulsão de pitanga mostrou as maiores zonas de inibição contra *Candida albicans* (20,97 mm) e *Candida krusei* (15,20 mm), juntamente com baixos valores de CIM (0,54–1,22 mg/mL) e CBM (4,84–

11,02 mg/mL) contra essas leveduras potencialmente patogênicas. A nanoemulsão de goiaba apresentou baixos valores de CIM (1,26 mg/mL) e CBM (11,35 mg/mL) para *C. krusei*. O ensaio de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo também sugeriu a eficácia das nanoemulsões contra *S. aureus* e *E. coli*, destacando seu potencial como um novo agente terapêutico alternativo.

Palavras-chave: nanoformulação; óleos voláteis; atividade antimicrobiana; estudos de estabilidade; curva de tempo morte.

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava*) and pitanga (*Eugenia uniflora*) belong to the Myrtaceae family, and the essential oils extracted from their leaves possess antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. These characteristics provide great potential for the application of these essential oils in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. However, the application of essential oils is often limited due to their volatility, low water solubility, and instability under various environmental conditions. To overcome these challenges, nanoemulsions have emerged as an innovative solution capable of improving the stability and bioavailability of essential oils. Thus, this study aimed to develop gel-based nanoemulsions containing guava and pitanga essential oils and to determine the antioxidant and antimicrobial activity of both the essential oils and the nanoemulsions. The chemical characterization of guava and pitanga essential oils was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The quantification of total phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu method, while antioxidant activity was assessed using the ABTS (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and DPPH (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) methods. The nanoemulsions were prepared and characterized by analyzing droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential. A stability study was conducted over 30 days at different temperatures (4, 25, and 40 °C). The antimicrobial activity of the essential oils and nanoemulsions was evaluated using the agar diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) tests. Time-kill assays were conducted to assess microbial growth inhibition over time against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The main chemical compounds identified in pitanga essential oil were curzerene (34.80%) and germacrene B (11.92%), while guava essential oil contained β -caryophyllene (25.92%), β -selinene (22.64%), and γ -selinene (19.13%). The pitanga and guava nanoemulsions exhibited droplet sizes of 105.30 and 99.50 nm, PDI values of 0.32 and 0.43, and zeta potentials of -9.29 and -7.34 mV, respectively. These nanoemulsions remained stable after 30 days of storage at 25 °C, maintaining droplet sizes of 104.7 and 103.8 nm, PDI values below 0.50, and no phase separation. The pitanga nanoemulsion exhibited inhibition zones ranging from 8.41 to 15.13 mm against *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. Additionally, the pitanga nanoemulsion demonstrated the highest inhibition zones against *Candida albicans* (20.97 mm) and *Candida krusei* (15.20 mm), along with low MIC (0.54–1.22 mg/mL) and MBC (4.84–11.02 mg/mL) values against these potentially pathogenic yeasts. The guava nanoemulsion exhibited low MIC (1.26 mg/mL) and MBC (11.35 mg/mL)

values for *C. krusei*. The microbial growth inhibition assay over time also suggested the efficacy of the nanoemulsions against *S. aureus* and *E. coli*, highlighting their potential as novel alternative therapeutic agents.

Keywords: nanoformulation; volatile oils; antimicrobial activity; stability studies; time-kill curve.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo de eventos de resistência antimicrobiana.....	22
Figura 2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	24
Figura 3. Tipos de estratégias terapêuticas para combater a RAM	25
Figura 4. Aparelho tipo Clevenger utilizado para extração de óleos essenciais.....	27
Figura 5. Lista de países exportadores de óleos essenciais em 2023	28
Figura 6. Classificação da <i>Psidium guajava</i> L.	29
Figura 7. Goiabeira, suas folhas e frutos	30
Figura 8. Classificação de <i>Eugenia uniflora</i> L.	31
Figura 9. Pitangueira, suas flores, folhas e frutos.....	32
Figura 10. Esquema de nanoemulsão O/A e A/O.....	34
Figura 11. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento na estabilidade das nanoemulsões de goiaba e pitanga.....	52
Figura 12. Inibição de crescimento microbiano ao longo do tempo de <i>S. aureus</i> para diferentes concentrações do óleo essencial de goiaba, pitanga e de suas nanoemulsões	59
Figura 13. Inibição de crescimento microbiano ao longo do tempo de <i>E. coli</i> para diferentes concentrações do óleo essencial de goiaba, pitanga e de suas nanoemulsões	61
Figura 14. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de goiaba	80
Figura 15. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de pitanga.....	80
Figura 16. Curva padrão para determinação da atividade antioxidante (DPPH).....	81
Figura 17. Curva padrão para determinação da atividade antioxidante (ABTS).....	82
Figura 18. Curva padrão para quantificação de compostos fenólicos	83
Figura 19. Nanoemulsões em gel de goiaba e pitanga	84

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de goiaba.....	43
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de pitanga.....	45
Tabela 3. Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais dos óleos essenciais de goiaba e pitanga	48
Tabela 4. Caracterização das nanoemulsões de goiaba e pitanga.....	49
Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de nanoemulsões de goiaba e pitanga, usando o método de difusão em ágar	55
Tabela 6. CIM e CBM dos óleos essenciais de goiaba, pitanga e suas nanoemulsões	57

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1. Composição das nanoemulsões em gel de goiaba e pitanga	38
Quadro 2. Curva padrão de Trolox para DPPH.....	81
Quadro 3. Curva padrão de Trolox para ABTS.....	82
Quadro 4. Curva padrão de Ácido Gálico para quantificação de compostos fenólicos.....	83
Quadro 5. Fotos da estabilidade das nanoemulsões de goiaba e pitanga	85

RELAÇÃO DE APÊNDICES

APÊNDICE A	80
APÊNDICE B.....	81
APÊNDICE C	84

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO A. PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI-1640 PARA O CRESCIMENTO DE LEVEDURAS.....	86
ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO	87

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Símbolo estatístico para desvio padrão, significa mais ou menos
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
µmol.TE/mL	Micromolar equivalente de trolox por mililitro
A/O	Água em óleo
ABTS	2,2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EE	Eficiência de aprisionamento
<i>et al.</i>	E colaboradores
h	hora
HLB	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
HPC	Equipamento para homogeneização de alta pressão
ISO	International Organization for Standardization
Log ₁₀ (UFC/mL)	Unidades Formadoras de Colônias, por mililitro, em logaritmo de 10
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Metros
MDR	Patógenos multirresistentes
mg	Miligrama
mg.GAE/mL	Miligramas equivalentes a ácido gálico por mililitro
mg.TE/g	Miligrama equivalente de trolox por grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
mL/min ⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetros

mV	Milivolts
nm	Nanômetros
NOEG	Nanoemulsão de óleo essencial de goiaba
NOEP	Nanoemulsão de óleo essencial de pitanga
O/A	Óleo em água
°C	Graus célsius
°C/min	Graus célsius por minutos
OEG	Óleo essencial de goiaba
OEP	Óleo essencial de pitanga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
R\$	Moeda brasileira em reais
RAM	Resistência antimicrobiana
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Segundos
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por grama
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	22
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	25
1.3 GOIABA (<i>Psidium guajava</i>) E SEU ÓLEO ESSENCIAL.....	29
1.4 PITANGA (<i>Eugenia uniflora</i>) E SEU ÓLEO ESSENCIAL	31
1.5 SISTEMAS NANOEMULSIONADOS.....	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA.....	37
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA	37
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA	37
3.4 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA.....	38
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA	39
3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA	39
3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA	39
3.7.1 Microrganismos utilizados e preparação do inóculo	39
3.7.2 Teste de difusão em ágar	40
3.7.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	40
3.7.4 Ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo dos óleos essenciais e nanoemulsões de goiaba e pitanga	41
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA ...	43
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA	47

4.3 CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA	49
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES	54
4.4.1 Teste de difusão em ágar	54
4.4.2 Determinação da CIM e CBM	56
4.4.3 Ensaio de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo.....	58
5 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A	80
APÊNDICE B.....	81
APÊNDICE C	84
ANEXO A. PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI-1640 PARA O CRESCIMENTO DE LEVEDURAS.....	86
ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO.....	87

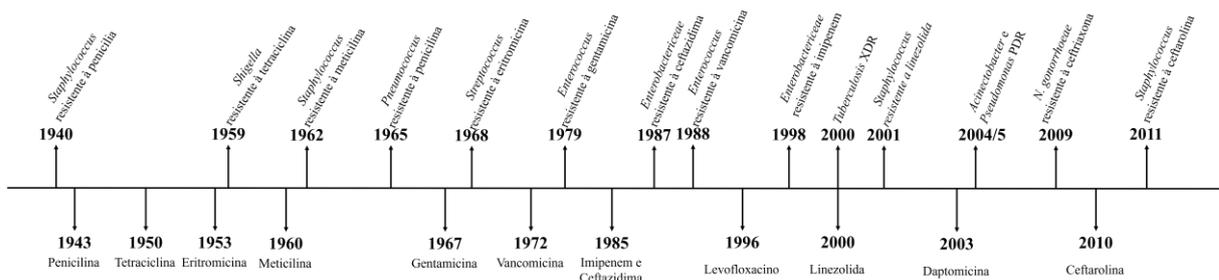
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As arqueas, vírus, bactérias, fungos e algas fazem parte do grupo dos microrganismos. Os microrganismos estão presentes no solo, na água, no corpo humano influenciando os sistemas ecológicos, a saúde humana e a dinâmica de doenças. Os microrganismos têm aproximadamente 3,8 bilhões de anos, sendo os primeiros seres vivos a habitarem a Terra e evoluíram para se adaptar ao mundo em que vivemos (de Souza *et al.*, 2019; Madigan *et al.*, 2016; Teixeira, 2020).

A aquisição de resistência antimicrobiana (RAM) é um exemplo da evolução dos microrganismos (Figura 1). A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser introduzido em 1940 para o tratamento de infecções bacterianas e acreditava-se que ela seria a cura do século¹, mas antes de 1943, o primeiro relato de RAM ocorreu, com a identificação de cepas de *Staphylococcus* resistentes à penicilina. Assim, aumentou-se a busca por novos antibióticos para o tratamento de infecções e, a cada novo antibiótico utilizado, novas cepas resistentes foram sendo identificadas (Baquero *et al.*, 2021; Perry; Waglechner; Wright, 2016; Uddin *et al.*, 2021).

Figura 1. Linha do tempo de eventos de resistência antimicrobiana



Fonte: traduzido e adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013).

Notas: *Tuberculosis* XDR – Tuberculose extensivamente resistente a medicamentos. As datas são baseadas em relatos iniciais de resistência na literatura. No caso de *Acinetobacter* e *Pseudomonas* pan-resistentes a medicamentos (PDR), a data é baseada em relatos de transmissão de assistência médica ou surtos. A penicilina tinha uso limitado antes do uso generalizado na população em 1943.

¹ Após a descoberta da penicilina, iniciou-se a Era Ouro dos antibióticos que durou 30 anos (1940-1970). Até hoje, antibióticos como neomicina e estreptomicina, descobertos nessa época, estão em uso clínico (Uddin *et al.*, 2021).

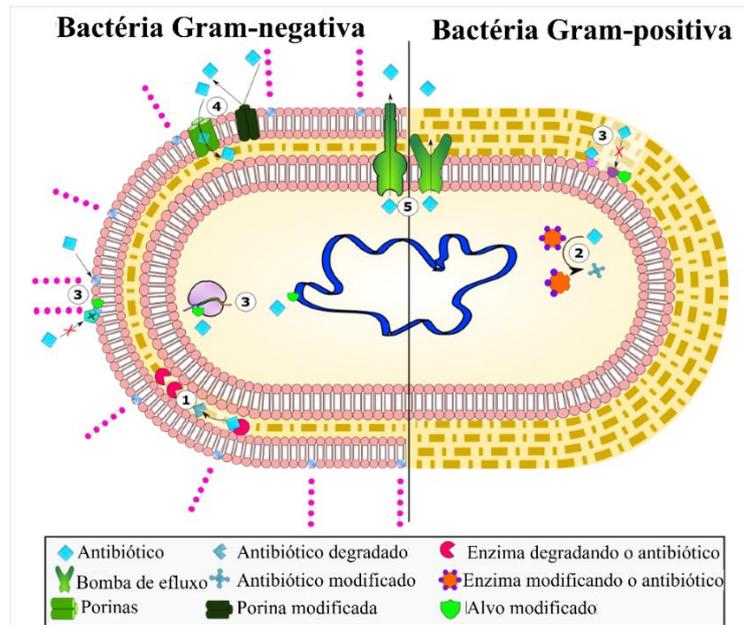
Dessa forma, a resistência antimicrobiana (RAM) acontece quando microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas se tornam resistentes aos antimicrobianos, sendo eles os antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos ou anti-helmínticos. Isso leva à perda de eficácia dos medicamentos, resultando na persistência das infecções no corpo e aumenta o risco de propagação para outras pessoas. A RAM é uma preocupação crítica de saúde global reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Estima-se que até 2050, se não forem implementadas medidas eficazes para resolver esse problema, as infecções resistentes aos antimicrobianos podem levar a até 10 milhões de mortes, com perdas econômicas significativas no valor de bilhões de dólares (da Silva Dantas, 2022; Kasimanickam; Kasimanickam; Kasimanickam, 2021; Murray *et al.*, 2022; Samreen *et al.*, 2021; Volpi; Shehadeh; Mylonakis, 2019; World Health Organization, 2023).

O uso indevido de antibióticos em ambientes de atenção primária é um fator contribuinte para o desenvolvimento da RAM. A presença de cepas multirresistentes em ambientes clínicos representa uma ameaça às opções de tratamento eficazes. Vários países estão enfrentando desafios ao combate de cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (Nodari *et al.*, 2020; Qekwana *et al.*, 2017; Urbiztondo *et al.*, 2017; Veloso, 2023; Zuniga-Moya *et al.*, 2020). Portanto, as estratégias para prevenir a RAM incluem programas de gestão do uso de antimicrobianos e a busca por novos compostos com potencial antimicrobiano (Arshad *et al.*, 2021; Ber Lucien *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2023; Rehman *et al.*, 2018).

Os antibióticos penetram mais facilmente nas bactérias Gram-positivas do que nas Gram-negativas, pois as primeiras possuem apenas uma espessa camada de peptidoglicano em sua parede celular. Já as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) que dificulta a entrada de antibióticos, tornando-as mais resistentes e, frequentemente, mais patogênicas. Além da resistência intrínseca, as bactérias adquirem mecanismos de RAM, sendo eles: bombas de efluxo dos antibióticos; modificações da proteína-alvo; inativação de drogas por meio da hidrólise enzimática; formação de biofilmes e impedimento de entrada dos fármacos nas células (Figura 2) (da Silva Dantas, 2022; Jian *et al.*, 2021; Varela *et al.*, 2021).

Assim, as bactérias resistentes aos antimicrobianos comprometem o manejo e o controle de doenças infecciosas. A prevalência de resistência em patógenos como “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) representa uma ameaça significativa à saúde humana (Barlow *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2020; Reynolds *et al.*, 2022).

Figura 2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos



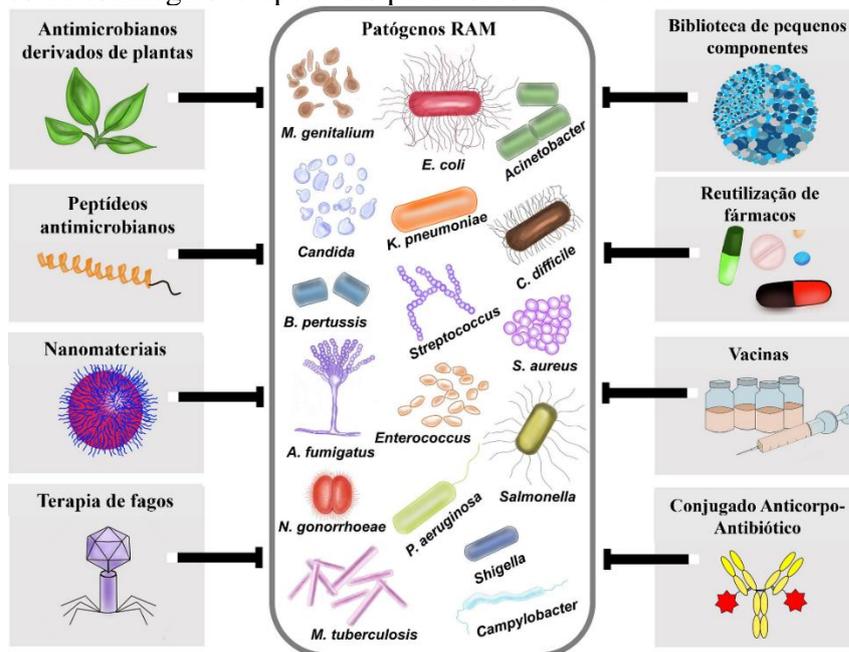
Fonte: Adaptado e traduzido de Varela *et al.* (2021).

Nota: 1) hidrólise enzimática; 2) modificações enzimáticas de antibióticos por transferência de grupo e processo redox; 3) modificações de alvos antibióticos; 4) redução da permeabilidade a antibióticos por modificações de porinas e 5) extrusão ativa de antibióticos por bombas de efluxo de membrana.

Na prática clínica, existem quatro classes principais de antifúngicos sistêmicos para o tratamento de infecções fúngicas: azóis, polienos, equinocandinas e o análogo de pirimidina 5-flucitosina. Devido à limitada diversidade de antifúngicos disponíveis e ao uso prolongado desses medicamentos no tratamento das infecções sistêmicas, algumas cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida auris* já apresentam resistência aos tratamentos antifúngicos convencionais, representando um desafio crescente na terapêutica dessas infecções (Fisher *et al.*, 2022; Rhodes; Fisher, 2019; Veerapandian *et al.*, 2022).

A batalha contínua contra a resistência antimicrobiana tem impulsionado o desenvolvimento de novos compostos para combatê-la em todo o mundo. Essa urgência decorre do aumento alarmante de infecções causadas por patógenos multirresistentes (MDR), que dificultam as opções de tratamento e elevam os custos com saúde. Pesquisas recentes têm explorado diversas estratégias inovadoras para enfrentar esse problema, incluindo o desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos, o uso de compostos naturais e a aplicação da nanotecnologia, oferecendo novas perspectivas para a terapêutica antimicrobiana (Figura 3) (Alamgir, 2024; Duval; Grare; Demoré, 2019; Ikokwu, 2023; Mamun *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2023; St-Pierre *et al.*, 2018; Yakobi, 2024).

Figura 3. Tipos de estratégias terapêuticas para combater a RAM



Fonte: Traduzido de Veerapandian *et al.* (2022).

Dentro da classe de compostos naturais, os óleos essenciais possuem excelentes propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antifúngica. Atualmente, diversos estudos têm relatado o efeito sinérgico das nanoemulsões de óleos essenciais em combinação com antimicrobianos sintéticos. Essas interações sinérgicas potencializam a atividade antimicrobiana, maximizando a eficiência dos agentes combinados. Como resultado, há uma redução significativa nas doses antimicrobianas necessárias desses agentes, o que pode contribuir para minimizar efeitos adversos e retardar o desenvolvimento de RAM (de Sousa *et al.*, 2023; Sattayakhom, Wichit, Koomhin, 2023).

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são definidos pela Organização Internacional para Padronização (ISO - *International Organization for Standardization*, do inglês), como:

“Produto obtido a partir de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo² de frutas cítricas ou por destilação a seco, após separação da fase aquosa – se houver – por processos físicos que não resultem em nenhuma alteração significativa em sua composição (por

² Parte mais externa de um fruto, também conhecida como casca.

exemplo, filtração, decantação, centrifugação)” (International Standard Organization, 2021, p.08).

Portanto, os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, caules, brotos, sementes e raízes. Os óleos essenciais desempenham um papel fundamental na proteção das plantas contra insetos e herbívoros, auxiliam na polinização, contribuem para o controle da temperatura e conferem o aroma característico de cada espécie (Hudz *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2020).

O termo "óleo essencial" foi introduzido pelo alquimista e médico Paracelso (1493-1541), baseado na teoria da "*Quinta essentia*", que em latim antigo significa "quinto elemento". Essa teoria se relaciona com os quatro elementos: fogo, terra, ar e água. Paracelso acreditava que o processo da destilação extraía a "*alma da planta*" ou, a "*quintessência para a cura*", a parte mais importante para a planta, separando os compostos "essenciais" dos "não essenciais". Assim, os óleos essenciais eram usados para procedimentos curativos com benefícios médicos (de Sousa *et al.*, 2023; Sattayakhom, Wichit, Koomhin, 2023).

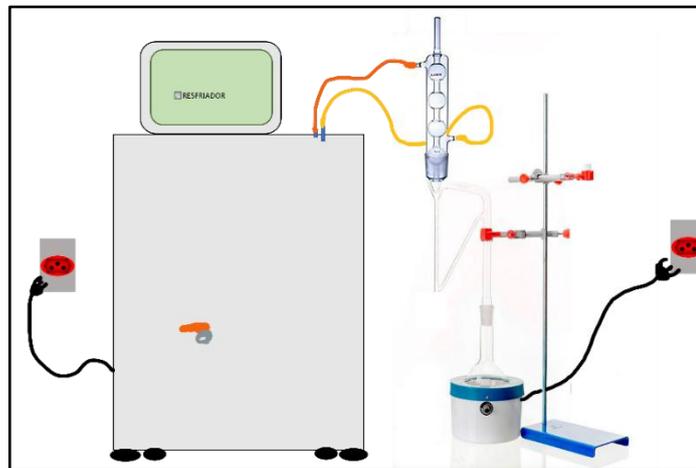
A composição química dos óleos essenciais pode variar conforme fatores ambientais, incluindo a região geográfica, o clima, o tipo de solo e a precipitação, influenciando suas propriedades e aplicações. A variação na composição química dos óleos essenciais confere às plantas de uma mesma espécie diferentes perfis de metabólitos secundários, influenciados pelas condições ambientais da região onde foram coletadas. Amin, Naik e Hussain (2017), ao estudarem a quimiotipagem do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) na Índia, observaram que a concentração de compostos como eucaliptol, cânfora e alfa-pineno pode variar de acordo com as condições de desenvolvimento da planta, evidenciando a influência do ambiente na composição química dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais são compostos complexos, contendo entre 20 e 60 componentes em diferentes concentrações e dentre esses, apenas dois ou três serão os majoritários, ou seja, estão presentes em maiores proporções (20-70%) dentro dos óleos essenciais. Embora todos os componentes contribuam para a atividade biológica dos óleos essenciais, os compostos majoritários geralmente desempenham o papel principal nessas funções. Esses compostos incluem terpenos, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários (de Sousa *et al.*, 2023), que influenciam as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e terapêuticas dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais podem ser extraídos através de métodos que influenciam diretamente seu rendimento e qualidade final. As técnicas de extração utilizadas são: destilação

a vapor, hidrodestilação, extração por solvente, extração por fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas (Abd Elhafez, 2022; Hasibuan, 2024; Hua *et al.*, 2021; Sukasri, 2023; Zhang & Chen, 2020). A destilação a vapor é um dos métodos mais antigos e o mais amplamente utilizado para a extração de óleos essenciais. Esse processo envolve a passagem de vapor através do material vegetal, vaporizando os compostos voláteis. O vapor resultante é então condensado e retorna à forma líquida, permitindo a separação do óleo essencial da água. Para essa técnica, utiliza-se o aparelho de destilação de Clevenger (Figura 4) ou um destilador de óleos essenciais (Abd Elhafez, 2022).

Figura 4. Aparelho tipo Clevenger utilizado para extração de óleos essenciais



Fonte: Autoria própria, 2025.

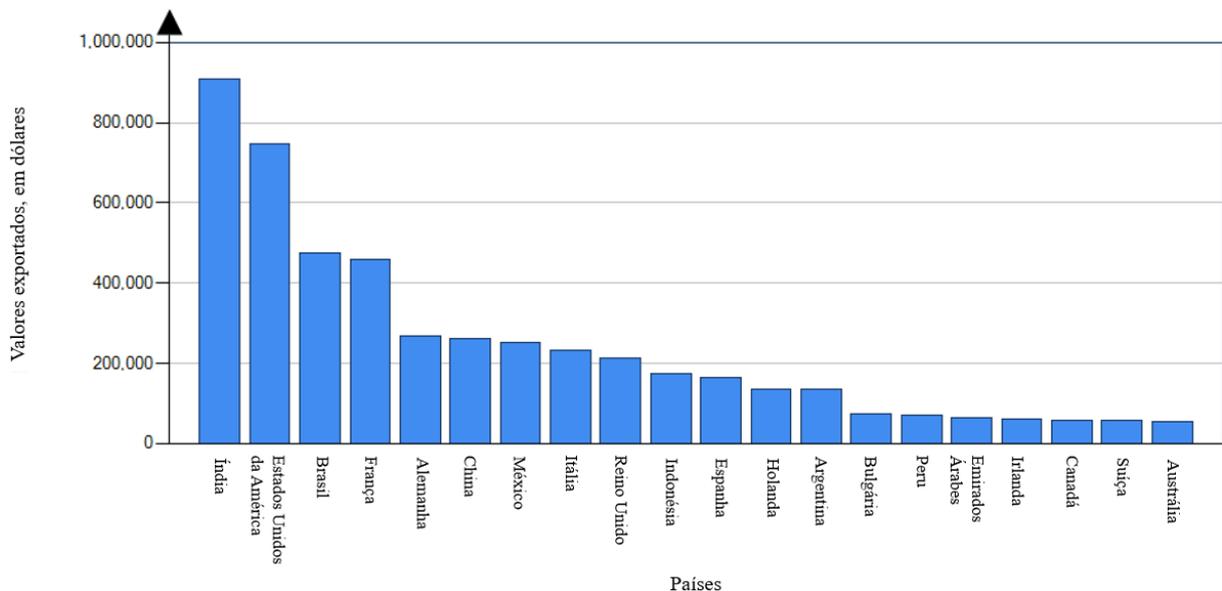
A popularidade dos óleos essenciais cresceu nos últimos anos devido à aromaterapia, uma prática terapêutica que se baseia no uso de óleos essenciais para promover o bem-estar físico, emocional e mental. A aplicação de óleos essenciais na aromaterapia pode ser por meio da inalação, através de difusores, aplicação tópica ou velas aromáticas. Os compostos voláteis presentes no óleo essencial, quando inalados, interagem com o sistema olfativo, que está ligado ao sistema límbico no cérebro, responsável pelas emoções e memórias. Essa interação pode levar a respostas fisiológicas como redução da dor, estresse e ansiedade (Bisson, 2024; Fernandes Girão, 2024a; Fernandes Girão, 2024b, Muhammad *et al.*, 2022; Rahmawati *et al.*, 2022).

Os óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), rosa (*Rosa damascena*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), ylang-ylang (*Cananga odorata*), bergamota (*Citrus bergamia*), gerânio (*Pelargonium graveolens*), camomila (*Matricaria chamomilla*) e de neroli (*Citrus aurantium*) são amplamente utilizados na aromaterapia (Amin *et al.*, 2021; Kalani,

2023; Lee *et al.*, 2021; Lestari *et al.*, 2022; MahdaviKian; Fallahi; Khatony, 2021; Mahmoudvand, 2022; Tabatabaeichehr; Mortazavi, 2020; Takasi, 2023).

Em 2023, a Índia foi o maior exportador de óleos essenciais do mundo, representando 16% das exportações globais, com um valor exportado de R\$ 5.270.679,28. Em seguida, os Estados Unidos ocuparam a segunda posição, contribuindo com 13,2% das exportações, totalizando R\$ 4.329.606,30. O Brasil ficou em terceiro lugar no ranking mundial, sendo responsável por 8,4% das exportações, com um valor exportado de R\$ 2.764.690,11 (Figura 5) (International Trade Centre, 2024).

Figura 5. Lista de países exportadores de óleos essenciais em 2023



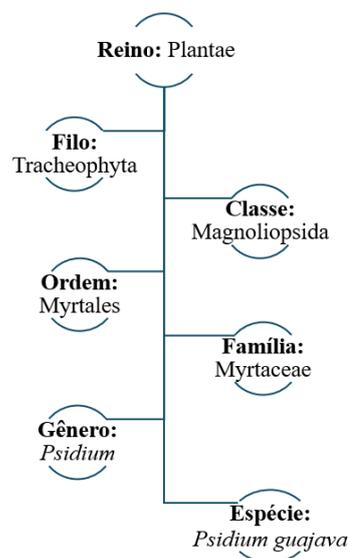
Fonte: Traduzido de International Trade Centre (2024).

Apesar de ser um grande produtor de óleos essenciais, o Brasil não possui normas nacionais vigentes para atestar o controle de qualidade desses produtos. Desde a década de 1970, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) elaborava normas específicas para óleos essenciais. No entanto, entre 2010 e 2011, todas essas normas foram canceladas, deixando o setor sem regulamentação oficial para garantir padrões de qualidade e pureza. Isso representa um desafio para a comercialização dos óleos essenciais no mercado nacional e internacional, evidenciando a necessidade de atualização e implementação de novas diretrizes regulatórias (Bizzo & Rezende, 2022).

1.3 GOIABA (*Psidium guajava*) E SEU ÓLEO ESSENCIAL

A goiaba (*Psidium guajava*) pertence à família Myrtaceae que abrange aproximadamente 3800 espécies. O gênero *Psidium* possui mais de 130 espécies de árvores e arbustos frutíferos, sendo a *Psidium guajava* a árvore perene mais conhecida e amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 6) (EMBRAPA, 2010; Gutierrez-Montiel *et al.*, 2023; Liu, Jullian, Chassagne, 2024).

Figura 6. Classificação da *Psidium guajava* L.



Fonte: Adaptado de Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira (SiBBR) ([s. d.]

Ao estudar a origem genética de goiabeiras, Arévalo-Marín *et al.* (2024) sugeriram que essa planta teve origem na América tropical, de onde se dispersou para outras regiões do mundo. A goiaba (*Psidium guajava*) é uma espécie altamente adaptável, capaz de se desenvolver em diversos tipos de solo, sendo predominante em áreas tropicais e subtropicais. No entanto, é sensível a temperaturas baixas e não prospera em solos alagados. A espécie pode atingir até 12 metros de altura e seus frutos são produzidos principalmente durante o verão (Figura 7) (EMBRAPA, 2010; Ghaderi *et al.*, 2022; Gutierrez-Montiel *et al.*, 2023).

Figura 7. Goiabeira, suas folhas e frutos



Fonte: Ceagesp (2022); Manual do Jardim (2020); Paraíso das Árvores ([s. d.]).
 Notas: A) goiabeira; B) folhas e frutos da árvore de goiaba; C) Goiaba.

As cascas, raízes, frutos e folhas da goiaba são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de infecções fúngicas, bacterianas, desordens do sistema gastrointestinal, infecções respiratórias, doenças de pele, feridas, acne, malária, distúrbios cardiovasculares, diabetes e até para expelir a placenta após o parto (Chinatu, 2023; Choi *et al.*, 2021; Ghaderi *et al.*, 2022; Gutierrez-Montiel *et al.*, 2023; Heppy *et al.*, 2023; Kamble *et al.*, 2019; Liu, Jullian, Chassagne, 2024; Mamun *et al.*, 2019; Naseer *et al.*, 2018; Okwudilichukwu, 2024; Shady *et al.*, 2022).

Os efeitos farmacológicos da goiaba são atribuídos à sua rica composição fitoquímica, sendo que suas folhas e flores contêm altas concentrações de taninos, flavonoides, rutina, saponinas (como quercetina, guajavolide, luteolina e kaempferol), além de α -pineno, β -pineno e limoneno. As cascas e raízes da goiabeira também são fontes abundantes de flavonoides e taninos (Bunu, 2023; de Souza *et al.*, 2018; Ghaderi *et al.*, 2022). Ojatula (2023) observou que o extrato aquoso das raízes da goiabeira apresentou efeito hipoglicêmico, sugerindo seu potencial no controle do diabetes. Além disso, os compostos da folha da goiaba possuem propriedades antioxidante e antimicrobiana (Le *et al.*, 2021).

O óleo essencial de goiaba é extraído das folhas da planta e geralmente possui como compostos majoritários β -cariofileno, α -pineno, limoneno e viridiflorol, sendo que existe variação na composição conforme a região de coleta das folhas. O β -cariofileno destaca-se por sua atividade anti-inflamatória e analgésica, enquanto os demais compostos contribuem para o perfil terapêutico geral do óleo essencial de goiaba (Arain *et al.*, 2019; Hussin *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2019).

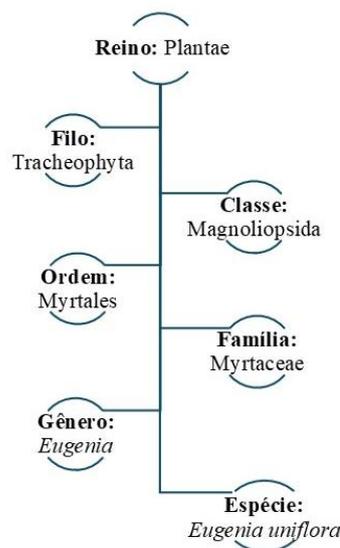
O óleo essencial de goiaba apresenta atividade antimicrobiana, atuando especialmente contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (Mukunda, 2019; Phon & Lum, 2021). Além disso, o óleo essencial de goiaba possui propriedades antioxidantes, sendo capaz de neutralizar radicais livres e reduzir o estresse

oxidativo devido à presença de compostos fenólicos e flavonoides. As propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas do óleo essencial de goiaba também tornam esse óleo um ingrediente promissor para ser utilizado em formulações tópicas voltadas à cicatrização de feridas (Arain *et al.*, 2019; Arul Raj, 2023; Hussin, 2023).

1.4 PITANGA (*Eugenia uniflora*) E SEU ÓLEO ESSENCIAL

A pitanga (*Eugenia uniflora*), também conhecida como cereja brasileira, é uma espécie de árvore perene que pertence ao gênero *Eugenia*, conhecido por abranger uma variedade de plantas frutíferas da família Myrtaceae (Figura 8). O nome pitanga tem origem na língua indígena tupi, da palavra “*pi'tãg*”, que significa vermelho, por conta da cor avermelhada de seu fruto (da Costa *et al.*, 2020a; Franzolin *et al.*, 2022; Ministério do Meio Ambiente, 2011).

Figura 8. Classificação de *Eugenia uniflora* L.



Fonte: Adaptado de Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira (SiBBr) ([s. d.]).

A pitanga é nativa das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, particularmente do Brasil e tem sido cultivada em várias partes do mundo, incluindo a Austrália, Estados Unidos, Caribe e o Sudeste Asiático. A pitangueira é um arbusto denso de 2 a 4 metros de altura, bastante ramificado e com copa arredondada. As folhas da pitanga possuem coloração verde-amarronzada e têm um odor característico. Os frutos da pitanga são pequenos, redondos, vermelhos e com sabor exótico e aparecem após o surgimento das flores, geralmente entre o final da primavera e início do verão (Figura 9) (da Costa *et al.*, 2020a; Freitas, Dutra, Bolini, 2016; Ministério do Meio Ambiente, 2011).

Figura 9. Pitangueira, suas flores, folhas e frutos



Fonte: Biologia da Paisagem (2021).

Notas: A) Pé de pitanga (pitangueira); B) Flores da pitangueira; C) Frutos avermelhados (maduros) e verdes (em processo de amadurecimento).

Os frutos e as folhas da pitangueira exibem atividades farmacológicas, sendo que suas folhas são tradicionalmente utilizadas para tratar reumatismo, bronquite, tosse e febres. As comunidades indígenas fazem infusão das folhas da pitangueira para aliviar os sintomas associados às infecções respiratórias. Já o fruto da pitanga é reconhecido por seu potencial no tratamento de problemas gastrointestinais, como dispepsia e diarreia, controle de diabetes e hipertensão arterial, além de ser rico em fósforo, vitamina C, potássio e cálcio, auxiliando também o sistema imunológico (da Costa *et al.*, 2020a; Daniel, 2019; Franzolin *et al.*, 2022; Lazzarotto-Figueiró *et al.*, 2021; Paiva *et al.*, 2023; Sobeh *et al.*, 2020).

Lazzarotto-Figueiró *et al.* (2021) encontraram nas sementes da pitanga os compostos pirogalol, α -muuroleno, δ -cadineno, isopropenil, ácido linoleico, cariofileno e β -sistosterol. Sobeh *et al.* (2020) encontraram 22 metabólitos secundários como ácidos quínico e gálico, derivados de quercetina e glicosídeos de miricetina em apenas uma fração da pitanga. Essa diversidade na composição fitoquímica da pitanga contribui para suas atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, analgésica, antidiarreica, diurética e anti-hipertensiva (Lazzarotto-Figueiró *et al.*, 2021; Sobeh *et al.*, 2020).

O óleo essencial de pitanga é extraído das folhas da pitangueira e possui uma composição química complexa (Cipriano; Mais; Deschamps, 2021; da Costa *et al.*, 2020a). Os constituintes principais do óleo essencial de pitanga geralmente são os sesquiterpenos como curzereno, germacreno D e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona. A porcentagem dos compostos majoritários do óleo essencial de pitanga varia de acordo com a região e solo em que a pitangueira está localizada e ainda, com a época do ano em que as folhas foram coletadas. O

óleo essencial de pitanga possui propriedades antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, além da ação inseticida (Ascari *et al.*, 2021; Bailão *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

Diante de suas propriedades terapêuticas, o óleo essencial de pitanga tem sido estudado para aplicações em cuidados com a pele, aromaterapia, conservação de alimentos e como repelente natural de mosquitos e outras pragas (Delfino *et al.*, 2019; Flores *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2023). Na aromaterapia, o óleo essencial de pitanga possui efeito calmante, atuando no sistema límbico para melhorar o humor e aliviar o estresse. Além disso, suas propriedades relaxantes podem auxiliar no alívio de dores associadas a tensões musculares e articulares (Falcão *et al.*, 2018; Hassan, Manzoor, Saleem, 2020).

Dessa forma, os óleos essenciais conhecidos por suas propriedades aromáticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes têm sido utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Porém, a aplicação desses óleos essenciais é frequentemente limitada por sua volatilidade, baixa solubilidade em água e instabilidade sob várias condições ambientais. Para superar esses desafios, as nanoemulsões surgiram como um sistema de entrega promissor para óleos essenciais, aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade (Ahmad *et al.*, 2024; Anuar *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2018; Yammine *et al.*, 2022).

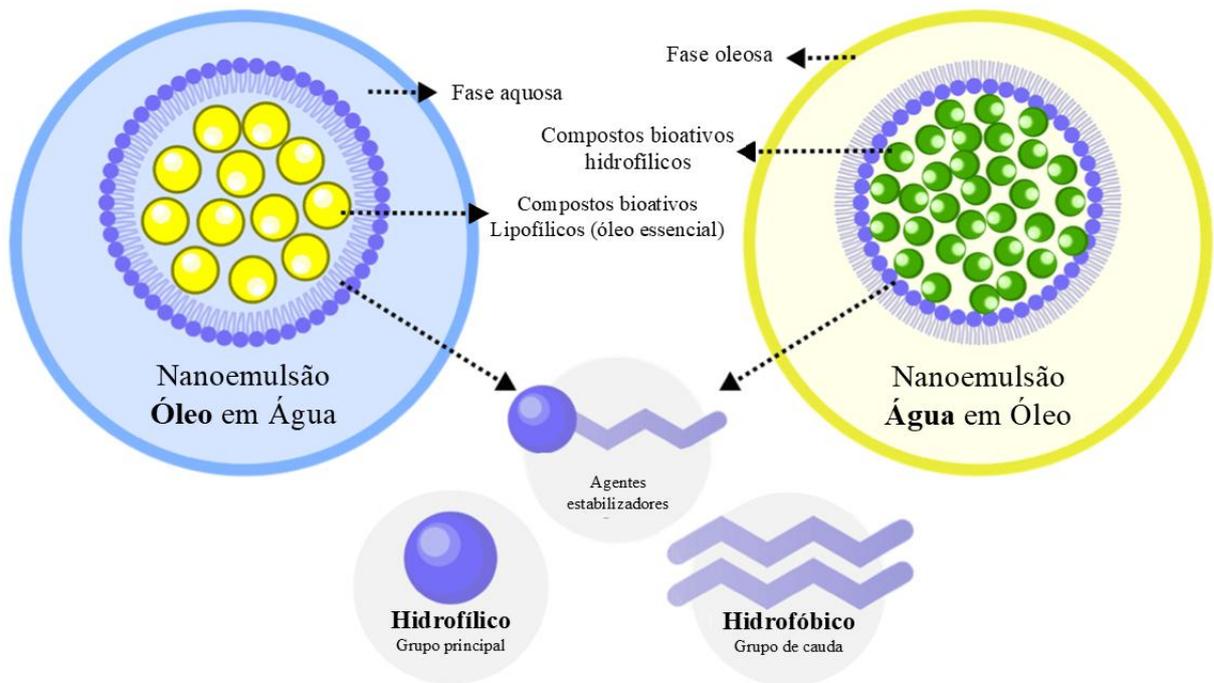
1.5 SISTEMAS NANOEMULSIONADOS

As nanoemulsões são sistemas coloidais³ formados por dois líquidos imiscíveis, como a água e o óleo e apresentam gotículas em escala nanométrica (< 200 nm). Esses sistemas podem ser classificados em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), dependendo da fase contínua e da fase dispersa (Figura 10). No sistema O/A, pequenas gotículas lipídicas estão dispersas em uma fase aquosa. Já no sistema A/O, gotículas de água em escala nanométrica estão dispersas em uma fase oleosa. A estabilidade dessas nanoemulsões é alcançada com o auxílio de tensoativos, que atuam por meio do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLB). Para sistemas A/O, tensoativos com valores de HLB entre 4 e 6 são os mais adequados. Além de auxiliar na escolha dos tensoativos para a formulação, o HLB desempenha um papel fundamental na estabilidade das nanoemulsões, prevenindo fenômenos como floculação e coalescência, que

³ São misturas heterogêneas de substâncias, compostas por uma fase dispersa e uma fase dispersante, como exemplo, tem-se a maionese onde, com auxílio da gema de ovo (emulsificante), o óleo fica disperso no vinagre.

podem comprometer a integridade da emulsão ao longo do tempo (Che Marzuki, Wahab, Abdul Hamid, 2019; Ho, Abik, Mikkonen, 2022; Maruno & Rocha-Filho, 2009; Pavoni *et al.*, 2020a).

Figura 10. Esquema de nanoemulsão O/A e A/O



Fonte: Traduzido de Ujilestari *et al.* (2022).

As nanoemulsões podem ser formadas por métodos de alta energia e de baixa energia. No método de alta energia, as gotículas maiores são quebradas em gotículas menores utilizando equipamentos de alta pressão como ultrassonicação e homogeneização de alta pressão (HPC). Para o método de baixa energia, há uma mudança de temperatura ou na composição do sistema que faz com que gotículas de uma macroemulsão sejam quebradas em gotículas menores à medida em que passam por um estado de baixa tensão superficial durante essa alteração do sistema (Gupta *et al.*, 2016; Ho, Abik, Mikkonen, 2022). A classificação das emulsões com base no tamanho das gotículas considera os seguintes intervalos: macroemulsões (500-100.000 nm), microemulsões (200-500 nm) e nanoemulsões (20-200 nm) (Aldakkan *et al.*, 2021; Che Marzuki, Wahab, Abdul Hamid, 2019; Gupta *et al.*, 2016).

Atualmente, as nanoemulsões têm sido amplamente aplicadas nas indústrias farmacêutica e cosmética. Devido ao seu tamanho reduzido, as nanoemulsões são utilizadas em sistemas de administração transdérmica de fármacos, pois conseguem penetrar a barreira epidérmica, aumentando assim a absorção dos ativos (Malik, Nawaz, Noor, 2024). Wu *et al.*

(2024) desenvolveram uma nanoemulsão que aumentou a estabilidade e a liberação das vitaminas C e E em formulações cosméticas.

As nanoemulsões também podem ser usadas para estender a vida útil dos produtos alimentícios. Durmuş *et al.* (2019) verificaram que nanoemulsões com propriedades antimicrobianas estenderam a vida útil de filés de robalo. Cenobio-Galindo *et al.* (2019) verificaram que a aplicação de uma nanoemulsão à base de laranja e extrato de figo-da-índia aumentou a vida útil de frutas durante o armazenamento pós-colheita. Garcia-Becerra *et al.* (2023) verificaram que as nanoemulsões aumentaram a biodisponibilidade de suplementos alimentares.

Na área agrícola, as nanoemulsões podem atuar como sistemas de entrega de agroquímicos, oferecendo uma solução eficaz para a aplicação de pesticidas insolúveis em água. Devido ao seu tamanho reduzido, essas formulações podem melhorar a dispersão dos pesticidas, aumentar sua absorção pelas plantas e reduzir o impacto ambiental associado ao uso excessivo de pesticidas (Mustafa & Hussein, 2020).

A incorporação de óleos essenciais em nanoemulsões protege o ingrediente ativo da degradação, aumenta a solubilidade e melhora a atividade biológica. Esses sistemas criam gotículas em nanoescala, aumentando significativamente a área de superfície dos óleos essenciais. A grande área de superfície fornecida pelo tamanho nanométrico aumenta a solubilidade, resultando em maior biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água. Assim, as nanoemulsões podem promover a liberação controlada de moléculas bioativas lipofílicas (Barradas & de Holanda e Silva, 2021; Gupta *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2024).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de goiaba, pitanga e de suas nanoemulsões em gel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil químico através de cromatografia gasosa dos óleos essenciais de goiaba e pitanga;
- Quantificar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos óleos essenciais de goiaba e pitanga;
- Desenvolver as nanoemulsões em gel dos óleos essenciais de goiaba e pitanga;
- Realizar a caracterização (tamanho das gotas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) e o estudo de estabilidade por 30 dias em diferentes temperaturas (4°C, 40°C e 25°C) das nanoemulsões de goiaba e pitanga;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões através das seguintes metodologias: método de difusão em ágar; determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- Realizar os ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo dos óleos essenciais e das nanoemulsões contra *S. aureus* e *E. coli*

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

Os óleos essenciais de goiaba e pitanga foram adquiridos de um estabelecimento comercial localizado em São Paulo, Brasil. De acordo com o fabricante, as plantas foram cultivadas localmente, com certificação orgânica e ambos os óleos essenciais foram extraídos das folhas usando a técnica de destilação a vapor.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

A caracterização química dos óleos essenciais de goiaba e pitanga foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (equipamento Agilent, modelo MSD5977B, Santa Clara, CA, EUA). Foram utilizados os seguintes parâmetros para a análise cromatográfica: temperatura do injetor: 280 °C; volume de injeção: 1 µL; modo de injeção: split (1:20); vazão: 1 mL/min⁻¹; gás de arraste: hélio; coluna capilar: DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60 °C, 2 min, taxa de 4 °C/min até 200 °C e taxa de 6 °C/min até 260 °C, 10 min; temperatura do detector de massa: 260 °C; temperatura da fonte de íons: 280 °C; modo de aquisição: scan. Os compostos foram identificados através da comparação dos espectros de massa dos picos com a biblioteca NIST17.L (NIST Chemistry WebBook – webbook.nist.gov), o grau de similaridade de cada identificação é apresentado nos resultados. A área percentual relativa de cada pico (Apêndice A) foi calculada com base na soma das áreas de todos os picos eluídos da coluna e originários da amostra analisada.

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

A quantificação de compostos fenólicos totais dos óleos essenciais de goiaba e pitanga foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965) e os resultados foram expressos em mg.GAE/mL (miligramas equivalentes a ácido gálico por mililitros). A atividade antioxidante foi avaliada usando o ensaio de eliminação dos radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (ABTS) (Rufino *et al.*, 2007a) e do ácido 2,2-azinobs-3-

etilbenzotiazolína-6-sulfônico (DPPH) (Rufino *et al.*, 2007b). Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de Trolox⁴ (Apêndice B) e expressos como μmol equivalentes de Trolox por mL de amostra ($\mu\text{mol.TE/mL}$). Os reagentes Folin-Ciocalteu, DPPH e ABTS foram adquiridos da Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.4 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA

As nanoemulsões em gel foram preparadas utilizando os óleos essenciais de goiaba e pitanga na proporção de 15% (v/v), surfactante Cremophor[®] EL (Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 30% (v/v), co-surfactante Plurol[®] Oleique (Gatefossè, Saint-Priest, França) na proporção de 5% (v/v) e tampão fosfato pH 5,5 na proporção de 50% (v/v), conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Composição das nanoemulsões em gel de goiaba e pitanga

Óleo essencial	15%
Cremophor [®] EL	30%
Plurol [®] Oleique	5%
Solução Tampão Fosfato pH 5.5	50%

Fonte: Autoria própria, 2025.

A concentração de 15% (v/v) dos óleos essenciais de goiaba e pitanga foi selecionada por estar acima da Concentração Bactericida Mínima determinada para todos os microrganismos testados, garantindo, assim, sua eficácia antimicrobiana. Os tensoativos foram selecionados de acordo com Cardoso *et al.* (2022), que utilizaram o surfactante Cremophor[®] EL na formulação de uma microemulsão em gel devido às suas características não irritantes em combinação com o co-surfactante Plurol[®] Oleique, que reduz a tensão superficial da emulsão. As misturas foram colocadas em um béquer e homogeneizadas usando um processador ultrassônico (Vibra-Cell VC 750, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, EUA), durante 20 minutos a uma amplitude de 20% e cada ciclo consistiu em um pulso de 30 segundos ligado e um pulso de 30 segundos desligado. Durante o processo, a temperatura foi controlada usando gelo ao redor do béquer. Por fim, as nanoemulsões foram submetidas à centrifugação a 4000

⁴Trolox, ou 6-hidroxi-2,6,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, é um antioxidante natural derivado da vitamina E.

rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, assegurando a estabilidade do sistema e a ausência de separação de fases.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA

O equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) foi utilizado para caracterizar o tamanho das gotas (nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (mV) das nanoemulsões. Para as análises, 20 µL das nanoemulsões foram diluídas em 980 µL de água ultrapura (proporção de 1:50). O tamanho das gotas foi determinado usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética. O pH da nanoemulsão não diluída foi verificado com um medidor de pH digital (Digimed, modelo DM-22, São Paulo, Brasil) imergindo diretamente o eletrodo na nanoemulsão à temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$). Os resultados foram expressos em média de análises em triplicata e desvio-padrão.

3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA

Os mesmos parâmetros utilizados na caracterização das nanoemulsões (tamanho das gotas, PDI, potencial zeta e pH) foram analisados para avaliar sua estabilidade. As nanoemulsões de goiaba e pitanga foram armazenadas em tubos Falcon por 30 dias em diferentes temperaturas: geladeira (4°C), estufa (40°C) e temperatura ambiente (25°C). A estabilidade foi monitorada nos dias 0, 1, 3, 7, 14 e 30. Além disso, os tubos Falcon foram fotografados diariamente para verificar possíveis separações de fases (Apêndice C). Os resultados foram expressos em média de análises em triplicata e desvio-padrão.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE GOIABA E PITANGA

3.7.1 Microrganismos utilizados e preparação do inóculo

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões de goiaba e pitanga, foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (bactéria Gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Acinetobacter baumannii* ATCC

19606 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactérias Gram-negativas) e *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 6258 (leveduras). O inóculo bacteriano foi preparado por meio da suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Müeller-Hinton (Himedia, Thane, Índia), com turbidez ajustada entre 0,08 e 0,10 em um espectrofotômetro (Hitach U-3900H, Tóquio, Japão) à 625 nm (equivalente ao padrão McFarland 0,5 ou $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). Para as leveduras, o inóculo foi preparado por suspensão direta do crescimento microbiano em caldo RPMI-1640 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e o inóculo foi ajustado usando um espectrofotômetro (Hitach U-3900H, Tóquio, Japão) com turbidez ajustada entre 0,08 e 0,13 em um comprimento de onda de 530 nm (equivalente ao padrão McFarland 0,5 ou $1,0 \times 10^6$ UFC/mL) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

3.7.2 Teste de difusão em ágar

Para comparar a atividade antimicrobiana entre as nanoemulsões e os óleos essenciais, foi empregado o método de difusão em ágar, uma vez que o método do disco de papel não se mostrou adequado para a difusão das nanoemulsões em gel. Além disso, os óleos essenciais foram testados tanto em sua forma pura quanto diluídos a 15% (v/v) em caldo Müeller-Hinton e 4% de Tween 80 (Sigma-Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemanha), permitindo a comparação direta com as nanoemulsões, que foram formuladas com uma concentração de 15% de óleo essencial. Assim, o inóculo microbiano foi semeado, com o auxílio de um swab estéril, na superfície de uma placa de ágar Müeller-Hinton até que um esfregaço uniforme fosse obtido. Após a secagem do inóculo, poços de 6 mm de diâmetro foram perfurados, em triplicata, nas placas usando um perfurador de aço inoxidável estéril. Em seguida, 50 μ L de cada amostra (óleos essenciais ou nanoemulsões) foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Ao final da incubação, as zonas de inibição que se formaram ao redor dos poços foram medidas em milímetros e os resultados expressos em média e desvio-padrão (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

3.7.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram determinadas de acordo com a metodologia do Clinical and Laboratories Standards

Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017, 2018). O inóculo microbiano foi diluído em caldo Müeller-Hinton (inóculo bacteriano) ou caldo RPMI-1640 (inóculo de levedura) na proporção de 1:150. Em seguida, as amostras de óleos essenciais e nanoemulsões foram diluídas em diferentes concentrações (CIM 0,20–25,00 mg/mL e CBM 2,00–55,00 mg/mL) em caldo Müeller-Hinton (inóculo bacteriano) ou caldo RPMI-1640 (inóculo de levedura) usando diluição seriada. Os testes foram realizados em triplicata e usando microplacas de fundo plano de 96 poços. Cada poço recebeu 100 µL da amostra diluída e 100 µL do inóculo microbiano, resultando em uma concentração final de inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL em um volume total de 200 µL por poço. Para o controle positivo do crescimento microbiano, cada poço recebeu 100 µL de caldo e 100 µL de inóculo microbiano. Para o controle sem crescimento microbiano, foram utilizados 200 µL de caldo Müeller-Hinton (inóculo bacteriano) ou caldo RPMI-1640 (inóculo de levedura) e 200 µL dos óleos essenciais ou nanoemulsões. Para evitar interferência da coloração das amostras e do caldo, 100 µL de caldo Müeller-Hinton ou RPMI-1640 e 100 µL dos óleos essenciais ou nanoemulsões foram usados como brancos. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h para testes bacterianos e 48 h para testes de levedura. Em seguida, a turbidez de cada poço foi lida a 620 nm usando um leitor de microplacas Multiskan® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). Para a confirmação da CBM, 100 µL de cada uma das amostras foram semeadas em placas de ágar Müeller-Hinton por 24 h (para bactérias) e em ágar batata dextrose (Himedia, Thane, Índia) por 48 h (para leveduras) a 37 °C. A CBM foi determinada como a menor concentração que não permitiu o crescimento microbiano visível no ágar. Para a confirmação da CIM, 20 µL de corante resazurina (Sigma-Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,01% (p/v) foi adicionado a cada poço contendo 100 µL de cada amostra. A resazurina é um indicador redox usado para avaliar a viabilidade celular. Inicialmente, a resazurina é azul, mas torna-se rosa e fluorescente quando reduzida a resorufina por oxidorreduzases dentro de células viáveis (Ristivojević *et al.*, 2018). A CIM foi definida como a menor concentração na qual não houve alteração na cor.

3.7.4 Ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo dos óleos essenciais e nanoemulsões de goiaba e pitanga

Os ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo (curva de tempo morte) dos óleos essenciais e das nanoemulsões foram realizados contra *S. aureus* e *E. coli*. Os óleos essenciais e as nanoemulsões foram testados em concentrações de 4×CIM, 2×CIM, CIM

e $0,25 \times \text{CIM}$. Os ensaios foram realizados em microplacas de fundo plano de 96 poços e cada poço recebeu 100 μL da amostra diluída e 100 μL do inóculo microbiano, resultando em uma concentração final de inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e um volume total de 200 μL por poço. Para o controle positivo do crescimento microbiano, cada poço recebeu 100 μL de caldo e 100 μL de inóculo bacteriano. A CIM da oxacilina foi usada como um controle de inibição do crescimento para *S. aureus* e a CIM da cefepima foi usada como um controle de inibição do crescimento para *E. coli*. As amostras foram coletadas em 0, 2, 4 e 6 h e espalhadas em placas de ágar Müeller-Hinton, que foram então incubadas por 24 h a 37 °C. Para elaboração dos resultados, o número de unidades formadoras de colônias resultantes em \log_{10} (\log_{10} UFC/mL) foi plotado em função do tempo (Leber, 2016).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Todos os dados foram tratados com o auxílio do software STATISTICA® versão 10.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para detectar diferenças significativas entre as análises e quando as diferenças foram estatisticamente significativas, o teste de Tukey foi utilizado para as comparações de médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

A análise da composição química do óleo essencial de goiaba (Tabela 1) permitiu a identificação de 21 compostos voláteis, representando 98,10% da composição total do óleo essencial de goiaba.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de goiaba

<i>(continua)</i>			
	Componentes	Composição (%)	Classificação
1	α -Pinoeno	0,24	Monoterpeno
2	ρ -Cimeno	0,18	Monoterpeno
3	Limoneno	0,75	Monoterpeno
4	Eucaliptol	4,58	Monoterpeno
5	α -Terpineol	0,19	Monoterpeno
6	Copaeno	0,80	Sesquiterpeno
7	β -Cariofileno	25,92	Sesquiterpeno
8	Humuleno	3,95	Sesquiterpeno
9	β -Panasinsense	2,17	Sesquiterpeno
10	β -Selineno	22,64	Sesquiterpeno
11	γ -Selineno	19,13	Sesquiterpeno
12	α -Muuroleno	0,63	Sesquiterpeno
13	β -Bisaboleno	0,17	Sesquiterpeno
14	γ -Cadineno	2,69	Sesquiterpeno
15	7-epi- α -Selineno	0,49	Sesquiterpeno
16	δ -Cadineno	2,48	Sesquiterpeno
17	α -Calacoreno	0,23	Sesquiterpeno
18	Óxido de Cariofileno	5,61	Sesquiterpeno
19	Óxido de Humuleno	0,37	Sesquiterpeno
20	t-Cadinol	1,34	Sesquiterpeno
21	Selin-6-en-4- α -ol	3,54	Sesquiterpeno
	Monoterpenos		5,94%
	Sesquiterpenos		92,16%

% de Identificação	<i>(conclusão)</i> 98,10%
---------------------------	-------------------------------------

Fonte: Autoria própria, 2025.

Os sesquiterpenos foram a principal classe de compostos presentes no óleo essencial de goiaba, correspondendo a 92,16% de sua composição. Dentro dessa classe, destacaram-se os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (81,30%) e os sesquiterpenos oxigenados (10,86%), enquanto os monoterpenos representaram 5,94% do total. Os constituintes químicos mais abundantes foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos β -cariofileno (25,92%), β -selineno (22,64%) e γ -selineno (19,13%). Além disso, outros compostos identificados em quantidades significativas incluíram o sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno (5,61%), o selin-6-en-4- α -ol (3,54%), o monoterpeno eucaliptol (4,58%) e o sesquiterpeno humuleno (3,95%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Dos Santos *et al.* (2023) ao analisarem o óleo essencial de goiaba da região Sudeste do Brasil (Rio de Janeiro, RJ). Nesse estudo, foram identificados 20 compostos, com destaque para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, que representaram 85,52% da composição total. Os compostos majoritários encontrados foram α -humuleno (33,20%), óxido de (E)-cariofileno (25,83%), α -selineno (12,08%) e β -selineno (11,71%). De Souza *et al.* (2021) avaliaram o óleo essencial de goiaba da região sul do Brasil (Canelinha, SC) e identificaram como principais compostos o β -selineno (13,83%), o α -humuleno (10,90%) e o β -cariofileno (7,61%). Da Silva de Souza *et al.* (2017) relataram que os óleos essenciais de goiaba provenientes de 22 diferentes genótipos cultivados na região Sudeste do Brasil (municípios de Mimoso do Sul e Linhares, ES) apresentaram predominância de trans-cariofileno (14,2–16,0%) e α -humuleno (7,1–11,4%). Além disso, em cinco desses genótipos, também foram observadas quantidades significativas de óxido de cariofileno (9,5–11,5%), β -selineno (6,8–8,0%) e α -selineno (6,1–7,6%).

O óleo essencial de goiaba do presente estudo apresentou 41,77% de selineno e 25,92% de β -cariofileno em sua composição. Resultados semelhantes foram reportados por Sarma *et al.* (2020) para o óleo essencial das folhas de *Lantana camara*, que apresentou β -cariofileno (24,96%) e δ -selineno (17,46%) como seus principais constituintes. Alguns outros óleos essenciais também foram relatados na literatura como tendo selineno como componente principal, como *Artemisia annua* (β -selineno 20,05–46,29%) (Hong *et al.*, 2023) e *Callicarpa macrophylla* (β -selineno 37,51–57,01%) (Chandra *et al.*, 2017).

O sesquiterpeno β -cariofileno é estudado na literatura por suas atividades antimicrobianas. Dahham *et al.* (2015) isolaram β -cariofileno do óleo essencial de *Aquilaria crassna* e observaram que o composto exibiu alta atividade antimicrobiana, especialmente contra bactérias Gram-positivas. Woo *et al.* (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana do β -cariofileno contra a bactéria *Helicobacter pylori* e relataram um valor de CIM de 1,0 mg/mL. Os autores concluíram que o β -cariofileno atua inibindo a replicação bacteriana por meio da regulação negativa dos genes *dnaE*, *dnaN*, *holB* e *gyrA*, que são expressos por *H. pylori*.

A análise da composição química do óleo essencial de pitanga (Tabela 2) revelou 31 compostos voláteis, representando 98,60% da composição total do óleo essencial de pitanga.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de pitanga

<i>(continua)</i>			
	Componentes	Composição (%)	Classificação
1	β -Mirceno	0,63	Monoterpeno
2	α -Felandreno	0,17	Monoterpeno
3	β -Tujeno	0,20	Monoterpeno
4	Trans- β -Ocimeno	1,30	Monoterpeno
5	β -Ocimeno	3,32	Monoterpeno
6	γ -Terpineno	0,15	Monoterpeno
7	Terpinoleno	0,14	Monoterpeno
8	δ -Elemeno	1,20	Sesquiterpeno
9	α -Cubebeno	0,31	Sesquiterpeno
10	Copaeno	0,30	Sesquiterpeno
11	β -Elemeno	4,74	Sesquiterpeno
12	β -Cariofileno	5,16	Sesquiterpeno
13	γ -Elemeno	1,72	Sesquiterpeno
14	Biciclosesquifelandreno	0,16	Sesquiterpeno
15	Humuleno	0,43	Sesquiterpeno
16	Aloaromadendreno	0,53	Sesquiterpeno
17	β -Panasinseno	0,71	Sesquiterpeno
18	β -Cubebeno	6,79	Sesquiterpeno
19	β -Selineno	0,47	Sesquiterpeno
20	Curzereno	34,80	Sesquiterpeno
21	δ -Guaieno	1,34	Sesquiterpeno

<i>(conclusão)</i>			
22	γ -Cadineno	0,14	Sesquiterpeno
23	δ -Cadineno	2,01	Sesquiterpeno
24	α -Cadineno	0,40	Sesquiterpeno
25	Germacreno B	11,92	Sesquiterpeno
26	Espatulenol	1,14	Sesquiterpeno
27	Globulol	0,80	Sesquiterpeno
28	Aristoladieno	3,28	Sesquiterpeno
29	Germacrena	3,99	Sesquiterpeno
30	Calameneno	4,62	Sesquiterpeno
31	Aristoleno	5,73	Sesquiterpeno
Monoterpenos			5,91%
Sesquiterpenos			92,69%
% de Identificação			98,60%

Fonte: Autoria própria, 2025.

As principais classes de compostos identificadas no óleo essencial de pitanga foram os sesquiterpenos, que representaram 92,69% da composição total. Dentre esses, destacaram-se os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (51,96%) e os sesquiterpenos oxigenados (40,73%), enquanto os monoterpenos corresponderam a 5,91% do óleo essencial de pitanga. Os constituintes químicos majoritários foram o sesquiterpeno oxigenado curzereno (34,80%) e o hidrocarboneto sesquiterpênico germacreno B (11,92%). Além desses, outros compostos foram identificados em proporções significativas, como os hidrocarbonetos sesquiterpênicos β -cubebeno (6,79%), aristoleno (5,73%), β -cariofileno (5,16%), β -elemeno (4,74%) e calameneno (4,62%), bem como o sesquiterpeno oxigenado germacreno (3,99%).

De Jesus *et al.* (2023) analisaram um óleo essencial de pitanga da região norte do Brasil (Belém, PA) e obtiveram resultados semelhantes a este estudo, onde o composto majoritário foi o curzereno (33,40%). Da Costa *et al.* (2020b) avaliaram a influência da sazonalidade na composição química do óleo essencial de pitanga da região norte do Brasil (Belém, PA) e observaram que o curzereno foi o principal constituinte, sendo que sua porcentagem não apresentou diferença significativa entre a estação seca (42,70%) e a estação chuvosa (40,80%). Além disso, Da Costa *et al.* (2020b) também identificaram no óleo essencial de pitanga os sesquiterpenos oxigenados germacreno (0,20–10,50%), globulol (1,50–7,40%) e espatulenol (0,50–7,00%) e os hidrocarbonetos sesquiterpênicos germacreno B (0,10–7,50%) e β -elemeno

(1,80–5,80%). Da Silva *et al.* (2023) identificaram selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (57,55%) e oxido-selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (21,18%) como os principais compostos no óleo essencial de pitanga da região nordeste do Brasil (Recife, PE).

Figueiredo *et al.* (2019) relataram que a composição química do óleo essencial de pitanga apresenta variabilidade significativa com diferentes quimiotipos mas, em geral, é rico em sesquiterpenos oxigenados cíclicos com esqueleto do tipo germacrano, como curzereno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona epóxido, germacreno e apresenta associação com outros hidrocarbonetos sesquiterpênicos cíclicos. Os resultados do nosso estudo indicaram que o perfil químico do óleo essencial de pitanga foi semelhante ao descrito por Figueiredo *et al.* (2019) para o quimiotipo III, que foi representado por curzereno (50,6%), germacreno B (5,20%) e germacreno (4,50%).

O óleo essencial de pitanga do presente estudo apresentou 34,80% de curzereno em sua composição. Além do óleo essencial de pitanga, apenas alguns óleos essenciais contêm quantidades significativas de curzereno em sua composição. Doodman *et al.* (2023) relataram 23,96 a 47,04% de curzereno no óleo essencial de *Smyrniium olusatrum*, uma planta aromática nativa do Irã e da Turquia. O gênero *Curcuma* também contém curzereno em quantidades significativas nos óleos essenciais de suas espécies (*C. aeruginosa* apresentou 4,70% e *C. zedoaria* apresentou 6,20% de curzereno) (Poudel *et al.*, 2022).

Embora haja poucos estudos na literatura sobre a atividade antimicrobiana do curzereno, os óleos essenciais em que esse composto é o principal constituinte demonstram efeitos inibitórios contra diversos microrganismos. Acredita-se que essa atividade esteja relacionada às características estruturais do curzereno, que possibilitam sua interação com as membranas microbianas de forma semelhante a outros sesquiterpenos. Essa interação compromete a integridade da membrana, resultando na morte celular (Thin, Thinh, Hanh, 2022).

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

No presente estudo, o óleo essencial de pitanga apresentou uma maior atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos do que o óleo essencial de goiaba (Tabela 3). A atividade antioxidante dos óleos essenciais pode ser atribuída aos seus principais compostos químicos, atuando individualmente ou em sinergia e tanto os terpenos quanto os compostos fenólicos são conhecidos por sua atividade antioxidante (Toledo *et al.*, 2020). As propriedades antioxidantes dos óleos essenciais podem contribuir para sua eficácia antimicrobiana, pois

protegem os compostos bioativos da oxidação durante o armazenamento. Isso ajuda a preservar sua estabilidade e garantir uma atividade antimicrobiana consistente ao longo do tempo (Dahham *et al.*, 2015; Woo *et al.*, 2020).

Tabela 3. Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais dos óleos essenciais de goiaba e pitanga

Análises	Óleos essenciais	
	Goiaba	Pitanga
ABTS ($\mu\text{mol.TE/mL}$)	204,19 \pm 25,01 ^a	853,62 \pm 29,74 ^b
DPPH ($\mu\text{mol.TE/mL}$)	51,30 \pm 20,01 ^a	183,71 \pm 8,43 ^b
Compostos fenólicos (mg.GAE/mL)	1,11 \pm 0,64 ^a	1,30 \pm 0,35 ^b

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: Os valores representam média \pm desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha apresentam diferenças significativas a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, usando nível de confiança de 95%.

Os sesquiterpenos oxigenados apresentam maior atividade antioxidante do que os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, pois a capacidade de eliminação de radicais livres está diretamente correlacionada com o grau de oxigenação de seus constituintes, devido ao aumento de elétrons livres (Abd-Elgawad *et al.*, 2021). Dessa forma, o alto teor de sesquiterpenos oxigenados no óleo essencial de pitanga (40,73%) pode contribuir para sua maior atividade antioxidante em comparação ao óleo essencial de goiaba (10,86%), que possui uma concentração inferior desses compostos.

O óleo essencial de goiaba apresentou atividade antioxidante de 204,19 $\mu\text{mol.TE/mL}$ (ABTS) e 51,30 $\mu\text{mol.TE/mL}$ (DPPH). Jerônimo *et al.* (2021) relataram que o óleo essencial de goiaba da região norte do Brasil apresentou capacidade antioxidante total de 195,7 mg.TE/mL (DPPH). De Souza *et al.* (2021) relataram que o óleo essencial de goiaba da região sul do Brasil apresentou 4,54 e 8,94 $\mu\text{mol.TE/mL}$ para ABTS e DPPH, respectivamente.

O óleo essencial de pitanga apresentou atividade antioxidante de 853,62 $\mu\text{mol.TE/mL}$ (ABTS) e 183,71 $\mu\text{mol.TE/mL}$ (DPPH). Outros estudos também relataram atividade antioxidante em óleos essenciais de pitanga brasileiros. Da Costa *et al.* (2020a) relataram que duas amostras diferentes de óleo essencial de pitanga coletadas na região norte do Brasil apresentaram inibição do radical DPPH de 45,1% (228,3 mg.TE/g) e 42,8% (217,0 mg.TE/g). Além disso, Da Costa *et al.* (2020b) relataram que óleos essenciais de pitanga, obtidos em doze meses (janeiro a dezembro) de coleta de amostras de folhas de plantas na região amazônica brasileira, demonstraram atividade antioxidante DPPH variando de 186,9 a 436,3 mg.TE/g.

Os óleos essenciais de goiaba e pitanga apresentaram valores de compostos fenólicos totais de 1,10 e 1,30 mg.GAE/mL, respectivamente. Omurtag Özgen *et al.* (2022) relataram um valor semelhante de compostos fenólicos totais de 1,22 mg.GAE/g para o óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill. da Turquia. Mechergui *et al.* (2016) obtiveram valores de compostos fenólicos totais de óleos essenciais de *Origanum vulgare* do Norte da África variando de 4,10–17,70 mg.GAE/g e El-Demerdash, El-Sayed, Abdel-Daim (2021), relataram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* do Egito continha uma concentração de compostos fenólicos totais de 0,04 mg.GAE/mL.

4.3 CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE GOIABA E PITANGA

As nanoemulsões de goiaba e pitanga apresentaram tamanhos de gotículas de 99,50 e 105,30 nm, respectivamente (Tabela 4). De acordo com a literatura, as nanoemulsões são dispersões coloidais compostas por gotículas em nanoescala, com tamanhos variando de 20 a 200 nm. O menor tamanho de gotícula nas nanoemulsões ajuda a suprimir a coalescência e a precipitação das gotículas e isso contribui para minimizar a degradação da nanoemulsão e aumentar sua estabilidade (Naseema *et al.*, 2021; Preeti *et al.*, 2023).

Tabela 4. Caracterização das nanoemulsões de goiaba e pitanga

Análises	Nanoemulsões	
	Goiaba	Pitanga
Tamanho (nm)	99,50±0,70 ^a	105,30±0,60 ^b
PDI	0,43±0,01 ^a	0,32±0,01 ^b
Potencial zeta (mV)	-7,34±0,20 ^a	-9,29±0,20 ^b
pH	5,41±0,10 ^a	5,75±0,01 ^b

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: PDI: índice de polidispersão. Os valores representam média ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha apresentam diferenças significativas a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, usando nível de confiança de 95%.

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos tamanhos de gotículas relatados para nanoemulsões de outros óleos essenciais. Uma nanoemulsão de óleo essencial de *Thymus vulgaris* apresentou gotículas esféricas com diâmetro de 127,6 nm (Moazeni *et al.*, 2021), enquanto uma nanoemulsão de óleo essencial de canela resultou em gotículas com tamanho

médio de 162,1 nm (Chu *et al.*, 2020). Além disso, foi relatado que os diâmetros hidrodinâmicos das nanoemulsões formuladas com óleo essencial de *Carlina acaulis* variaram entre 110 e 140 nm (Ntalli *et al.*, 2023).

O índice de polidispersão obtido foi de 0,43 e 0,32 para as nanoemulsões de goiaba e pitanga, respectivamente. O índice de polidispersão (PDI) mede a variação nos tamanhos de partículas dentro de uma amostra e varia de 0,0, que indica uma amostra com tamanhos de partículas uniformes, a 1,0, que reflete uma amostra com uma ampla variação nos tamanhos de partículas. Um PDI abaixo de 0,08 indica uma distribuição monodispersa, enquanto valores acima de 0,70 sugerem uma distribuição de tamanho de gotícula mais ampla. Um PDI entre 0,08 e 0,70 é considerado uma distribuição de tamanho aceitável em nanoemulsões. Assim, o PDI é um importante indicador de homogeneidade e é geralmente usado para determinar a estabilidade de nanoemulsões (Danaei *et al.*, 2018; Morteza-Semnani *et al.*, 2022).

Dakhlaoui *et al.* (2024) relataram resultados semelhantes, nos quais nanoemulsões de óleo essencial de *Eucalyptus cladocalyx* apresentaram um PDI de 0,49. Além disso, Soulaïmani *et al.* (2022) obtiveram variações de PDI entre 0,20 e 0,44 para nanoemulsões obtidas a partir de uma mistura de óleos essenciais de *Lavandula maroccana*, *T. vulgaris* e *Ammodaucus leucotrichus*.

O potencial zeta obtido foi de -7,34 e -9,29 mV para as nanoemulsões de goiaba e pitanga, respectivamente. O potencial zeta é usado para medir a carga superficial de partículas em uma suspensão líquida, determinada pela velocidade com que as partículas carregadas se movem em direção ao eletrodo quando expostas a um campo elétrico externo, com valores variando de +100 a -100 mV. O potencial zeta é influenciado pelas propriedades físico-químicas, pela presença de eletrólitos e pela capacidade de adsorção das nanopartículas (Gurpreet & Singh, 2018). Os surfactantes não iônicos, como Tween, Cremophor® EL e Plurol® Oleique, criam fortes forças repulsivas estéricas ou forças repulsivas osmóticas ao formar uma barreira ao redor da gota de óleo, estabilizando assim a emulsão e evitando a agregação das gotas (Wu *et al.*, 2017).

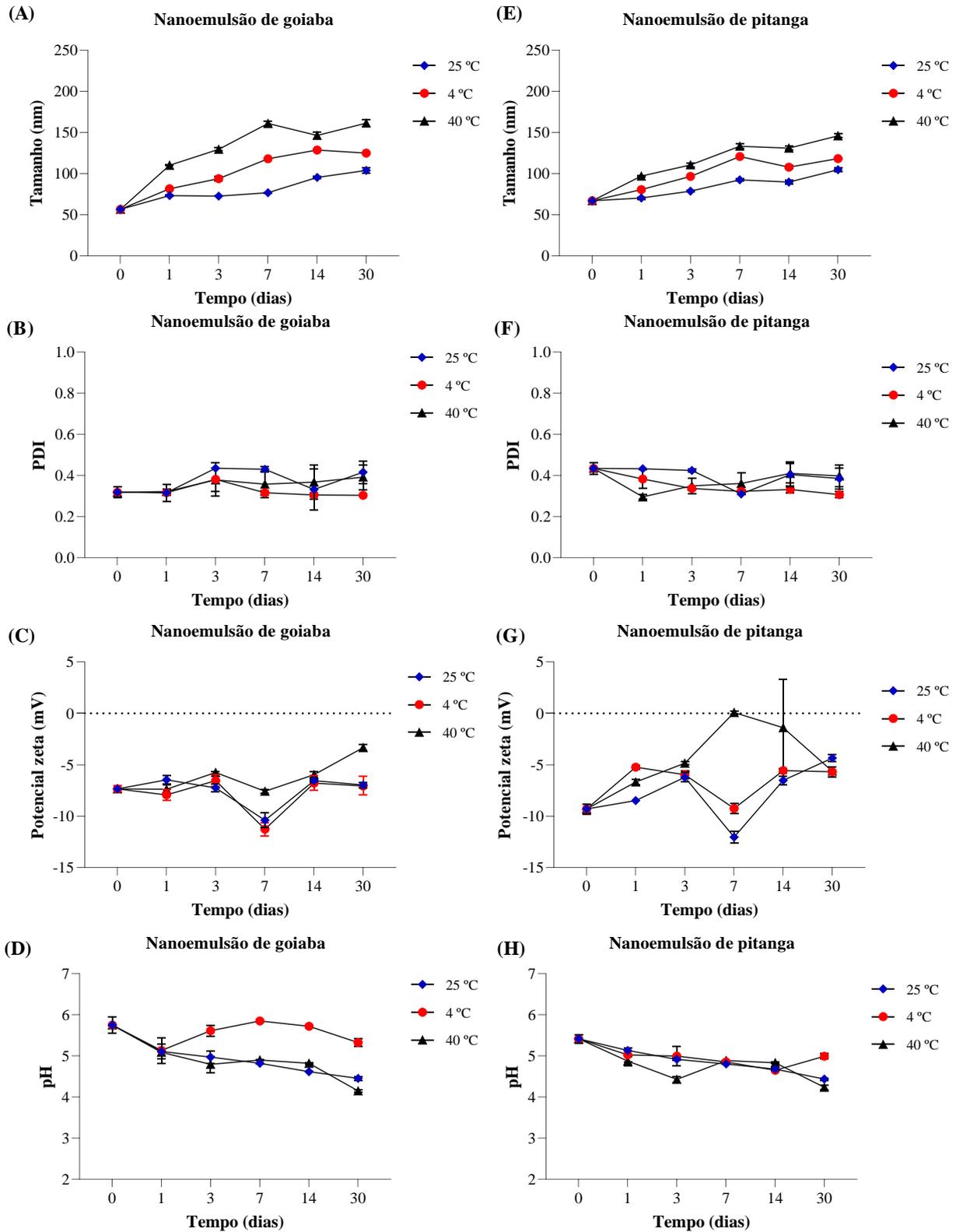
Morteza-Semnani *et al.* (2022) observaram valores de potencial zeta de -0,50 a -6,90 mV para formulações de nanoemulgel contendo óleo essencial de cominho. Moazeni *et al.* (2021) obtiveram um valor de potencial zeta de -9,82 mV para nanoemulsão de óleo essencial de *T. vulgaris*.

Neste estudo, as nanoemulsões de goiaba e pitanga resultaram em valores de pH de 5,41 e 5,75, respectivamente. A pele humana possui pH variando entre 4,20 e 5,60; portanto, soluções com pH mais próximo ao da pele favorecem a penetração das nanopartículas, pois

podem reduzir as forças eletrostáticas, facilitando assim a permeação cutânea (Naves *et al.*, 2017).

As nanoemulsões de goiaba e pitanga foram analisadas quanto à estabilidade sob diferentes condições de temperatura (4 °C, 25 °C e 40 °C) e períodos de armazenamento (0, 1, 3, 7, 14 e 30 dias). As mudanças no tamanho das gotículas, PDI, potencial zeta e valores de pH são apresentadas na Figura 11. O tamanho das gotículas em todas as temperaturas de armazenamento aumentou ao longo do tempo; no entanto, nenhuma separação de fases foi observada, e os tamanhos das gotículas das nanoemulsões permaneceram abaixo de 200 nm por 30 dias. Na temperatura de 25 °C, observou-se uma mudança menor no tamanho das gotículas, variando de 73,13 a 103,80 nm para a nanoemulsão de goiaba e de 70,26 a 104,7 nm para a nanoemulsão de pitanga. Por outro lado, o armazenamento a 40 °C apresentou maior variação no tamanho das gotículas das nanoemulsões ao longo do tempo. No 30º dia, o tamanho dessas gotículas havia dobrado em relação ao dia 0.

Figura 11. Efeitos da temperatura e do armazenamento na estabilidade das nanoemulsões de goiaba e pitanga



Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: Temperaturas utilizadas: 4°C, 25°C e 40°C. Tempo de armazenamento: 0, 1, 3, 7, 14 e 30 dias. (A – D) = estabilidade da nanoemulsão de goiaba, (E – H) = estabilidade da nanoemulsão de pitanga.

zeta (mV), **D**) pH. (**E – H**) = estabilidade da nanoemulsão de pitanga, **E**) tamanho da gota (nm), **F**) índice de polidispersão (PDI), **G**) potencial zeta (mV), **H**) pH.

Os baixos valores de PDI das nanoemulsões de goiaba e pitanga, que permaneceram abaixo de 0,50 em todas as temperaturas de armazenamento, indicaram a homogeneidade do tamanho das formulações. As nanoemulsões com baixos valores de PDI (<0,50) exibem uma distribuição de partículas mais homogênea, o que é crucial para garantir sua estabilidade, pois são menos propensas à separação de fases. Um PDI < 0,50 impacta diretamente a atividade antibacteriana das nanoemulsões, porque partículas uniformes penetram nas membranas microbianas mais facilmente (Chookiat *et al.*, 2024; Firoozy & Anarjan, 2019). Além disso, o PDI < 0,50 aumenta a difusão da nanoemulsão nas paredes celulares bacterianas, pois gotículas menores e de tamanho mais uniforme aumentam a proporção entre área de superfície e volume da nanoemulsão (Rahman *et al.*, 2024).

O potencial zeta apresentou carga negativa, variando de -7,34 a -6,97 mV a 25 °C para a nanoemulsão de goiaba e de -8,48 a -6,51 mV a 25 °C para a nanoemulsão de pitanga. Na temperatura de 4 °C o potencial zeta apresentou variação semelhante à temperatura de 25 °C. Entretanto, na temperatura de 40 °C, houve maior variação no potencial zeta das nanoemulsões de goiaba (-7,34 a -3,32 mV) e pitanga (-9,29 a -5,63 mV).

As propriedades elétricas (potencial zeta) têm um impacto significativo na estabilidade da nanoemulsão e são influenciadas pelos surfactantes usados na formulação. Enquanto surfactantes não iônicos, como os usados nesse trabalho (Cremophor® EL e Plurol® Oleique), são estabilizados por interações dipolo e ligação de hidrogênio com a camada de hidratação da água, bem como por forças repulsivas devido ao impedimento estérico, surfactantes iônicos são adicionalmente estabilizados por interações eletrostáticas. No entanto, surfactantes não iônicos são a primeira escolha em formulações de nanoemulsão porque em comparação com surfactantes iônicos, eles exibem um perfil toxicológico mais seguro (Pavoni *et al.*, 2020b).

Segundo Somala, Laosinwattana, Teerarak (2022), a temperatura influencia na estabilidade das emulsões, afetando as propriedades físicas do óleo, da água e do surfactante. Os resultados do presente estudo indicaram uma possível perda de estabilidade nas nanoemulsões armazenadas a 40 °C por um período superior a 30 dias, enquanto as temperaturas de 25 °C e 4 °C apresentaram melhor estabilidade para as nanoemulsões ao longo de 30 dias de armazenamento.

Somala, Laosinwattana, Teerarak (2022) relataram resultados semelhantes para nanoemulsões contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*). Na temperatura de 4 °C, o tamanho médio das gotas permaneceu abaixo de 200 nm; no entanto, as nanoemulsões

armazenadas a 45 °C exibiram um tamanho de gota maior, aumentando de 79 para 218 nm após 14 dias. Yin *et al.* (2024) relataram boa estabilidade de uma nanoemulsão contendo extrato de mangostim e ácido kójico por 42 dias a uma temperatura de 25 °C, com um tamanho de gota de 162,9 nm, um PDI de 0,39 e nenhuma separação de fases.

A estabilidade das nanoemulsões sob diferentes condições de armazenamento é crucial para aplicações práticas, como em formulações tópicas ou sistemas alimentares (Kaur *et al.*, 2024; Teng *et al.*, 2020). Estudos adicionais são necessários para avaliar a estabilidade das nanoemulsões quando expostas a fatores ambientais como luz e umidade.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES

4.4.1 Teste de difusão em ágar

A nanoemulsão de pitanga apresentou a maior atividade antimicrobiana entre todos os compostos testados no método de difusão em ágar (Tabela 5), com zonas de inibição variando de 8,41 a 20,97 mm contra todos os microrganismos testados, exceto para *E. coli*, que não apresentou zona de inibição para nenhum dos compostos testados. As maiores zonas de inibição foram observadas contra as leveduras *C. albicans* (20,97 mm) e *C. krusei* (15,20 mm).

Da mesma forma, Jawaid *et al.* (2023) relataram que a nanoemulsão de óleo essencial de citronela apresentou maiores zonas de inibição contra *S. aureus* e *C. albicans* em comparação ao óleo essencial livre. Além disso, Hassanshahian, Saadatfar e Masoumipour (2020) observaram que o óleo essencial livre das folhas de *Alhagi maurorum* exibiu menores zonas de inibição contra as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em relação à sua nanoemulsão.

A nanoemulsão de goiaba apresentou menor atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar do que a nanoemulsão de pitanga, com zonas de inibição variando de 6,06 a 10,05 mm contra os microrganismos *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus* e nenhuma atividade antimicrobiana contra as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de nanoemulsões de goiaba e pitanga usando o método de difusão em ágar

Microorganismos	Zona de diâmetro (mm)					
	OEG (Puro)	OEG (15%)	NOEG	OEP (Puro)	OEP (15%)	NOEP
<i>S. aureus</i>	9,10±0,19 ^b	10,93±0,60 ^a	8,02±0,33 ^c	8,04±0,25 ^c	9,62±0,34 ^b	8,41±0,96 ^c
<i>E. coli</i>	N	N	N	N	N	N
<i>K. pneumoniae</i>	N	N	9,97±0,75 ^b	N	N	15,13±0,45 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	N	N	10,05±0,39 ^a	N	N	9,31±0,39 ^a
<i>A. baumannii</i>	N	N	6,06±4,04 ^b	N	N	10,79±0,34 ^a
<i>C. albicans</i>	N	N	N	7,78±0,32 ^c	14,30±9,53 ^b	20,97±3,09 ^a
<i>C. krusei</i>	N	N	N	6,67±4,45 ^c	9,40±0,40 ^b	15,20±0,85 ^a

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: OEG = óleo essencial de goiaba; NOEG = nanoemulsão do óleo essencial de goiaba; OEP = óleo essencial de pitanga; NOEP = nanoemulsão do óleo essencial de pitanga; N = não houve halo inibitório. Os valores representam média ± desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha tiveram diferenças significativas a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, usando nível de confiança de 95%.

O óleo essencial de pitanga apresentou zonas de inibição variando de 6,67 a 14,30 mm contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*, sem atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativas testadas. Da mesma forma, Fidelis *et al.* (2022) relataram que o óleo essencial de pitanga apresentou zonas de inibição para patógenos Gram-positivos como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*, enquanto nenhuma atividade antimicrobiana foi observada contra patógenos Gram-negativos. Mohamed *et al.* (2023) investigaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de pitanga cultivadas no Egito e encontraram uma zona de inibição de 12 mm para o óleo diluído a 20% para *C. albicans*. Ferreira *et al.* (2021) analisaram o óleo essencial de folhas de *Eugenia florida* coletadas na região norte do Brasil (Magalhães Barata, PA) e obtiveram zonas de inibição variando de 6,00 a 8,00 mm para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. krusei* e *C. auris*.

Neste estudo, o óleo essencial de goiaba apresentou atividade somente contra *S. aureus*, com halos de inibição variando de 9,10 a 10,93 mm. Os óleos essenciais de goiaba da China apresentaram halos de inibição contra diferentes cepas de *S. aureus* variando de 9,00 a 18,60 mm (Wang *et al.*, 2017). O óleo essencial de goiaba da região sul do Brasil (Canelinha, SC) apresentou halo de inibição contra *S. aureus* de 16,07 mm (de Souza *et al.*, 2021).

É interessante notar que os óleos essenciais diluídos a 15% produziram zonas de inibição maiores do que os óleos essenciais puros, indicando um desafio de difusão para compostos lipídicos em ágar. As nanoemulsões tornam-se mais solúveis em meio aquoso, o que provavelmente contribuiu para aumentar a atividade antimicrobiana na metodologia de difusão em ágar. Embora a metodologia de difusão em ágar seja amplamente utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, recomenda-se que este método seja complementado pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), o que torna possível estabelecer as doses mínimas do composto que têm efeito bacteriostático e bactericida, respectivamente (Chouhan, Sharma, Guleria, 2017).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais podem ser atribuídas principalmente à sua capacidade de interagir com membranas biológicas, afetando o potencial da membrana e consequentemente, a permeabilidade, o transporte de nutrientes e a troca iônica. As pequenas gotículas de nanoemulsões aumentam as interações entre os óleos essenciais e a parede celular bacteriana, ampliando sua eficácia antimicrobiana. Assim, a ruptura celular é um dos principais mecanismos pelos quais as nanoemulsões exercem seus efeitos antimicrobianos. Isso ocorre devido ao pequeno tamanho das gotículas das nanoemulsões, o que permite a rápida difusão de seus compostos na parede celular, causando a lise celular (Amasha, 2024; Chuesiang *et al.*, 2019).

Quando os óleos essenciais estão presentes na composição da nanoemulsão, eles induzem mudanças morfológicas nas células, como deformação e vazamento de conteúdo intracelular, resultando em morte celular (Liu *et al.*, 2022; Pulong *et al.*, 2022). Além disso, a desnaturação de proteínas e alterações na hidrofobicidade da superfície são fatores críticos na ação antimicrobiana das nanoemulsões. Os óleos essenciais encapsulados em nanoemulsões levam à desnaturação de proteínas em células bacterianas, contribuindo para a perda de integridade estrutural e função. Este processo de desnaturação é frequentemente acompanhado pela liberação de materiais citoplasmáticos, o que é indicativo de morte celular (Amasha, 2024).

4.4.2 Determinação da CIM e CBM

A Tabela 6 apresenta os valores de CIM e CBM dos óleos essenciais de goiaba, pitanga e suas nanoemulsões. A nanoemulsão de pitanga apresentou menores valores de CIM (0,54–1,22 mg/mL) e CBM (4,84–11,02 mg/mL) contra as leveduras *C. albicans* e *C. krusei* em comparação ao óleo essencial de pitanga. A nanoemulsão de goiaba apresentou menores valores

de CIM (1,26 mg/mL) e CBM (11,35 mg/mL) contra *C. krusei* em comparação ao óleo essencial de goiaba, indicando um potencial para uso dessas nanoemulsões como agentes antifúngicos contra esses dois importantes patógenos humanos. Da mesma forma, Jawaid *et al.* (2023) relataram que a nanoemulsão de óleo essencial de citronela apresentou um valor de CIM menor (0,13 mg/mL) contra *C. albicans* do que o óleo essencial de citronela (0,25 mg/mL). Moazeni *et al.* (2021) observaram que a atividade antifúngica de uma nanoemulsão à base de óleo essencial de tomilho foi maior do que a do óleo essencial de tomilho contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

Tabela 6. CIM e CBM dos óleos essenciais de goiaba, pitanga e suas nanoemulsões

Microrganismos	OEG		NOEG		OEP		NOEP	
	(mg/mL)							
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	1,13 ^f	10,16 ^c	11,34 ^c	>55,00	1,95 ^e	17,53 ^b	3,38 ^d	30,46 ^a
<i>E. coli</i>	0,42 ^f	3,86 ^e	3,52 ^e	31,64 ^b	5,84 ^d	52,59 ^a	11,28 ^c	>55,00
<i>K. pneumoniae</i>	5,65 ^e	50,81 ^a	23,50 ^b	>55,00	1,39 ^f	12,49 ^c	8,57 ^d	>55,00
<i>P. aeruginosa</i>	1,22 ^f	11,01 ^b	5,95 ^c	53,57 ^a	0,25 ^g	2,34 ^e	6,31 ^d	54,81 ^a
<i>A. baumannii</i>	4,61 ^f	41,19 ^a	8,58 ^d	>55,00	5,75 ^e	51,71 ^b	20,08 ^c	>55,00
<i>C. albicans</i>	5,74 ^e	51,66 ^a	9,07 ^c	>55,00	8,50 ^d	>55,00	1,22 ^f	11,02 ^b
<i>C. krusei</i>	3,48 ^e	31,33 ^b	1,26 ^f	11,35 ^c	4,58 ^d	41,19 ^a	0,54 ^g	4,84 ^d

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; OEG = óleo essencial de goiaba; NOEG = nanoemulsão do óleo essencial de goiaba; OEP = óleo essencial de pitanga; NOEP = nanoemulsão do óleo essencial de pitanga. Os valores representam média \pm desvio-padrão. Letras diferentes dentro da mesma linha tiveram diferenças significativas a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, usando nível de confiança de 95%.

Para as bactérias Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, o óleo essencial de pitanga apresentou os menores valores de CIM (0,25–1,39 mg/mL) e CBM (2,34–12,49 mg/mL) entre os compostos testados. Para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, o óleo essencial de pitanga apresentou um valor de CIM de 1,95 mg/mL e um valor de CBM de 17,53 mg/mL. Antonelo *et al.* (2023) relataram que o óleo essencial de pitanga da região sudeste do Brasil (Ibiúna, SP) apresentou atividade antimicrobiana semelhante quando testado contra *S. aureus* (CIM de 3,13 mg/mL e CBM de 12,50 mg/mL). Obuotor, Omankhanlen, Lasisi (2017) analisaram o óleo essencial de pitanga obtido de folhas coletadas em Ota, Nigéria, África, e obtiveram os seguintes valores: CIM de 25,00 mg/mL e CBM de 50,00 mg/mL contra *S. aureus*;

CIM e CBM de 50,00 mg/mL contra *K. pneumoniae*; e CIM de 50,00 mg/mL e CBM de 100,00 mg/mL contra *P. aeruginosa*.

Para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e a bactéria Gram-negativa *E. coli*, o óleo essencial de goiaba apresentou os menores valores de CIM (0,42–1,13 mg/mL) e CBM (3,86–10,16 mg/mL) entre os compostos testados. Hanif *et al.* (2018) relataram resultados semelhantes com os óleos essenciais extraídos das folhas de dois cultivares⁵ de goiaba (frutas brancas e rosas) dos campos locais de Faisalabad, Punjab, Paquistão. Os óleos essenciais de goiaba exibiram valores de CIM de 2,50–3,13 mg/mL contra *S. aureus* e CIM de 8,50–12,5 mg/mL contra *E. coli*.

Assim, no presente estudo, para as bactérias testadas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *E. coli*), as nanoemulsões exibiram valores de CIM e CBM mais altos do que os óleos essenciais. No entanto, as nanoemulsões exibiram valores de CIM de 3,38–20,08 mg/mL para a nanoemulsão de pitanga e 3,52–23,50 mg/mL para a nanoemulsão de goiaba comparáveis aos valores relatados na literatura. Hassanshahian, Saadatfar, Masoumipour (2020) observaram que uma nanoemulsão de óleo essencial de *A. maurorum* teve valores de CIM de 6,25 mg/mL para *S. aureus*, 1,75 mg/mL para *E. coli*, 12,5 mg/mL para *A. baumannii* e *P. aeruginosa* e 25,0 mg/mL para *K. pneumoniae*. Shehabeldine *et al.* (2023) relataram que a nanoemulsão de óleo essencial de cravo apresentou valores de atividade antimicrobiana de 1,25 mg/mL contra *S. aureus*, 2,50 mg/mL contra *E. coli* e 10 mg/mL contra *Klebsiella oxytoca*.

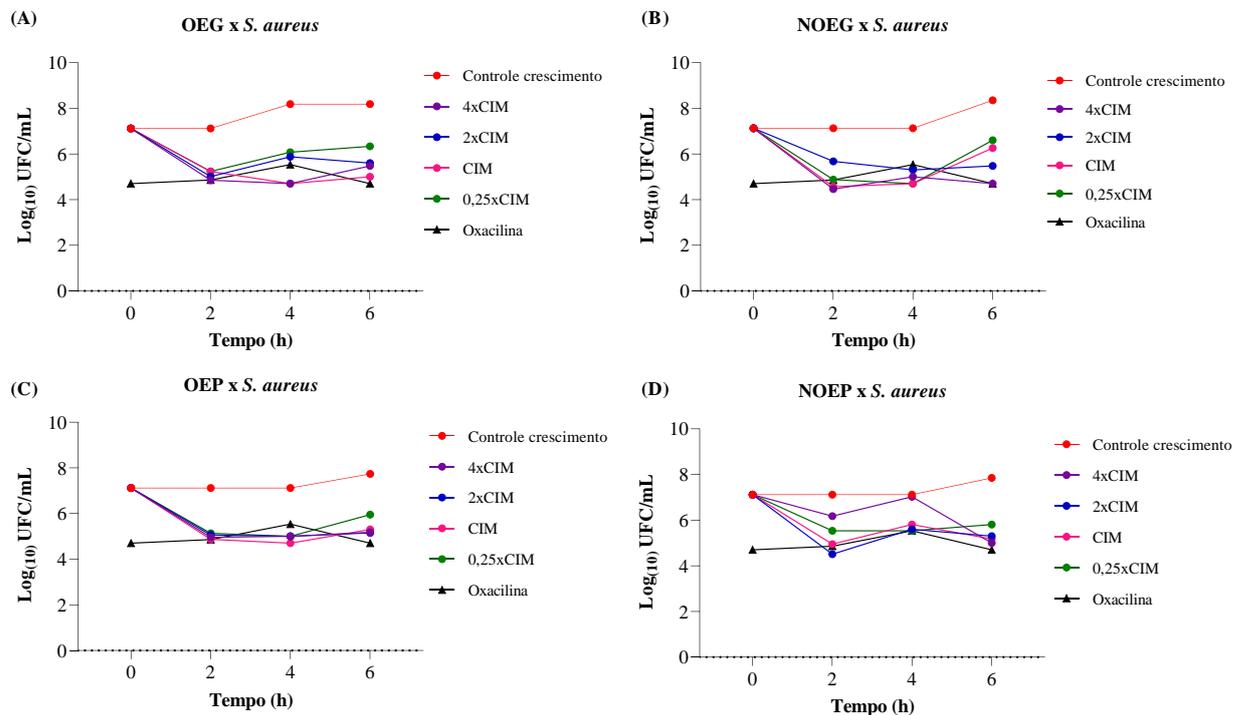
Diversos estudos têm relatado o efeito sinérgico das nanoemulsões de óleos essenciais em combinação com antimicrobianos sintéticos. Sharma *et al.* (2020) relataram que as interações sinérgicas em misturas binárias de óleos essenciais de *Callistemon lanceolatus*, *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Mentha longifolia* e *Vitex negundo* com compostos sintéticos (cloranfenicol e ampicilina) aumentaram a atividade antimicrobiana das combinações *in vitro*. A redução nas doses efetivas dos compostos sintéticos pode diminuir os efeitos adversos e toxicidade associados às suas maiores doses quando usados sozinhos.

4.4.3 Ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo

⁵ Um cultivar de plantas é uma nova variedade de planta com características específicas resultantes de pesquisas para seu melhoramento.

A avaliação da inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo pelos óleos essenciais e nanoemulsões de goiaba e pitanga foi realizada contra *S. aureus* (Figura 12). Este teste fornece informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e a cepa microbiana testada. Além disso, o teste revela se o efeito antimicrobiano é dependente do tempo e/ou da concentração do agente antimicrobiano (Chouhan, Sharma, Guleria, 2017).

Figura 12. Inibição do crescimento de *S. aureus* ao longo do tempo para diferentes concentrações do óleo essencial de goiaba, pitanga e de suas nanoemulsões



Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: **A)** óleo essencial de goiaba (OEG); **B)** nanoemulsão do óleo essencial de goiaba (NOEG); **C)** óleo essencial de pitanga (OEP); **D)** nanoemulsão do óleo essencial de pitanga (NOEP). Com base na CIM determinada para o óleo essencial e nanoemulsão de goiaba e pitanga, as concentrações testadas foram definidas em 4xCIM, 2xCIM, CIM e 0,25xCIM. O crescimento do controle corresponde ao crescimento microbiano positivo (inóculo e caldo Müller-Hinton), e a CIM da oxacilina foi usada como um controle de inibição do crescimento.

A bactéria *S. aureus* apresentou um inóculo inicial de 7,12–7,13 log UFC/mL no tempo zero. Após 6 horas de incubação, observou-se uma redução na contagem bacteriana em todas as concentrações de CIM testadas. O óleo essencial de goiaba apresentou contagens entre 5,00 e 6,34 log UFC/mL (Figura 12A), enquanto a nanoemulsão de goiaba variou de 4,70 a 6,60 log UFC/mL (Figura 12B). Já o óleo essencial de pitanga registrou valores entre 5,18 e 5,95 log UFC/mL (Figura 12C) e a nanoemulsão de pitanga apresentou contagens entre 5,00 e 5,81 log UFC/mL (Figura 12D). Esses resultados indicam uma redução no inóculo inicial de *S. aureus*.

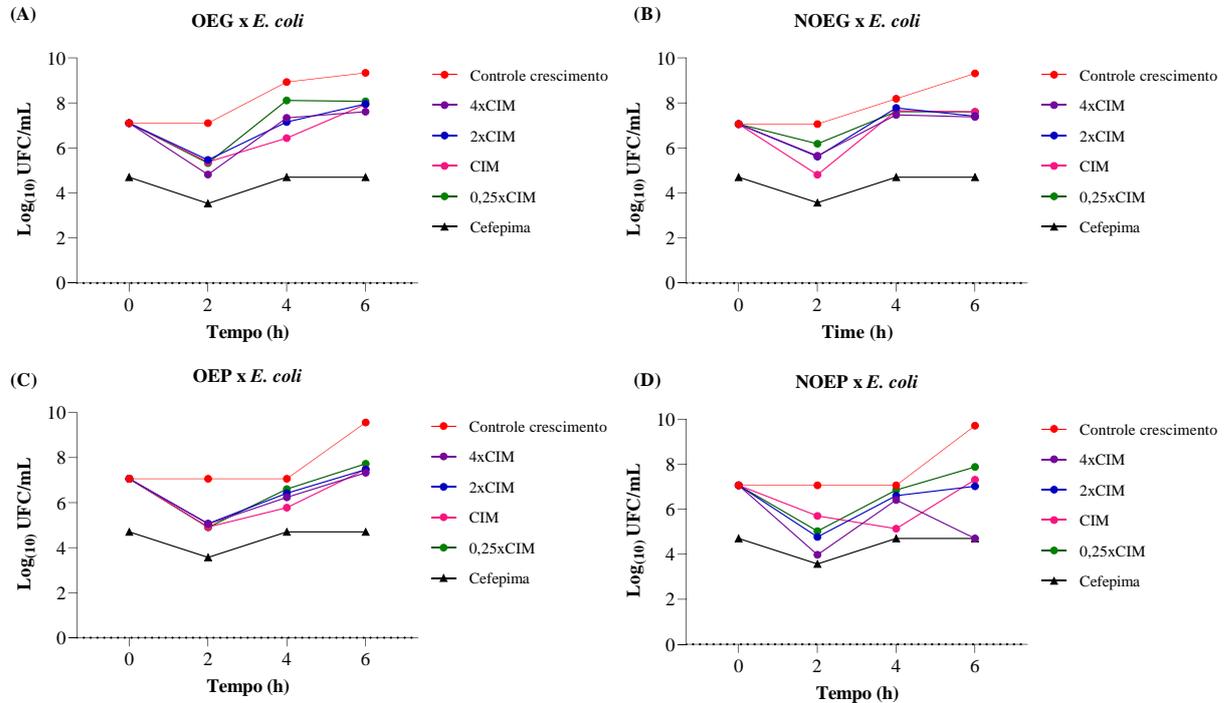
Após 6 horas de incubação, o controle positivo do crescimento microbiano apresentou contagens de 8,19–8,35 log UFC/mL nos testes com o óleo essencial de goiaba e sua nanoemulsão, enquanto para o óleo essencial de pitanga e sua nanoemulsão, os valores variaram de 7,74 a 7,85 log UFC/mL. Todos os compostos testados demonstraram uma redução mínima de 2,0 ciclos log na contagem de *S. aureus* em comparação ao controle positivo, evidenciando a eficácia antimicrobiana.

No ensaio de inibição do crescimento ao longo do tempo, foram utilizados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e nanoemulsões de goiaba e pitanga. Os resultados contra *S. aureus* evidenciaram atividade bacteriostática após 6 horas de exposição aos compostos testados, com uma redução na contagem bacteriana semelhante à observada para o antibiótico oxacilina, cujos valores variaram de 4,70 a 6,19 log UFC/g no mesmo período.

De maneira semelhante, Jawaid *et al.* (2023) relataram que o crescimento de *S. aureus* foi reduzido após o tratamento com nanoemulsão de óleo essencial de citronela (de 6,0 para 3,9 log UFC/mL) e com óleo essencial de citronela puro (de 6,0 para 3,3 log UFC/mL) utilizando concentrações de CIM dos compostos após 8 horas de exposição. El-Sayed & El-Sayed (2021) observaram uma redução de 2,2 ciclos log na contagem de *S. aureus* após apenas 3 horas de exposição à nanoemulsão de *T. vulgaris* na concentração de 0,05%, evidenciando seu efeito bacteriostático.

A Figura 13 apresenta os ensaios de inibição do crescimento de *E. coli* ao longo do tempo utilizando os óleos essenciais e nanoemulsões de goiaba e pitanga, com um inóculo inicial de 7,06 log UFC/mL no tempo zero. Após 6 horas de incubação, em todas as concentrações de CIM testadas, o óleo essencial de goiaba apresentou contagens variando entre 6,61 e 8,07 log UFC/mL (Figura 13A), enquanto a nanoemulsão de goiaba registrou valores entre 7,38 e 7,60 log UFC/mL (Figura 13B). O óleo essencial de pitanga exibiu contagens entre 7,33 e 7,73 log UFC/mL (Figura 13C), e a nanoemulsão de pitanga apresentou uma variação de 4,70 a 7,88 log UFC/mL (Figura 13D). Em diversos casos, os valores ultrapassaram o inóculo inicial de 7,06 log UFC/mL, sugerindo uma menor eficácia antimicrobiana contra *E. coli*.

Figura 13. Inibição de crescimento-tempo de *E. coli* para diferentes concentrações do óleo essencial de goiaba, pitanga e de suas nanoemulsões



Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: **A)** óleo essencial de goiaba (OEG); **B)** nanoemulsão do óleo essencial de goiaba (NOEG); **C)** óleo essencial de pitanga (OEP); **D)** nanoemulsão do óleo essencial de pitanga (NOEP). Com base na CIM determinada para o óleo essencial e nanoemulsão de goiaba e pitanga, as concentrações testadas foram definidas em 4xCIM, 2xCIM, CIM e 0,25xCIM. O crescimento do controle corresponde ao crescimento microbiano positivo (inóculo e caldo Müller-Hinton), e a CIM da cefepima foi usada como um controle de inibição do crescimento.

O controle positivo de crescimento microbiano apresentou valores de 9,31–9,34 log UFC/g para o óleo essencial de goiaba e sua nanoemulsão e 9,56–9,71 log UFC/g para o óleo essencial de pitanga e sua nanoemulsão após 6 h. A nanoemulsão de pitanga, o óleo essencial de goiaba e a nanoemulsão de goiaba testados em 4xMIC, demonstraram uma redução de 5,0, 2,7 e 2,2 ciclos de log, respectivamente, na contagem de *E. coli* em comparação ao controle positivo de crescimento microbiano. Os outros compostos mostraram uma redução de 1,3 a 1,8 ciclos de log na contagem de *E. coli*, indicando que a atividade bacteriostática contra *E. coli* foi dose-dependente.

O antibiótico cefepima apresentou uma contagem microbiana menor de 4,70 log UFC/g em 6 h em comparação com a maioria dos compostos testados. Assim, pode-se concluir que os compostos testados foram mais eficazes contra *S. aureus* do que contra *E. coli*. El-Sayed & El-Sayed (2021) observaram resultados semelhantes com a nanoemulsão de *T. vulgaris* na concentração de 0,05%, encontrando uma redução menor na contagem de *E. coli* viável (ciclos

de 0,86 log) do que a contagem de *S. aureus*, que demonstrou uma redução de 2,20 ciclos de log após 3 h de exposição.

Segundo Chouhan, Sharma, Guleria (2017), bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos óleos essenciais do que bactérias Gram-negativas. Isso pode ser atribuído ao fato de que bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos e mais complexa, limitando a difusão de compostos hidrofóbicos através dela. Em contraste, essa membrana externa complexa está ausente em bactérias Gram-positivas, facilitando o acesso de compostos hidrofóbicos à membrana celular. No entanto, os componentes bioativos presentes em óleos essenciais podem se ligar à superfície celular e, posteriormente, penetrar na bicamada fosfolipídica da membrana celular em bactérias Gram-negativas, levando à morte celular.

Shahabi *et al.* (2017) também relataram que o efeito antimicrobiano da nanoemulsão de óleo essencial de *Zataria multiflora* dependia fortemente do tipo de ensaio antimicrobiano, da concentração da nanoemulsão, do tempo de exposição e do tipo de bactéria testada, indo de encontro com os resultados deste estudo onde, as nanoemulsões e os óleos essenciais de goiaba e pitanga apresentaram um comportamento diferente em cada teste antimicrobiano realizado.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram o potencial promissor dos óleos essenciais de goiaba e pitanga na formulação de nanoemulsões à base de gel. As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram tamanhos de gotículas inferiores a 200 nm e demonstraram estabilidade por até 30 dias em condições de armazenamento em temperatura ambiente.

Quanto à atividade antimicrobiana, a nanoemulsão de pitanga apresentou a maior eficácia no método de difusão em ágar, seguida pela nanoemulsão de goiaba, ambas superando seus respectivos óleos essenciais. As maiores zonas de inibição foram observadas contra as leveduras *C. albicans* e *C. krusei* (no caso da nanoemulsão de pitanga), além de efeitos inibitórios contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*. Esses achados ressaltam a relevância das nanoemulsões na melhoria da solubilidade aquosa dos óleos essenciais, potencializando sua atividade antimicrobiana.

Na determinação da CIM e CBM, a nanoemulsão de pitanga apresentou a maior atividade antimicrobiana contra as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*, enquanto a nanoemulsão de goiaba também exibiu baixos valores de CIM e CBM para *C. krusei*. No entanto, para as bactérias testadas, os óleos essenciais apresentaram valores de CIM e CBM menores em comparação com suas respectivas nanoemulsões. No ensaio de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo, tanto as nanoemulsões quanto os óleos essenciais demonstraram um comportamento semelhante, exibindo um efeito bacteriostático mais pronunciado contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* do que contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Estudos adicionais são necessários para avaliar a citotoxicidade e a biocompatibilidade das nanoemulsões à base de gel de goiaba e pitanga, a fim de garantir a segurança dessas formulações para células humanas ou animais. Assim, essas nanoemulsões apresentam um potencial promissor como agentes antimicrobianos eficazes contra leveduras e bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- ABD ELHAFEZ, Z. A. The effect of different extraction methods (steam distillation and supercritical fluid extraction) on essential oil production of aromatic tagetes and sweet basil. **European Journal of Medicinal Plants**, 2022.
- ABD-ELGAWAD, A. M. *et al.* Chemical composition, allelopathic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of sesquiterpenes rich essential oil of *Cleome amblyocarpa barratte* & murb. **Plants**, v. 10, n. 7, 2021.
- AHMAD, I. *et al.* Microfluidic-based nanoemulsion of *Ocimum basilicum* extract: Constituents, stability, characterization, and potential biomedical applications for improved antimicrobial and anticancer properties. **Microscopy Research and Technique**, v. 87, n. 3, p. 411–423, 2024.
- ALAMGIR, W. Nanoantibiotics: a tool against antimicrobial resistance. **Life and Science**, 2024.
- ALDAKKAN, B. S. *et al.* Stimuli-responsive, hydrolyzable poly (vinyl laurate-vinyl acetate) nanoparticle platform for *in situ* release of surfactants. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 21, p. 25553–25562, 2021.
- AMASHA, R. H. Inhibition of some multidrug-resistant bacteria using prepared essential oil nanoemulsion formulas and their mode of action. **J Contemp Med Sci**, v. 10, n. 2, p. 142–149, 2024.
- AMIN, A. *et al.* The Effects of aromatherapy on patients undergoing coronary angiography: a systematic review of clinical trials. **Journal of Herbmed Pharmacology**, 2021.
- AMIN, T.; NAIK, H. R.; HUSSAIN, S. Z. Chemotyping the essential oil in different rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plants grown in Kashmir Valley. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, v. 14, n. 3, p. 1025–1031, 2017.
- ANTONELO, F. A. *et al.* Bioactive compounds derived from Brazilian Myrtaceae species: Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 48, 2023.
- ANUAR, N. *et al.* Development and characterization of ibuprofen-loaded nanoemulsion with enhanced oral bioavailability. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04570, 2020.
- ARAIN, A. *et al.* Essential oil from *Psidium guajava* leaves: an excellent source of β -caryophyllene. **Natural Product Communications**, 2019.

- ARÉVALO-MARÍN, E. *et al.* Genetic analyses and dispersal patterns unveil the Amazonian origin of guava domestication. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024.
- ARSHAD, A. R. *et al.* COVID-19 pandemic and antimicrobial resistance in developing countries. **Discoveries**, 2021.
- ARUL RAJ, M. S. Nutritional composition, mineral profiling, in vitro antioxidant, antibacterial and enzyme inhibitory properties of selected Indian guava cultivars leaf extract. **Pharmaceuticals**, 2023.
- ASCARI, J. *et al.* Selina-1,3,7(11)-Trien-8-One and Oxidoselina-1,3,7(11)-Trien-8-One from *Eugenia uniflora* leaf essential oil and their cytotoxic effects on human cell lines. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 740, 2021.
- BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015.
- BAQUERO, F. *et al.* **Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance**: American Society for Microbiology, 2021.
- BARLOW, R. S. *et al.* Antimicrobial resistance status of *Enterococcus* from Australian cattle populations at slaughter. **Plos One**, 2017.
- BARRADAS, T. N.; DE HOLANDA E SILVA, K. G. **Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review**: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.
- BER LUCIEN, M. A. *et al.* Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: perspective from resource-limited settings. **International Journal of Infectious Diseases**, 2021.
- BIOLOGIA DA PAISAGEM. *Eugenia uniflora* - pitanga, 2021. Disponível em: <https://biologiadapaisagem.com.br/2022/02/10/eugenia-uniflora-pitanga/>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- BISSON, G. S. The anxiolytic potential of citrus aurantium essential oil: a focused critical review. **Brazilian Journal of Health Aromatherapy and Essential Oil**, 2024.
- BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. The market of essential oils in Brazil and in the world in the last decade. **Química Nova**, v. 45, n. 8, p. 949–958, 2022.
- BUNU, S. J. Determination of phytochemicals and anti-bacterial properties evaluation of the leaves extracts of *Psidium guajava* (L) Myrtaceae. **European Journal of Pharmaceutical Research**, 2023.

CARDOSO, C. O. *et al.* *In situ* gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. **Journal of Molecular Liquids**, v. 360, 2022.

CEAGESP. Goiaba vermelha é o produto destaque da semana (09/02) na CEAGESP. 09 fev. 2022. Disponível em: <<https://ceagesp.gov.br/comunicacao/noticias/goiaba-vermelha-produto-destaque/>>. Acesso em: 04 mar. 2025.

CENOBIO-GALINDO, A. J. *et al.* Influence of bioactive compounds incorporated in a nanoemulsion as coating on avocado fruits (*Persea americana*) during postharvest storage: antioxidant activity, physicochemical changes and structural evaluation. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 500, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States**. United States, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2025.

CHANDRA, M. *et al.* β -Selinene-Rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 52, 2017.

CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 779–797, 2019.

CHINATU, N. P. Anti-arthritis, antioxidant and anti - inflammatory potential of ethanolic extract of guava leaves on rats exposed to high fat diet and freud adjuvant. **Journal of Complementary and Alternative Medical Research**, 2023.

CHOI, E. *et al.* *Psidium guajava* L. leaf extract inhibits adipocyte differentiation and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. **Nutrition Research and Practice**, v. 15, n. 5, p. 568–578, 2021.

CHOOKIAT, S. *et al.* Nanoemulsions containing *Mucuna pruriens* (L.) DC. seed extract for cosmetic applications. **Cosmetics**, v. 11, n. 1, 2024.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils - present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CHU, Y. *et al.* Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. **LWT**, v. 122, 2020.

CHUESIANG, P. *et al.* Antimicrobial activity of PIT-fabricated cinnamon oil nanoemulsions: Effect of surfactant concentration on morphology of foodborne pathogens. **Food Control**, v. 98, p. 405–411, 2019.

CIPRIANO, R. R.; MAIS, B. H. L. N. S.; DESCHAMPS, C. Chemical variability of essential oils of *Eugenia uniflora* L. genotypes and their antioxidant activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4. ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLSI. **M100-S23 - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement an informational supplement for global application developed through the Clinical and laboratory standards institute consensus process**, 2013.

DA COSTA, J. S. *et al.* **Essentials oils from Brazilian *Eugenia* and *Syzygium* species and their biological activities**: MDPI AG, 2020a.

DA COSTA, J. S. *et al.* Seasonal and antioxidant evaluation of essential oil from *Eugenia uniflora* L., curzerenrich, thermally produced in situ. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020b.

DA SILVA, A. C. *et al.* Oviposition deterrent activity of hydrolate, aqueous extract and major constituents of essential oil from the leaves of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) for the control of *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 198, 2023.

DA SILVA DANTAS, A. **Antimicrobial resistance**: Wiley, 2022. Disponível em: [wileyonlinelibrary.com/journal/mmi](https://www.wileyonlinelibrary.com/journal/mmi). Acesso em: 14 jan. 2025.

DA SILVA DE SOUZA, T. *et al.* Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38–44, 2017.

DAHAM, S. S. *et al.* The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DAKHLAOUI, S. *et al.* Essential oil and its nanoemulsion of *Eucalyptus cladocalyx*: chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 34, n. 8, p. 2899–2912, 2024.

- DANAEL, M. *et al.* **Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems**: MDPI AG, 2018.
- DANIEL, G.; S, K. K. Free radical scavenging activity of aqueous (hot) extract of *Eugenia uniflora* (L.) leaves. **Journal of Plant Biochemistry & Physiology**, v. 07, n. 01, 2019.
- DE JESUS, E. N. S. *et al.* Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory activities of the curzerene type essential oil of *Eugenia uniflora* from Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 317, 2023.
- DE SOUSA, D. P. *et al.* **Essential oils: chemistry and pharmacological activities**: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2023.
- DE SOUZA, T. S. *et al.* Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. **Phytochemistry**, v. 153, p. 129–137, 2018.
- DE SOUZA, W. F. C. *et al.* Exploiting the chemical composition of essential oils from *Psidium cattleianum* and *Psidium guajava* and its antimicrobial and antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 10, p. 4637–4649, 2021.
- DE SOUZA, I. F. P. *et al.* Fatores que contribuem para o desenvolvimento de bactérias resistentes em unidades de terapia intensiva. **Revista de Trabalhos Acadêmicos - Universo Campos dos Goytacazes**, v. 2, 2019.
- DELFINO, M. M. de S. *et al.* Chemical composition and acaricidal effect of the *Eugenia uniflora* essential oil against two *Tetranychids* (Acari: Tetranychidae) species. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 17, n. 2, 2019.
- DOODMAN, S. *et al.* Chemical composition of essential oils from *Smyrniium cordifolium* Boiss. (Apiaceae) ecotypes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 110, 2023.
- DOS SANTOS, F. R. *et al.* larvicidal and fungicidal activity of the leaf essential oil of five Myrtaceae species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 12, p. e202300823, 2023.
- DURMUŞ, M. *et al.* The effects of edible oil nanoemulsions on the chemical, sensory, and microbiological changes of vacuum packed and refrigerated sea bass fillets during storage period at $2 \pm 2^\circ\text{C}$. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, 2019.
- DUVAL, R. E.; GRARE, M.; DEMORÉ, B. Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right bacteria. **Molecules**, 2019.
- EL-DEMERDASH, F. M.; EL-SAYED, R. A.; ABDEL-DAIM, M. M. *Rosmarinus officinalis* essential oil modulates renal toxicity and oxidative stress induced by potassium dichromate in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 67, 2021.

EL-SAYED, S. M.; EL-SAYED, H. S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 10, p. 1029–1041, 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA; EMBRAPA SEMIÁRIDO; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e A. **Coleção plantar - A cultura da goiaba**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. v. 66 Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/876249/1/PLANTARGoiabaed022010.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2025.

FALCÃO, T. R. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018.

FERNANDES GIRÃO, D. K. Effect of essential oils on pain management: what do we know and where do we go? **Brazilian Journal of Health Aromatherapy and Essential Oil**, 2024a.

FERNANDES GIRÃO, D. K. What routes makes essential oils effective in aromatherapy? a current perspective study. **Brazilian Journal of Health Aromatherapy and Essential Oil**, 2024b.

FERREIRA, O. O. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of *Myrcia multiflora* and *Eugenia florida* essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 23, 2021.

FIDELIS, E. M. *et al.* **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review**: Elsevier B.V., 2022.

FIGUEIREDO, P. L. B. *et al.* Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 30–38, 2019.

FIROOZY, M.; ANARJAN, N. Preparation of maltodextrin stabilized α -tocopherol nanoemulsions using solvent-displacement technique. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 5, p. 404–413, 2019.

FISHER, M. C. *et al.* **Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health**: Nature Research, 2022.

FLORES, N. P. *et al.* *Eugenia uniflora* fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 10, 2020.

FRANZOLIN, M. R. *et al.* *Eugenia uniflora* L. silver and gold nanoparticle synthesis, characterization, and evaluation of the photoreduction process in antimicrobial activities. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, 2022.

FREITAS, M. L. F.; DUTRA, M. B. D. L.; BOLINI, H. M. A. Sensory profile and acceptability for pitanga (*Eugenia uniflora* L.) nectar with different sweeteners. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 720–731, 2016.

GARCIA-BECERRA, C. *et al.* Characterization and bioavailability of a novel coenzyme Q10 nanoemulsion used as an infant formula supplement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 634, p. 122656, 2023.

GHADERI, F. *et al.* The effect of hydroalcoholic extract of *Psidium guajava* L. on experimentally induced oral mucosal wound in rat. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 2022.

GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 781–789, 2018.

GUTIERREZ-MONTIEL, D. *et al.* ***Psidium guajava* L.: From byproduct and use in traditional Mexican medicine to antimicrobial agent**, 2023.

HANIF, M. U. *et al.* Variation in composition and bioactivities of essential oil from leaves of two different cultivars of *Psidium guajava* L. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 65–76, 2018.

HASIBUAN, R. Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) bark using microwave assisted extraction method. **Iop Conference Series Earth and Environmental Science**, 2024.

HASSAN, S.; MANZOOR, M. A.; SALEEM, M. A. Using essential oils of weeds in aromatherapy for healing and medication. **Journal of Research in Weed Science**, v. 3, n. 1, p. 71–80, 2020.

HASSANSHAHIAN, M.; SAADATFAR, A.; MASOUMIPOUR, F. Formulation and characterization of nanoemulsion from *Alhagi maurorum* essential oil and study of its antimicrobial, antibiofilm, and plasmid curing activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria, 2020.

HEPPY, F. *et al.* The effect of *Psidium guajava* leaves' extract for mild and asymptomatic corona virus Disease-19. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 4, p. 592–596, 2023.

HO, T. M.; ABIK, F.; MIKKONEN, K. S. An overview of nanoemulsion characterization *via* atomic force microscopy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 18, p. 4908–4928, 2022.

HONG, M. *et al.* Multivariate analysis of essential oil composition of *Artemisia annua* L. collected from different locations in Korea. **Molecules**, v. 28, n. 3, 2023.

HUA, L. *et al.* The extraction of natural essential oils and terpenoids from plants by supercritical fluid. **E3s Web of Conferences**, 2021.

HUDZ, N. *et al.* **Mentha piperita: essential oil and extracts, their biological activities, and perspectives on the development of new medicinal and cosmetic products**: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2023.

HUSSIN, N. N. *et al.* Chemical constituents profiles and antibacterial activity of *Psidium guajava* leaves essential oil. **Materials Science Forum**, 2021.

HUSSIN, N. N. Polycaprolactone/cellulose acetate loaded *Psidium guajava* essential oil electrospun nanofibrous mat dressing for healing wounds. **Malaysian Applied Biology**, 2023.

IKOKWU, G. M. Emerging trends in antimicrobial resistance and novel therapeutic strategies. **International Journal of Pathogen Research**, 2023.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 9235:2021 - Aromatic natural raw materials - Vocabulary**, 2021.

INTERNATIONAL TRADE CENTRE. **TRADE MAP - Trade statistics for international business development**, 2024. Disponível em: https://www.trademap.org/Country_SelProduct_Graph.aspx?nvpm=1%7c%7c%7c%7c%7c3301%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2. Acesso em: 5 fev. 2025.

JAWAID, T. *et al.* Preparation and evaluation of nanoemulsion of citronella essential oil with improved antimicrobial and anti-cancer properties. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, 2023.

JERÔNIMO, L. B. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activities of Myrtaceae essential oils rich in terpenoids from Brazil. **Chemical Compositions and Biological Activities of Essential Oils**, v. 16, n. 2, p. 1–13, 2021.

JIAN, Z. *et al.* **Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control**: John Wiley and Sons Inc, 2021.

KALANI, L. Comparing the effect of geranium aromatherapy and foot reflexology on fatigue and daily activities of patients undergoing hemodialysis: a randomized controlled trial. **Trends in Medical Sciences**, 2023.

KAMBLE, M. A. *et al.* Formulation and evaluation of anti-acne face wash gel using guava seed extract. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 2019.

KASIMANICKAM, V.; KASIMANICKAM, M.; KASIMANICKAM, R. Antibiotics use in food animal production: escalation of antimicrobial resistance: where are we now in combating AMR? **Medical Sciences**, 2021.

KAUR, G. *et al.* Recent trends and advancements in nanoemulsions: Production methods, functional properties, applications in food sector, safety and toxicological effects. **Food Physics**, v. 1, p. 100024, 2024.

LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ, J. *et al.* Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. seeds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 291–300, 2021.

LE, T. B. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Can Tho University Journal of Science**, 2021.

LEBER, A. L. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, DC: ASM Press, 2016.

LEE, H. W. *et al.* Aromatherapy for managing menopausal symptoms: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 2021.

LESTARI, K. P. *et al.* Effleurage massage with lavender (*Lavandula lamiaceae*) essential oil aromatherapy reduces pregnant women's lower back pain. **Kne Life Sciences**, 2022.

LIU, M. *et al.* Garlic essential oil in water nanoemulsion prepared by high-power ultrasound: Properties, stability and its antibacterial mechanism against MRSA isolated from pork. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 90, 2022.

LIU, C.; JULLIAN, V.; CHASSAGNE, F. **Ethnobotany, phytochemistry, and biological activities of *Psidium guajava* in the treatment of diarrhea: a review**: Frontiers Media SA, 2024.

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

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAHDAVIKIAN, S.; FALLAHI, M.; KHATONY, A. Comparing the effect of aromatherapy with peppermint and lavender essential oils on fatigue of cardiac patients: a randomized controlled trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2021.

MAHMOUDVAND, H. Role of aromatherapy on anxiety, pain, sleep quality, and hemodynamic parameters in burn patients; a systematic review of clinical trials. **International Journal of Health and Pharmaceutical (Ijhp)**, 2022.

MALIK, M. R.; NAWAZ, A.; NOOR, W. The nanoemulsion technique, one of the most promising strategies for enhancing drug permeation through transdermal route. *In: Design and applications of self-assembly aggregates - from micelles to nanoemulsions*: IntechOpen, 2024.

MAMUN, A. Al *et al.* High carbohydrate high fat diet induced hepatic steatosis and dyslipidemia were ameliorated by *Psidium guajava* leaf powder supplementation in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2019.

MAMUN, M. M. *et al.* Nanoantibiotics: functions and properties at the nanoscale to combat antibiotic resistance. **Frontiers in Chemistry**, 2021.

MANUAL DO JARDIM. **Como cultivar Goiaba**, 2020. Disponível em: <https://manualdojardim.com.br/2020/10/19/como-cultivar-goiaba/>. Acesso em: 5 fev. 2025.

MARQUES, A. M. *et al.* Isolation of two major sesquiterpenes from the leaf essential oil of *Eugenia uniflora* by preparative-scale high-speed countercurrent chromatography. **Separation Science Plus**, v. 1, n. 12, p. 785–792, 2018.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. da. O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: a suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 17–22, 2009.

MECHERGUI, K. *et al.* Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp glandulosum (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 32–37, 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. 2. ed. Brasília, DF, 2011.

MOAZENI, M. *et al.* *In vitro* antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. **Journal of Herbal Medicine**, v. 28, 2021.

MOHAMED, S. A. *et al.* Chemical profile, anti-inflammatory, and antimicrobial activities of the essential oil and lipoidal matter obtained from two *Eugenia* species cultivated in Egypt. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 13, p. 849–859, 2023.

- MONTEIRO, E. da S. *et al.* Characterization and determination of the antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* essential-oil nanoemulsions. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, 2023.
- MORTEZA-SEMNANI, K. *et al.* Development of a novel nanoemulgel formulation containing cumin essential oil as skin permeation enhancer. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 6, p. 1455–1465, 2022.
- MUHAMMAD, S. *et al.* Making aromatherapy candles with natural ingredients from essential oils and soybean oil. **Journal of Patchouli and Essential Oil Products**, 2022.
- MUKUNDA, D. A. Efficacy of *Psidium Guajava* leaf extract on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* – an *in vitro* study. **Journal of Medical Science and Clinical Research**, 2019.
- MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- MUSTAFA, I. F.; HUSSEIN, M. Z. Synthesis and technology of nanoemulsion-based pesticide formulation. **Nanomaterials**, v. 10, n. 8, p. 1608, 2020.
- NASEEMA, A. *et al.* **A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions**: Elsevier B.V., 2021.
- NASEER, S. *et al.* The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). **Clinical Phytoscience**, 2018.
- NAVES, L. B. *et al.* **Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer**: SpringerOpen, 2017.
- NODARI, C. S. *et al.* Genomic analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to major endemic clones in South America. **Frontiers in Microbiology**, 2020.
- NTALLI, N. *et al.* *Carlina acaulis* essential oil nanoemulsion for managing *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 193, 2023.
- OBUOTOR, T. M.; OMANKHANLEN, A.; LASISI, A. A. Antimicrobial efficacy of the extract, fractions and essential oils from the leaves of *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae). **Ife Journal of Science**, v. 19, n. 1, p. 159, 2017.
- OJATULA, A. O. Aqueous root extract of *Psidium guajava* exhibits dependent effects on aphrodisiac indices, reproductive hormones and spermatogenesis of male wistar rats. **Jpam**, 2023.

OKWUDILICHUKWU, O. J. Phytochemicals and antibiotic studies of ethanolic extracts of *Dennettia tripetala* (pepper fruit) and *Psidium guajava* (guava) leaves on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Global Academic Journal of Medical Sciences**, 2024.

OMURTAG ÖZGEN, P. S. *et al.* Chemical composition and *in vitro* mutagenic, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil from Turkey. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 781–789, 2022.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, 2020.

PAIVA, Y. F. *et al.* physicochemical aspects, bioactive compounds, phenolic profile and *in vitro* antioxidant activity of tropical red fruits and their blend. **Molecules**, v. 28, n. 12, 2023.

PARAÍSO DAS ÁRVORES. **Goiabeira - *Psidium guajava***, [s. d.]. Disponível em: <https://loja.paraisodasarvores.com.br/goiabeira-goiaba.html>. Acesso em: 5 fev. 2025.

PAVONI, L. *et al.* An Overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 135, 2020a.

PAVONI, L. *et al.* **An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability**: MDPI AG, 2020b.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, 2016.

PHONG, L. T.; LUM, N. T. *Psidium guajava* L. extract against Minimum Inhibitory Concentration of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Asian Multicultural Research for Medical and Health Science Study**, 2021.

PILONG, P. *et al.* Characteristics and antimicrobial activity of microfluidized clove essential oil nanoemulsion optimized using response surface methodology. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 12, p. e16886, 2022.

POUDEL, D. K. *et al.* Analysis of volatile constituents in *Curcuma* species, viz. *C. aeruginosa*, *C. zedoaria*, and *C. longa*, from Nepal. **Plants**, v. 11, n. 15, 2022.

PREETI *et al.* **Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs**: Hindawi Limited, 2023.

QEKWANA, D. N. *et al.* Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus* species isolated from cats presented at a veterinary academic hospital in South Africa. **BMC Veterinary Research**, 2017.

- RAHMAN, M. M. *et al.* Antimicrobial activity of polycaprolactone nanofiber coated with lavender and neem oil nanoemulsions against airborne bacteria. **Membranes**, v. 14, n. 2, 2024.
- RAHMAWATI, A. *et al.* The effect of lavender aromatherapy on reducing anxiety levels in students. **Kesans International Journal of Health and Science**, 2022.
- REHMAN, I. U. *et al.* Knowledge and practice of pharmacists toward antimicrobial stewardship in Pakistan. **Pharmacy**, 2018.
- REYNOLDS, D. *et al.* The threat of multidrug-resistant/extensively drug-resistant gram-negative respiratory infections: another pandemic. **European Respiratory Review**, 2022.
- RHODES, J.; FISHER, M. C. **Global epidemiology of emerging *Candida auris***. Elsevier Ltd, 2019.
- RISTIVOJEVIĆ, P. *et al.* Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. **LWT**, v. 95, p. 367–379, 2018.
- RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS+. **Embrapa**, 2007a. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/281323118>.
- RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa**, p. 1–4, 2007b.
- SAMREEN *et al.* Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101–111, 2021.
- SANTOS, J. F. S. dos *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018.
- SARMA, N. *et al.* Chemical profiling of leaf essential oil of *Lantana camara* Linn. from North-East India. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 23, n. 5, p. 1035–1041, 2020.
- SATTAYAKHOM, A.; WICHIT, S.; KOOMHIN, P. **The effects of essential oils on the nervous system: a scoping review**: MDPI, 2023.
- SHADY, N. H. *et al.* Antiulcer potential of *Psidium guajava* seed extract supported by metabolic profiling and molecular docking. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, 2022.

SHAHABI, N. *et al.* Physical, antimicrobial and antibiofilm properties of *Zataria multiflora* Boiss essential oil nanoemulsion. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 7, p. 1645–1652, 2017.

SHARMA, K. *et al.* Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 154, 2020.

SHEHABELDINE, A. M. *et al.* Antimicrobial, antibiofilm, and anticancer activities of *Syzygium aromaticum* essential oil nanoemulsion. **Molecules**, v. 28, n. 15, 2023.

SILVA, E. *et al.* Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, 2019.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144, 1965.

Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira (SIBBR). *Eugenia uniflora* L. [s. d.]. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/340821#classification>. Acesso em: 9 fev. 2025 a.

Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira (SIBBR). *Psidium guajava* L. [s. d.]. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/304551#overview>. Acesso em: 5 fev. 2025 b.

SOBEH, M. *et al.* A polyphenol-rich fraction from *Eugenia uniflora* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 5, p. 84, 2020.

SOMALA, N.; LAOSINWATTANA, C.; TEERARAK, M. Formulation process, physical stability and herbicidal activities of *Cymbopogon nardus* essential oil-based nanoemulsion. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

SOULAIMANI, B. *et al.* Optimization of antibacterial activity of essential oil mixture obtained from three medicinal plants: Evaluation of synergism with conventional antibiotics and nanoemulsion effectiveness. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 900–908, 2022.

ST-PIERRE, A. *et al.* Phytochemical screening of quaking aspen (*Populus tremuloides*) extracts by UPLC-QTOF-MS and evaluation of their antimicrobial activity. **Molecules**, 2018.

SUKASRI, A. The use of Soxhlet techniques in the essential oil extraction from anise seeds (*Pimpinella Anisum*). **Equilibrium Journal of Chemical Engineering** 2023.

TABATABAEICHEHR, M.; MORTAZAVI, H. The effectiveness of aromatherapy in the management of labor pain and anxiety: a systematic review. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, 2020.

TAKASI, P. Effect of aromatherapy with rose essential oil on the nausea and vomiting in chemotherapy patients: a randomized controlled trial. **Annals of Medicine and Surgery**, 2023.

TAVARES, T. M. B. *et al.* Nanoemulsions: a promising strategy in the fight against bacterial infections. *In:* , 2024. **Anais [...]**: MDPI AG, 2024. p. 18.

TEIXEIRA, D. de A. **Microbiologia Básica**. Teófilo Otoni, 2020.

TENG, F. *et al.* Effect of ultrasonication on the stability and storage of soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

THIN, D. B.; THINH, B. B.; HANH, D. H. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from leaves and rhizomes of *Curcuma zedoaria* obtained via supercritical fluid extraction. **Nexo Revista Científica**, v. 35, n. 04, p. 1091–1098, 2022.

TOLEDO, A. G. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucrata* DC. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 568–577, 2020.

UDDIN, T. M. *et al.* **Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects**. Elsevier Ltd, 2021.

UJILESTARI, T. *et al.* Nanoemulsion application in meat product and its functionality: review. **Journal of Animal Science and Technology**, 2022.

URBIZTONDO, I. *et al.* Decreasing Inappropriate Use of antibiotics in primary care in four countries in South America - cluster randomized controlled trial. **Antibiotics**, 2017.

VARELA, M. F. *et al.* **Bacterial resistance to antimicrobial agents**. MDPI AG, 2021.

VEERAPANDIAN, R. *et al.* **Editorial: Developing therapeutics for antimicrobial resistant pathogens**. Frontiers Media S.A., 2022.

VELOSO, M. Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae* isolated in Chile: high-risk st25 clones and novel mobile elements. **Microbiology Spectrum**, 2023.

VOLPI, C.; SHEHADEH, F.; MYLONAKIS, E. Correlation of antimicrobial prescription rate and county income in medicare part D. **Medicine**, 2019.

WANG, X. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 25, n. 17, 2020.

WANG, L. *et al.* Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Psidium guajava* L. leaves from different geographic regions in China. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 9, p. e1700114, 2017.

WOO, H. J. *et al.* Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Helicobacter pylori* infection *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 14 jan. 2025.

WU, N. *et al.* Construction and properties of O/W liquid crystal nanoemulsion. **Langmuir**, v. 40, n. 14, p. 7723–7732, 2024.

WU, M.-H. *et al.* Effects of emulsifier type and environmental stress on the stability of curcumin emulsion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 1375–1380, 2017.

YAKOBI, S. Molecular Docking and structure-activity relationship analysis of target compounds against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **Chemistry select**, 2024.

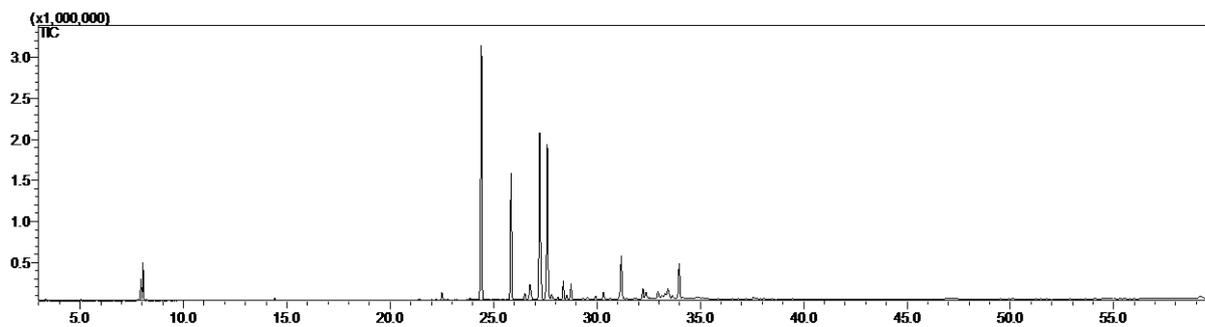
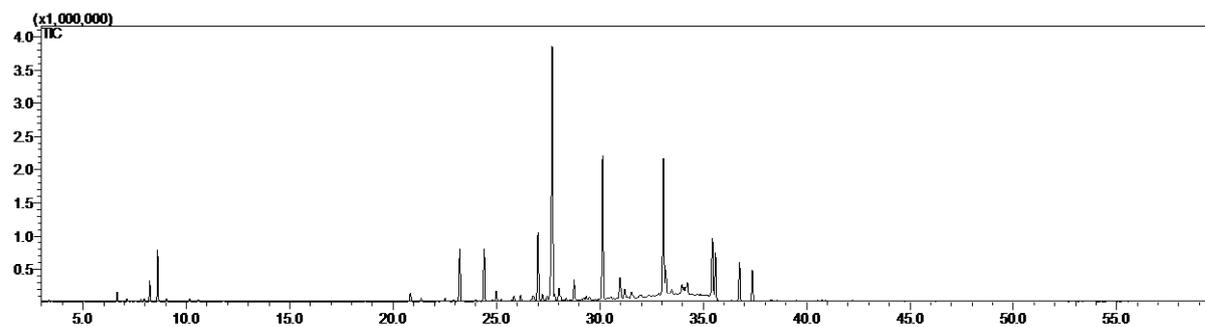
YAMMINE, J. *et al.* **Essential oils and their active components applied as: free, encapsulated and in hurdle technology to fight microbial contaminations. A review**. Elsevier Ltd, 2022.

YIN, H. A. *et al.* A Novel water-in-oil-in-water double nanoemulsion of α -mangostin and kojic acid for topical applications. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 49, n. 7, p. 9291–9305, 2024.

ZHANG, C.; CHEN, G. Comparing three different extraction techniques on essential oil profiles of cultivated and wild lotus (*Nelumbo nucifera*) flower. **Life**, 2020.

ZUNIGA-MOYA, J. C. *et al.* Antimicrobial profile of *Acinetobacter baumannii* at a tertiary hospital in Honduras: a cross-sectional analysis. **Revista Panamericana De Salud Pública**, 2020.

APÊNDICE A

Figura 14. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de goiaba**Figura 15.** Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de pitanga

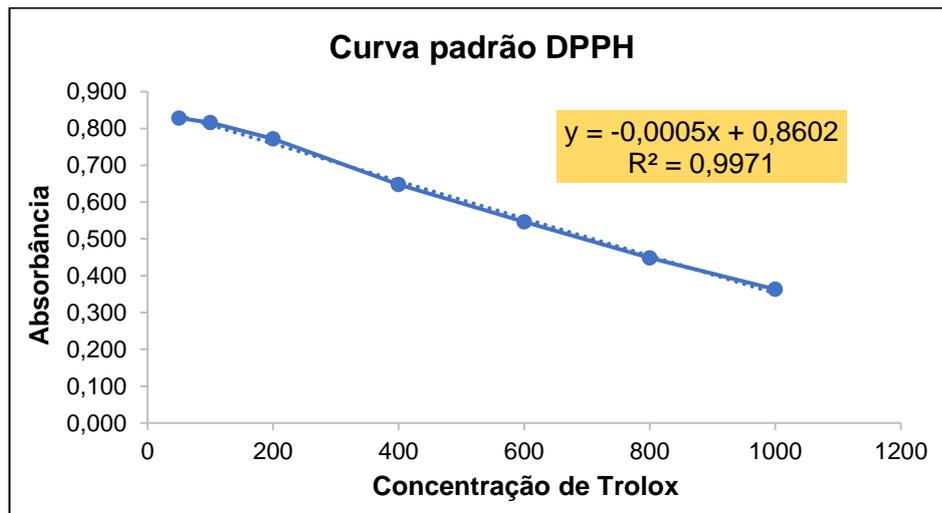
APÊNDICE B

Quadro 2. Curva padrão de Trolox para DPPH

DPPH - Leitura à 517nm				
Solução Trolox 2mM. (µL)	Álcool etílico (µL)	Concentração Final (µM)	Trolox (100 µL) + DPPH (3900µL)	
			Absorbância (517 nm)	
25	975	50	50	0,828
50	950	100	100	0,816
100	900	200	200	0,772
200	800	400	400	0,648
300	700	600	600	0,546
400	600	800	800	0,448
500	500	1000	1000	0,363

Fonte: Autoria própria, 2025.

Figura 16. Curva padrão para determinação da atividade antioxidante (DPPH)

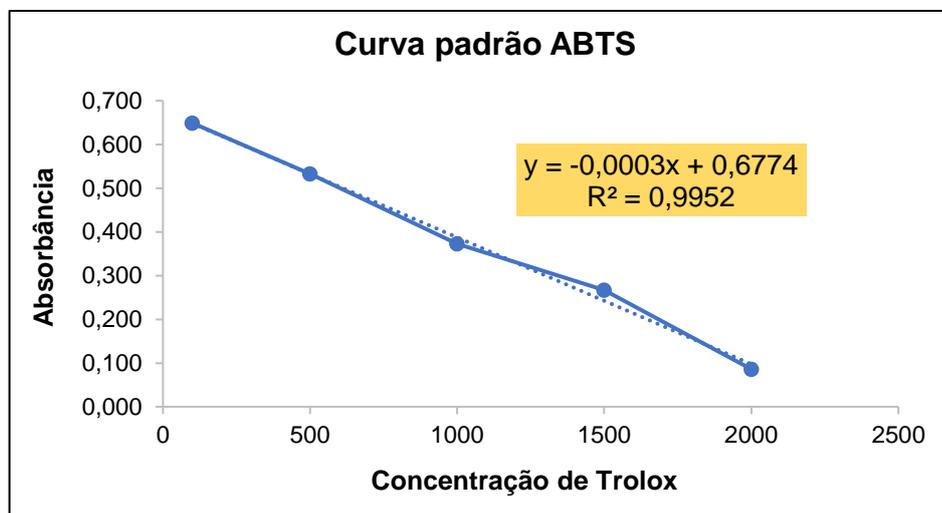


Fonte: Autoria própria, 2025.

Quadro 3. Curva padrão de Trolox para ABTS

ABTS - Leitura à 734 nm				
Solução Trolox 2mM. (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração Final (μ M)	Trolox (30 μ L) + ABTS (3000 μ L)	
			Absorbância (734 nm)	
50	950	100	100	0,649
250	800	400	500	0,533
500	650	700	1000	0,373
750	500	1000	1500	0,267
1000	350	1300	2000	0,086

Fonte: Autoria própria, 2025.

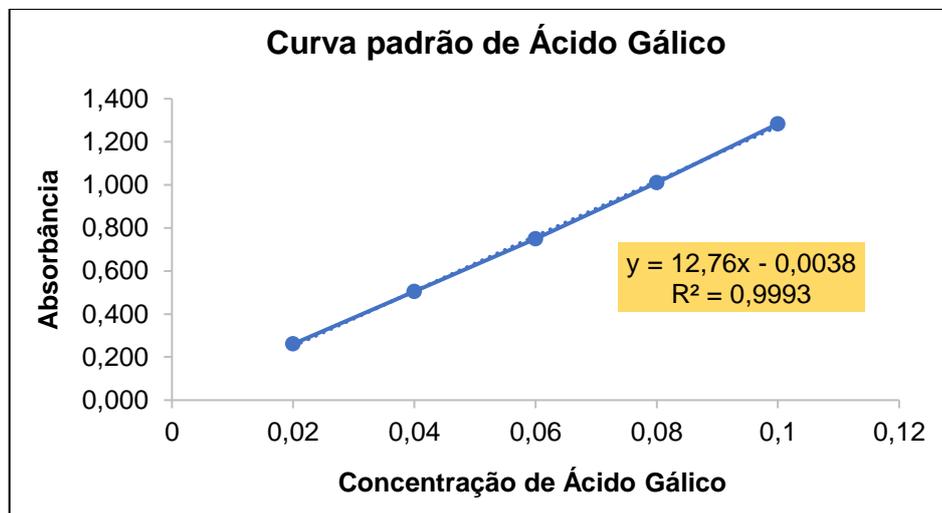
Figura 17. Curva padrão para determinação da atividade antioxidante (ABTS)

Fonte: Autoria própria, 2025.

Quadro 4. Curva padrão de Ácido Gálico para quantificação de compostos fenólicos

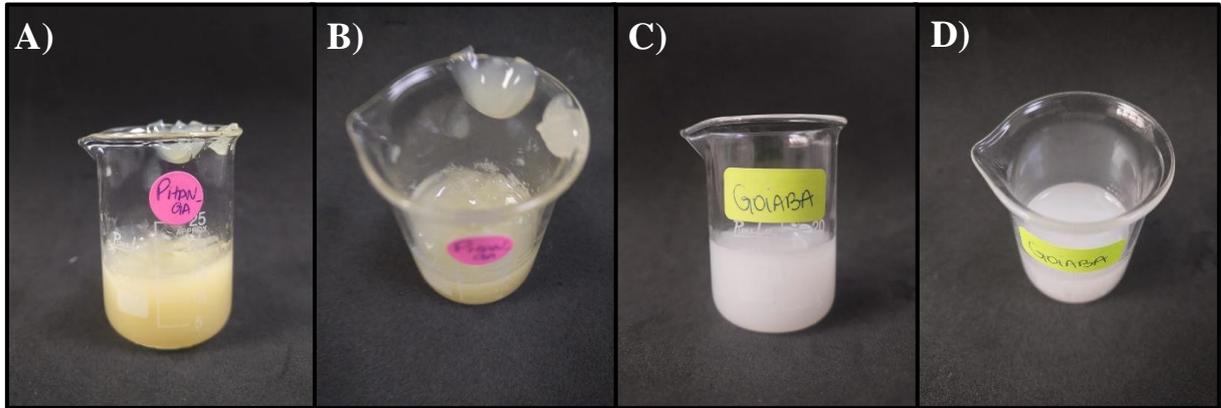
Compostos Fenólicos – Curva de Ácido Gálico – Leitura à 760 nm					
Água destilada (mL)	Ácido Gálico (µL)	Reagente Folin-Ciocalteu (µL)	Carbonato de Sódio (µL)	Concentração Final (mg)	Absorbância (760 nm)
8,3	200	500	1000	0,02	0,261
8,1	400			0,04	0,504
7,9	600			0,06	0,750
7,7	800			0,08	1,010
7,5	1000			0,10	1,284

Fonte: Autoria própria, 2025.

Figura 18. Curva padrão para quantificação de compostos fenólicos

Fonte: Autoria própria, 2025.

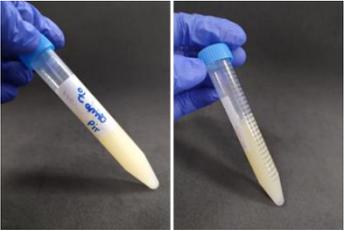
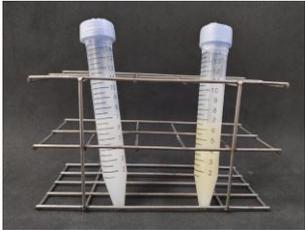
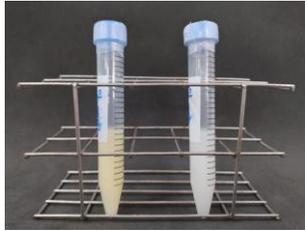
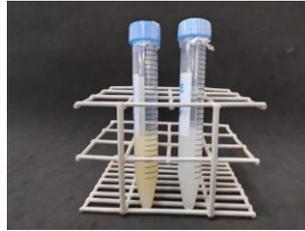
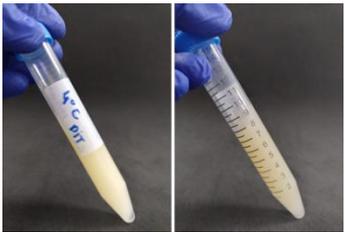
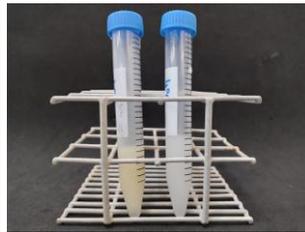
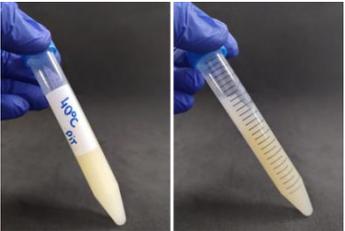
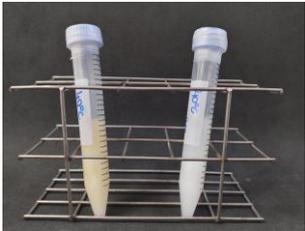
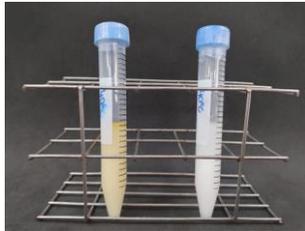
APÊNDICE C

Figura 19. Nanoemulsões em gel de goiaba e pitanga

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: **A - B)** Nanoemulsão em gel de pitanga; **C - D)** Nanoemulsão em gel de goiaba.

Quadro 5. Fotos da estabilidade das nanoemulsões de goiaba e pitanga

		Dias de armazenamento					
		0	1	3	7	14	30
Temperatura	25 °C						
	4 °C						
	40 °C						

Fonte: Autoria própria, 2025.

ANEXO A. PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI-1640 PARA O CRESCIMENTO DE LEVEDURAS

Apêndice A. Meio RPMI-1640

RPMI-1640 meio tamponado com MOPS 0,165 mol/L, 1 L.

10,4g de meio RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato) 34,53g de tampão de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico)

Dissolver o meio em pó em 900mL de H₂O destilada. Acrescentar MOPS (concentração final de 0,165 mol/L), agitando até dissolver. Enquanto mexer, ajuste o pH para 7,0 a 25° C usando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água adicional para levar o meio a um volume final volume de 1 L. Esterilizar por filtração e armazenar a 4° C até usar.

Apêndice B. Padrão de Turbidez de Sulfato de Bário McFarland 0,5

Para padronizar a densidade do inóculo, utiliza-se uma solução padrão de turbidez de BaSO₄ (Solução Padrão de McFarland 0,5).

O processo consiste nos seguintes passos.

- (1) Preparar a solução padrão de turbidez acrescentando 0,5mL de BaCl₂ 0,048 mol/L (1,175% w/v BaCl₂•2H₂O) a 99,5mL de H₂SO₄ 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v).
- (2) Verificar a densidade correta da solução padrão de turbidez usando um espectrofotômetro com via de luz (*light path*) de 1cm e cubeta correspondente para determinar a absorvância. A 625nm, a absorvância deverá ser de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland 0.5.
- (3) Colocar de 4 a 6mL em tubos com tampas de rosca, do mesmo tamanho dos usados para cultivar ou diluir o inóculo em cultura de caldo.
- (4) Fechar bem os tubos e armazená-los em câmara escura, a temperatura ambiente.
- (5) Agitar vigorosamente esse padrão de turbidez num misturador de vórtex mecânico imediatamente antes de usar.
- (6) Substituir as soluções padrão ou verificar novamente as densidades três meses depois de preparadas.

ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO



Article

Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of *Eugenia uniflora* and *Psidium guajava*

Rebeca Dias dos Santos ^{1,2}, Breno Noronha Matos ², Daniel Oliveira Freire ¹, Franklyn Santos da Silva ^{1,2}, Bruno Alcântara do Prado ^{1,2}, Karolina Oliveira Gomes ¹, Marta Oliveira de Araújo ¹, Carla Azevedo Bilac ¹, Letícia Fernandes Silva Rodrigues ¹, Izabel Cristina Rodrigues da Silva ¹, Lívia Cristina Lira de Sá Barreto ^{1,2}, Claudio Augusto Gomes da Camara ³, Marcilio Martins de Moraes ³, Guilherme Martins Gelfuso ² and Daniela Castilho Orsi ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Quality Control, University of Brasília (UNB/FCE), Centro Metropolitano, Conjunto A, Lote 01, Ceilândia, Brasília 72220-900, DF, Brazil; rebecadias123@gmail.com (R.D.d.S.); daniel.microbiologia@gmail.com (D.O.F.); franklyn.silva@aluno.unb.br (F.S.d.S.); prado.bruno@aluno.unb.br (B.A.d.P.); gomes.karolina@aluno.unb.br (K.O.G.); oa.martaaraujo@gmail.com (M.O.d.A.); carlabilac@gmail.com (C.A.B.); rodriguesleticia@gmail.com (L.F.S.R.); belbiomedica@gmail.com (I.C.R.d.S.); liviabarreto@unb.br (L.C.L.d.S.B.)
- ² Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics, University of Brasília (UNB/FS), Brasília 70910-900, DF, Brazil; brenomatos15@hotmail.com (B.N.M.); gmgelfuso@unb.br (G.M.G.)
- ³ Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco, Recife 50740-560, PE, Brazil; claudio.camara@ufrpe.br (C.A.G.d.C.); marcilio.moraes@ufrpe.br (M.M.d.M.)
- * Correspondence: danielacastilhoorsi@gmail.com



Academic Editor: Carlos M. Franco

Received: 27 November 2024

Revised: 4 January 2025

Accepted: 8 January 2025

Published: 14 January 2025

Citation: dos Santos, R.D.; Matos, B.N.; Freire, D.O.; da Silva, F.S.; do Prado, B.A.; Gomes, K.O.; de Araújo, M.O.; Bilac, C.A.; Rodrigues, L.F.S.; da Silva, I.C.R.; et al. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of *Eugenia uniflora* and *Psidium guajava*. *Antibiotics* **2025**, *14*, 93. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010093>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background/Objectives: This study aimed to develop gel nanoemulsions (NEs) of Brazilian essential oils (EOs) from *Eugenia uniflora* and *Psidium guajava*, as well as to perform chemical characterization and investigate the antimicrobial activity of the EOs and NEs. **Results/Conclusions:** The main chemical compounds of *E. uniflora* EO were curzerene (34.80%) and germacrene B (11.92%), while those of *P. guajava* EO were β -caryophyllene (25.92%), β -selinene (22.64%), and γ -selinene (19.13%). The NEs of *E. uniflora* and *P. guajava* had droplet sizes of 105.30 and 99.50 nm and polydispersity index (PDI) values of 0.32 and 0.43, respectively. The NEs remained stable for 30 days of storage at 25 °C, with droplet sizes of 104.7 and 103.8 nm, PDI values below 0.50, and no phase separation. The NE of *E. uniflora* exhibited inhibition zones ranging from 8.41 to 15.13 mm against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. Additionally, the NE of *E. uniflora* showed the largest inhibition zones against *Candida albicans* (20.97 mm) and *Candida krusei* (15.20 mm), along with low minimum inhibitory concentration (MIC) values (0.54–1.22 mg/mL) and minimal bactericidal concentration (MBC) values (4.84–11.02 mg/mL) against these pathogenic yeasts. The NE of *P. guajava* demonstrated low MIC (1.26 mg/mL) and MBC (11.35 mg/mL) values for *C. krusei*. The time–growth inhibition assay also suggests the effectiveness of the NE against the tested pathogens *S. aureus* and *E. coli*, highlighting its potential as a novel alternative therapeutic agent.

Keywords: pitanga essential oil; guajava essential oil; nanoemulsion; antifungal activity; antibacterial activity

1. Introduction

Eugenia uniflora L., popularly known as pitanga or Brazilian cherry, belongs to the Myrtaceae family and is a fruit tree native to Brazil. Traditional communities use an infusion of the leaves and bark of *E. uniflora* to treat diarrhea, fever, and inflammation [1–3]. *Psidium guajava*, commonly known as guava, is a fruit tree native to South and Central America and belongs to the Myrtaceae family. In traditional medicine, guava leaves are used as laxatives and to treat wounds, gastrointestinal problems, and diabetes [4–6].

Essential oils of both *E. uniflora* and *P. guajava* are extracted from the leaves and contain a complex mixture of compounds, including monoterpenes, sesquiterpenes, and phenolic compounds (flavonoids and phenols). They exhibit biological properties such as antimicrobial (antibacterial and antifungal), antioxidant, larvicidal, and anti-inflammatory effects [1–5].

Antimicrobial resistance is a global problem, creating an increasing need for new therapeutic alternatives to combat resistant microorganisms, as well as for the discovery of new antimicrobial drugs with novel chemical structures and mechanisms of action [7,8]. The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*; the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*; and the yeasts *Candida albicans* and *Candida krusei* are important microorganisms that cause a wide variety of diseases in humans and currently exhibit increasing resistance to common antimicrobial agents [9–16].

Given this scenario, many studies are exploring the potential of natural products as possible therapeutic alternatives to help treat infections caused by resistant microorganisms. Essential oils contain a complex mixture of chemical compounds in their composition, which exhibit antimicrobial activity [17,18]. One of the advantages of specifically using the essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava* as antimicrobials, compared to other essential oils, is the exploration of the biodiversity of the Brazilian flora, since these essential oils are less studied in the literature [19].

Despite their numerous advantages, essential oils face limitations as therapeutic agents in their free form, with one of the main limitations being their poor solubility in water, which affects their bioavailability and efficacy. Additionally, essential oils are highly volatile and can degrade over time, reducing their effectiveness [18]. An alternative to improve the stability and ensure the efficacy of essential oils is the production of nanoemulsions. Incorporating essential oils into nanoemulsions protects the active ingredient from degradation, increases solubility, and enhances biological activity. These systems create nanoscale droplets, significantly increasing the surface area of essential oils. The large surface area provided by the nanometric size increases solubility, resulting in greater bioavailability of poorly water-soluble compounds. Thus, nanoemulsions can encapsulate, protect, and promote the controlled release of lipophilic bioactive molecules [20].

Although some studies have reported the antimicrobial activities of Brazilian essential oils from *E. uniflora* and *P. guajava* [2–5], the formulation of nanoemulsions with these essential oils is still scarce in the literature [21], and no studies were found regarding the nanoemulsion of the essential oil from *E. uniflora*. Nanoemulsions have been identified as a promising means for the delivery of antimicrobial agents due to their ability to enhance the solubility, stability, and bioavailability of essential oils; their potential for organ and cellular targeting; their ability to penetrate biofilms; and their potential to overcome antimicrobial resistance [22]. Thus, gel-based nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* could represent an innovative approach for the development of dressings to treat infected wounds and burns.

In the development of nanoemulsions, it is fundamentally important to study the correct formulation that results in nanoemulsions with long-term stability and scalability [23].

Therefore, this study aimed to develop gel nanoemulsions of the essential oils from *E. uniflora* and *P. guajava*, as well as to perform a chemical characterization and study the antimicrobial activity of the essential oils and nanoemulsions.

2. Results and Discussion

2.1. Chemical Characterization of *E. uniflora* and *P. guajava* Essential Oils

Tables 1 and 2 show the chemical composition of the essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava*. The analysis of the chemical composition of the *E. uniflora* essential oil allowed the identification of 31 volatile compounds, representing 98.60% of the total oil, while the *P. guajava* essential oil revealed the identification of 21 volatile compounds, representing 98.10% of the total oil.

Table 1. Chemical composition (%) of *E. uniflora* essential oil.

	Components	Composition (%)	Classification
1	β -Myrcene	0.63	Monoterpene
2	α -Felandrene	0.17	Monoterpene
3	β -Thujene	0.20	Monoterpene
4	Trans- β -Ocimene	1.30	Monoterpene
5	β -Ocimene	3.32	Monoterpene
6	γ -Terpinene	0.15	Monoterpene
7	Terpinolene	0.14	Monoterpene
8	δ -Elemene	1.20	Sesquiterpene
9	α -Cubebene	0.31	Sesquiterpene
10	Copaene	0.30	Sesquiterpene
11	β -Elemene	4.74	Sesquiterpene
12	β -Caryophyllene	5.16	Sesquiterpene
13	γ -Elemene	1.72	Sesquiterpene
14	Bicyclosescuifelandrene	0.16	Sesquiterpene
15	Humulene	0.43	Sesquiterpene
16	Alloaromadendrene	0.53	Sesquiterpene
17	β -Panasinene	0.71	Sesquiterpene
18	β -Cubebene	6.79	Sesquiterpene
19	β -Selinene	0.47	Sesquiterpene
20	Curzerene	34.80	Sesquiterpene
21	δ -Guaiene	1.34	Sesquiterpene
22	γ -Cadinene	0.14	Sesquiterpene
23	δ -Cadinene	2.01	Sesquiterpene
24	α -Cadinene	0.40	Sesquiterpene
25	Germacrene B	11.92	Sesquiterpene
26	Spathulenol	1.14	Sesquiterpene
27	Globulol	0.80	Sesquiterpene
28	Aristoladiene	3.28	Sesquiterpene
29	Germacrone	3.99	Sesquiterpene
30	Calamenene	4.62	Sesquiterpene
31	Aristolene	5.73	Sesquiterpene
	Monoterpenes		5.91%
	Sesquiterpenes		92.69%
	% of Identification		98.60%

The major compounds classes in the essential oil of *E. uniflora* were sesquiterpenes (92.69%), with a predominance of sesquiterpene hydrocarbons (51.96%), oxygenated sesquiterpenes (40.73%), and monoterpenes (5.91%). The chemical constituents present in the largest amounts were the oxygenated sesquiterpene curzerene (34.80) and the sesquiterpene hydrocarbon germacrene B (11.92%). Other constituents were also identi-

fied in significant quantities, such as the sesquiterpene hydrocarbons β -cubebene (6.79%), aristolene (5.73%), β -caryophyllene (5.16%), β -elemene (4.74%), and calamenene (4.62%) and the oxygenated sesquiterpene germacrone (3.99%).

Table 2. Chemical composition (%) of *P. guajava* essential oil.

	Components	Composition (%)	Classification
1	α -Pinene	0.24	Monoterpene
2	p-Cimene	0.18	Monoterpene
3	Limonene	0.75	Monoterpene
4	Eucalyptol	4.58	Monoterpene
5	α -Terpineol	0.19	Monoterpene
6	Copaene	0.80	Sesquiterpene
7	β -Caryophyllene	25.92	Sesquiterpene
8	Humulene	3.95	Sesquiterpene
9	β -Panasinene	2.17	Sesquiterpene
10	β -Selinene	22.64	Sesquiterpene
11	γ -Selinene	19.13	Sesquiterpene
12	α -Muulolene	0.63	Sesquiterpene
13	β -Bisabolene	0.17	Sesquiterpene
14	γ -Cadinene	2.69	Sesquiterpene
15	7-epi- α -Selinene	0.49	Sesquiterpene
16	δ -Cadinene	2.48	Sesquiterpene
17	α -Calacorene	0.23	Sesquiterpene
18	Caryophyllene Oxide	5.61	Sesquiterpene
19	Humulene Oxide	0.37	Sesquiterpene
20	t-Cadinol	1.34	Sesquiterpene
21	Selin-6-en-4- α -ol	3.54	Sesquiterpene
	Monoterpenes		5.94%
	Sesquiterpenes		92.16%
	% of Identification		98.10%

De Jesus et al. [3] analyzed an essential oil of *E. uniflora* from the northern region of Brazil (Belém City, Pará State) and obtained similar results to our study, where the major compound was curzerene (33.40%). Da Costa et al. [1] evaluated the influence of seasonality on the chemical composition of *E. uniflora* essential oil from the northern region of Brazil (Belém City, Pará State) and observed that curzerene was the main constituent; its percentage showed no significant difference between the dry season (42.70%) and the rainy season (40.80%). Other constituents, such as the oxygenated sesquiterpenes germacrone (0.20–10.50%), globulol (1.50–7.40%), and spathulenol (0.50–7.00%) and the sesquiterpene hydrocarbons germacrene B (0.10–7.50%) and β -elemene (1.80–5.80%), were also identified in the *E. uniflora* essential oil. da Silva et al. [2] identified selina-1,3,7(11)-trien-8-one (57.55%) and oxido-selina-1,3,7(11)-trien-8-one (21.18%) as the major compounds in *E. uniflora* essential oil from the northeastern region of Brazil (Recife City, Pernambuco State).

Figueiredo et al. [24] reported that the chemical composition of *E. uniflora* essential oil has significant variability with different chemotypes but, in general, is rich in cyclic oxygenated sesquiterpenes with a germacrane-type skeleton, such as curzerene, selina-1,3,7(11)-trien-8-one, and selina-1,3,7(11)-trien-8-one epoxide, germacrone, and in association with other cyclic sesquiterpene hydrocarbons. The results of our study indicated that the chemical profile of *E. uniflora* essential oil was similar to that described by Figueiredo et al. [24] for chemotype III, which was represented by curzerene (50.6%), germacrene B (5.20%), and germacrone (4.50%).

The essential oil of *E. uniflora* contained 34.80% curzerene in its composition. Other than the essential oil of *E. uniflora*, only a few essential oils contain significant amounts of curzerene in their composition. Doodman et al. [25] reported 23.96 to 47.04% curzerene in the essential oil of *Smyrniium olusatrum*, an aromatic plant native to the Iran–Turkey region. The *Curcuma* genus also contains curzerene in significant quantities in the essential oils of its species (*C. aeruginosa* presented 4.70%, and *C. zedoaria* presented 6.20% of curzerene) [26].

Although there are few studies in the literature on the antimicrobial activity of curzerene, essential oils with curzerene as a major component exhibit inhibitory effects against various microorganisms. The antimicrobial activity of curzerene can be attributed to its structural characteristics, which allow it to interact with microbial membranes in a similar manner to other sesquiterpenes. This interaction disrupts membrane integrity, leading to cell death [27].

The major compounds classes in the essential oil of *P. guajava* were sesquiterpenes (92.16%), with a predominance of sesquiterpene hydrocarbons (81.30%), oxygenated sesquiterpenes (10.86%), and monoterpenes (5.94%). The chemical constituents with the highest amounts were the sesquiterpene hydrocarbons β -caryophyllene (25.92%), β -selinene (22.64%), and γ -selinene (19.13%). Other constituents were also identified in significant quantities, such as the oxygenated sesquiterpenes caryophyllene oxide (5.61%) and selin-6-en-4- α -ol (3.54%), the monoterpene eucalyptol (4.58%), and the sesquiterpene humulene (3.95%) (Table 2).

Dos Santos et al. [28] obtained similar results when analyzing the essential oil of *P. guajava* from the southeastern region of Brazil (Rio de Janeiro City, Rio de Janeiro State), identifying 20 compounds, of which 85.52% were sesquiterpene hydrocarbons. The major compounds were represented by α -humulene (33.20%), (E)-caryophyllene oxide (25.83%), α -selinene (12.08%), and β -selinene (11.71%). De Souza et al. [5] evaluated the essential oil of *P. guajava* from the southern region of Brazil (Canelinha City, Santa Catarina State) and identified β -selinene (13.83%), α -humulene (10.90%), and β -caryophyllene (7.61%) as the main compounds. Souza et al. [29] reported that essential oils of *P. guajava* from 22 different genotypes cultivated in the southeastern region of Brazil (Mimoso do Sul and Linhares Cities, Espírito Santo State) showed a predominance of trans-caryophyllene (14.2–16.0%) and α -humulene (7.1–11.4%). In five genotypes, there was also a prevalence of caryophyllene oxide (9.5–11.5%), β -selinene (6.8–8.0%), and α -selinene (6.1–7.6%).

The essential oil of *P. guajava* contained 41.77% selinene and 25.92% β -caryophyllene in its composition. Sarma et al. [30] reported similar results for the essential oil of *Lantana camara* leaves, which had β -caryophyllene (24.96%) and δ -selinene (17.46%) as major compounds. Some other essential oils have also been reported in the literature as having selinene as a major component, such as *Artemisia annua* (β -selinene 20.05–46.29%) [31] and *Callicarpa macrophylla* (β -selinene 37.51–57.01%) [32].

The sesquiterpene β -caryophyllene is studied in the literature for its antimicrobial activities. Dahham et al. [33] isolated β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna* and observed that the compound exhibited high antimicrobial activity, particularly against Gram-positive bacteria. Woo et al. [34] evaluated the antimicrobial activity of β -caryophyllene against the bacterium *Helicobacter pylori* and reported an MIC value of 1.0 mg/mL. The authors concluded that β -caryophyllene disrupts bacterial replication by downregulating the genes *dnaE*, *dnaN*, *holB*, and *gyrA*, which are expressed by *H. pylori*.

In the present study, *E. uniflora* essential oil showed higher antioxidant activity and phenolic compound content than *P. guajava* essential oil (Table 3). The antioxidant activity of essential oils can be attributed to their major chemical compounds, acting either individually or in synergy. Both terpenes and phenolic compounds are known for their antioxidant activity [35]. The antioxidant properties of essential oils can support their antimicrobial

efficacy, as they protect the oils from oxidation during storage, preserving their bioactive compounds and ensuring consistent antimicrobial effectiveness over time [33,34].

Table 3. Antioxidant activity and content of total phenolic compounds of essential oils from *E. uniflora* and *P. guajava*.

Analyses	Essential Oils	
	<i>E. uniflora</i>	<i>P. guajava</i>
ABTS ($\mu\text{mol TE/mL}$)	853.62 \pm 29.74 ^a	204.19 \pm 25.01 ^b
DPPH ($\mu\text{mol TE/mL}$)	183.71 \pm 8.43 ^a	51.30 \pm 20.01 ^b
Phenolic Compounds (mg GAE/mL)	1.30 \pm 0.35 ^a	1.11 \pm 0.64 ^b

Values represent mean \pm SD. Different letters within the same line mean significant differences at $p < 0.05$ according to the Tukey test at the 95% confidence level.

Oxygenated sesquiterpenes have higher antioxidant activity than sesquiterpene hydrocarbons, as the free radical scavenging activities are directly correlated with the oxygenation concentration of their constituents due to the increase in free electrons [36]. Thus, the higher oxygenated sesquiterpene content in *E. uniflora* essential oil (40.73%) may contribute to its enhanced antioxidant activity compared to *P. guajava* essential oil (10.86%), which has a lower concentration of these compounds.

E. uniflora essential oil presented antioxidant activity of 853.62 $\mu\text{mol TE/mL}$ (ABTS) and 183.71 $\mu\text{mol TE/mL}$ (DPPH). Other studies have also reported antioxidant activity in Brazilian essential oils from *E. uniflora*. Da Costa et al. [37] reported that two different samples of *E. uniflora* essential oil from leaves collected in the northern region of Brazil showed DPPH radical inhibition of 45.1% (228.3 mg TE/g) and 42.8% (217.0 mg TE/g). Additionally, Da Costa et al. [1] reported that *E. uniflora* essential oils, obtained from twelve months (January to December) of plant leaf sample collection in the Brazilian Amazon region, demonstrated DPPH antioxidant activity ranging from 186.9 to 436.3 mg TE/g.

P. guajava essential oil presented antioxidant activity of 204.19 $\mu\text{mol TE/mL}$ (ABTS) and 51.30 $\mu\text{mol TE/mL}$ (DPPH). Jeronimo et al. [38] reported that *P. guajava* essential oil from the northern region of Brazil presented a total antioxidant capacity of 195.7 mg TE/mL (DPPH). de Souza et al. [5] reported that the essential oil of *P. guajava* from the south region of Brazil showed 4.54 and 8.94 $\mu\text{mol TE/mL}$ for ABTS and DPPH, respectively.

E. uniflora and *P. guajava* essential oils presented values of total phenolic content of 1.30 and 1.10 mg GAE/mL, respectively. Omurtag Özgen et al. [39] reported a similar value of total phenolic content of 1.22 mg GAE/g for *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil from Turkey. Mechergui et al. [40] obtained values of total phenolic content of *Origanum vulgare* essential oils from North Africa varying from 4.10–17.70 mg GAE/g, and El-Demerdash [41] reported that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt contained a concentration of phenolic content of 0.04 mg GAE/mL.

2.2. Characterization and Stability of Nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava*

The nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* had droplet sizes of 105.30 and 99.50 nm, respectively (Table 4). According to the literature, nanoemulsions are colloidal dispersions composed of nanoscale droplets, with sizes ranging from 20 to 200 nm. The smaller droplet size in nanoemulsions helps suppress coalescence and precipitation of the droplets, and this contributes to minimizing the degradation of the nanoemulsion and increasing its stability [42,43].

The results of the present study are similar to the droplet sizes reported for nanoemulsions of other essential oils. A nanoemulsion of *Thymus vulgaris* essential oil showed spherical droplets with a diameter of 127.6 nm [44], while a cinnamon essential oil nanoemulsion resulted in droplets with an average size of 162.1 nm [45]. Additionally, it was

reported that the hydrodynamic diameters of the nanoemulsions formulated with *Carlina acaulis* essential oil ranged between 110 and 140 nm [46].

Table 4. Characterization of nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava*.

Analyses	Nanoemulsions	
	<i>E. uniflora</i>	<i>P. guajava</i>
Size (nm)	105.30 ± 0.60 ^a	99.50 ± 0.70 ^b
PDI	0.32 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.01 ^a
Zeta Potential (mV)	−9.29 ± 0.20 ^a	−7.34 ± 0.20 ^b
pH	5.75 ± 0.01 ^a	5.41 ± 0.10 ^a

PDI: polydispersity index. Values represent mean ± SD. Different letters within the same line mean significant differences at $p < 0.05$ according to the Tukey test at the 95% confidence level.

The polydispersity index obtained was 0.32 and 0.43 for the nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava*, respectively. The polydispersity index (PDI) measures the variation in particle sizes within a sample. It ranges from 0.0, which indicates a sample with uniform particle sizes, to 1.0, which reflects a sample with a wide variation in particle sizes. A PDI below 0.08 indicates a monodisperse distribution, while values above 0.70 suggest a broader droplet size distribution. A PDI between 0.08 and 0.70 is considered an acceptable size distribution in nanoemulsions. Thus, the PDI is an important indicator of homogeneity and is generally used to determine the stability of nanoemulsions [47,48].

Dakhlaoui et al. [49] reported similar results, in which nanoemulsions of *Eucalyptus cladocalyx* essential oil showed a PDI of 0.49. Additionally, Soulaïmani et al. [50] obtained PDI variations between 0.20 and 0.44 for nanoemulsions obtained from a mixture of essential oils of *Lavandula maroccana*, *T. vulgaris*, and *Ammodaucus leucotrichus*.

The zeta potential obtained was −9.29 and −7.34 mV for the nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava*, respectively. The zeta potential is used to measure the surface charge of particles in a liquid suspension, determined by the speed at which charged particles move toward the electrode when exposed to an external electric field, with values ranging from +100 to −100 mV. The zeta potential is influenced by physicochemical properties, the presence of electrolytes, and the adsorption capacity of the nanoparticles [51]. Non-ionic surfactants, such as Tween, Cremophor[®] EL, and Plurol[®] Oleique, create strong repulsive steric forces or osmotic repulsive forces by forming a barrier around the oil droplet, thus stabilizing the emulsion and preventing droplet aggregation [52].

Morteza-Semnani et al. [48] observed zeta potential values from −0.50 to −6.90 mV for nanoemulgel formulations containing cumin essential oil. Moazeni et al. [44] obtained a zeta potential value of −9.82 mV for *T. vulgaris* essential oil nanoemulsion.

In this study, nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* resulted in pH values of 5.75 and 5.41, respectively. Human skin has a pH ranging between 4.20 and 5.60; therefore, solutions with a pH closer to that of the skin favor nanoparticles penetration, as they can reduce electrostatic forces, thereby facilitating skin permeation [53].

The nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* were investigated for the effects of temperature (4, 25, and 40 °C) and storage time (0, 1, 3, 7, 14, and 30 days) on stability. The changes in droplet size, PDI, zeta potential, and pH values are presented in Figure 1. The droplet size at all storage temperatures increased over time; however, no phase separation was observed, and the droplet sizes of the nanoemulsions remained below 200 nm for 30 days. At a temperature of 25 °C, a smaller change in droplet size was observed, ranging from 73.13 to 103.80 nm for the *P. guajava* nanoemulsion and from 70.26 to 104.7 nm for the *E. uniflora* nanoemulsion. On the other hand, storage at 40 °C showed greater variation in the droplet size of the nanoemulsions over time.

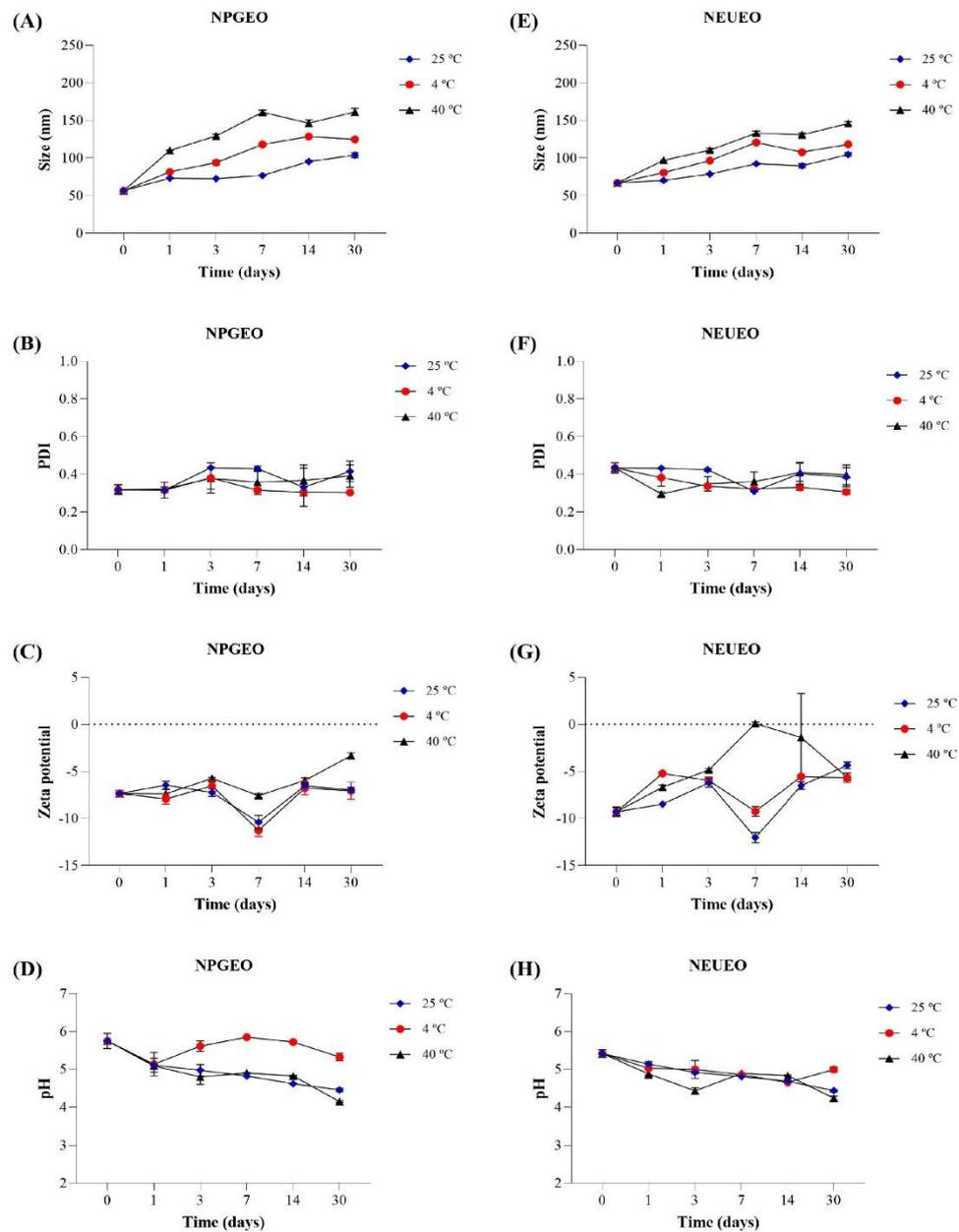


Figure 1. Effects of temperature (4, 25, and 40 °C) and storage time (0, 1, 3, 7, 14, and 30 days) on stability of nanoemulsions of *P. guajava* and *E. uniflora*. (A–D) = stability of nanoemulsion of *P. guajava* essential oil (NPGE0), (A)-nanoemulsion size (nm), (B)-polydispersity index (PDI), (C)-zeta potential, and (D)-pH. (E–H) = stability of nanoemulsion of *E. uniflora* essential oil (NEUEO), (E)-nanoemulsion size (nm), (F)-polydispersity index (PDI), (G)-zeta potential, and (H)-pH. Results are expressed as mean and standard deviation.

The low PDI values of the *E. uniflora* and *P. guajava* nanoemulsions, which remained below 0.50 at all storage temperatures, indicated the size homogeneity of the formulations. The low PDI values of the *E. uniflora* and *P. guajava* nanoemulsions, which remained below 0.50 at all storage temperatures, indicated the size homogeneity of the formulations. Nanoemulsions with low PDI values (<0.50) exhibit a more homogeneous particle distribution, which is crucial for ensuring their stability, as they are less prone to phase separation. A PDI < 0.50 directly impacts the antibacterial activity of nanoemulsions because uniform particles penetrate microbial membranes more easily [54,55]. Additionally, the PDI enhances the diffusion of the nanoemulsion into bacterial cell walls, as smaller and more uniformly sized droplets increase the surface-area-to-volume ratio of the nanoemulsion [56].

The zeta potential exhibited a negative charge, ranging from -7.34 to -6.97 mV at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the *P. guajava* nanoemulsion and from -8.48 to -6.51 mV at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the *E. uniflora* nanoemulsion. At $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the zeta potential showed similar variation to that at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. However, at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, there was a greater variation in the zeta potential of the nanoemulsions.

The electrical properties (zeta potential) have a significant impact on nanoemulsion stability and are influenced by the surfactants used in formulation. While non-ionic surfactants, such as those used in our study (Cremophor[®] EL and Plurol[®] Oleique), are stabilized by dipole interactions and hydrogen bonding with the water hydration layer, as well as by repulsive forces due to steric hindrance, ionic surfactants are additionally stabilized by electrostatic interactions. However, non-ionic surfactants are the first choice in nanoemulsion formulations because, compared to ionic surfactants, they exhibit a safer toxicological profile [57].

According to Somala et al. [58], temperature influences the stability of emulsions, affecting the physical properties of oil, water, and surfactant. The results of the present study indicated a possible loss of stability in nanoemulsions stored at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a period beyond 30 days, while temperatures of 25 and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed better stability for the nanoemulsions over 30 days of storage.

Somala et al. [58] reported similar results for nanoemulsions containing citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil. At a temperature of $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the mean droplet size remained below 200 nm; however, nanoemulsions stored at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ exhibited a larger droplet size, increasing from 79 to 218 nm after 14 days. Yin et al. [59] reported good stability of a nanoemulsion containing mangosteen extract and kojic acid for 42 days at a temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, with a droplet size of 162.9 nm, a PDI of 0.39, and no phase separation.

The stability of nanoemulsions under storage conditions is crucial for practical applications, such as in topical formulations or food systems [60,61]. Additional studies are necessary to evaluate the stability of nanoemulsions when exposed to environmental factors such as light and humidity.

2.3. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of *P. guajava* and *E. uniflora*

The nanoemulsion of *E. uniflora* showed the highest antimicrobial activity of all the tested compounds according to the agar-well diffusion method (Table 5), with inhibition zones ranging from 8.41 to 20.97 mm against all tested microorganisms except for *E. coli*, which showed no inhibition zone for any of the tested compounds. The largest inhibition zones were observed against the yeasts *C. albicans* (20.97 mm) and *C. krusei* (15.20 mm).

The antimicrobial properties of essential oils can be primarily attributed to their ability to interact with biological membranes, affecting membrane potential and, consequently, permeability, nutrient transport, and ion exchange. The small droplets of nanoemulsions enhance the interactions between essential oils and the bacterial cell wall, thereby amplifying their antimicrobial efficacy. Thus, cell rupture is one of the main mechanisms by which nanoemulsions exert their antimicrobial effects. This occurs due to the small droplet

size of the nanoemulsions, which enables rapid diffusion of their compounds into the cell wall, causing cell lysis [62,63]. When essential oils are present in the nanoemulsion composition, they induce morphological changes in cells, such as deformation and leakage of intracellular contents, resulting in cell death [64,65]. Additionally, protein denaturation and alterations in surface hydrophobicity are critical factors in the antimicrobial action of nanoemulsions. Encapsulated essential oils in nanoemulsions lead to protein denaturation in bacterial cells, contributing to the loss of structural integrity and function. This denaturation process is often accompanied by the release of cytoplasmic materials, which is indicative of cell death [63].

Table 5. Antimicrobial activity of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and its nanoemulsions using agar-well diffusion method.

Microorganisms	Zone Diameter (mm)					
	EUEO (Pure)	EUEO (15%)	NEUEO	PGEO (Pure)	PGEO (15%)	NPGEO
<i>S. aureus</i>	8.04 ± 0.25 ^c	9.62 ± 0.34 ^b	8.41 ± 0.96 ^c	9.10 ± 0.19 ^b	10.93 ± 0.60 ^a	8.02 ± 0.33 ^c
<i>E. coli</i>	n	n	n	n	n	n
<i>K. pneumoniae</i>	n	n	15.13 ± 0.45 ^a	n	n	9.97 ± 0.75 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	n	n	9.31 ± 0.39 ^a	n	n	10.05 ± 0.39 ^a
<i>A. baumannii</i>	n	n	10.79 ± 0.34 ^a	n	n	6.06 ± 4.04 ^b
<i>C. albicans</i>	7.78 ± 0.32 ^c	14.30 ± 9.53 ^b	20.97 ± 3.09 ^a	n	n	n
<i>C. krusei</i>	6.67 ± 4.45 ^c	9.40 ± 0.40 ^b	15.20 ± 0.85 ^a	n	n	n

EUEO = *E. uniflora* essential oil; NEUEO = nanoemulsion of *E. uniflora* essential oil; PGEO = *P. guajava* essential oil; NPGEO = nanoemulsion of *P. guajava* essential oil; n = no inhibition zone. Values represent mean ± SD. Different letters within the same line mean significant differences at $p < 0.05$ according to the Tukey test at the 95% confidence level.

Similarly, Jawaid et al. [66] reported that citronella essential oil nanoemulsion showed better zones of inhibition against *S. aureus* and *C. albicans* than citronella essential oil. Hasanshahian et al. [67] also observed smaller inhibition zones against the bacteria *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* for the free essential oil of *Alhagi maurorum* leaves than for the nanoemulsion.

The nanoemulsion of *P. guajava* showed lower antimicrobial activity using the agar-well diffusion method than the nanoemulsion of *E. uniflora*, with inhibition zones ranging from 6.06 to 10.05 mm against the microorganisms *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *S. aureus* and no antimicrobial activity against the yeasts *C. albicans* and *C. krusei*.

The essential oil of *E. uniflora* presented inhibition zones ranging from 6.67 to 14.30 mm against the Gram-positive bacterium *S. aureus* and the yeasts *C. albicans* and *C. krusei*, with no antimicrobial activity observed against the tested Gram-negative bacteria. Similarly, Fidelis et al. [68] reported that the essential oil from *E. uniflora* showed inhibition zones for Gram-positive pathogens such as *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus faecalis*, while no antimicrobial activity was observed against Gram-negative pathogens. Mohamed et al. [69] investigated the antimicrobial activities of the essential oil from *E. uniflora* leaves cultivated in Egypt and found an inhibition zone of 12 mm for the oil diluted to 20% for *C. albicans*. Ferreira et al. [70] analyzed the essential oil from *Eugenia florida* leaves collected in the northern region of Brazil (Magalhães Barata City, Pará State) and obtained inhibition zones ranging from 6 to 8 mm for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. krusei*, and *C. auris*.

In this study, the essential oil of *P. guajava* only showed activity against *S. aureus*, with inhibition zones ranging from 9.10 to 10.93 mm. *P. guajava* essential oils from China showed inhibition halos against different strains of *S. aureus* ranging from 9.00 to 18.60 mm [71].

P. guajava essential oil from the southern region of Brazil (Canelinha City, Santa Catarina State) exhibited an inhibition halo against *S. aureus* of 16.07 mm [5].

It is interesting to note that the essential oils diluted to 15% produced larger inhibition zones than the pure essential oils, indicating a diffusion challenge for lipidic compounds in agar. The nanoemulsions become more soluble in an aqueous medium, which likely contributed to enhancing antimicrobial activity in the agar-well diffusion methodology. Although the agar diffusion methodology is widely used to evaluate the antimicrobial activity of essential oils, it is recommended that this method be complemented by the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), which makes it possible to establish the minimum doses of the compound that have a bacteriostatic and bactericidal effect, respectively [72].

Table 6 presents the MIC and MBC values of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and their nanoemulsions. The nanoemulsion of *E. uniflora* showed lower MIC (0.54–1.22 mg/mL) and MBC (4.84–11.02 mg/mL) values against the yeasts *C. albicans* and *C. krusei* than the essential oil of *E. uniflora*. The nanoemulsion of *P. guajava* showed lower MIC values (1.26 mg/mL) and MBC values (11.35 mg/mL) against *C. krusei* than the essential oil of *P. guajava*, indicating potential for using these nanoemulsions as antifungal agents against these two important human pathogens. Similarly, Jawaaid et al. [66] reported that the nanoemulsion of citronella essential oil showed a lower MIC value (0.13 mg/mL) against *C. albicans* than citronella essential oil (0.25 mg/mL). Moazeni et al. [44] observed that the antifungal activity of a thyme essential oil-based nanoemulsion was higher than that of thyme essential oil against *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*.

Table 6. Minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and their nanoemulsions.

Microorganisms	EUEO		NEUEO		PGEO		NPGEO	
	(mg/mL)							
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	1.95 ^e	17.53 ^b	3.38 ^d	30.46 ^a	1.13 ^f	10.16 ^c	11.34 ^c	>55.00
<i>E. coli</i>	5.84 ^d	52.59 ^a	11.28 ^c	>55.00	0.42 ^f	3.86 ^e	3.52 ^e	31.64 ^b
<i>K. pneumoniae</i>	1.39 ^f	12.49 ^c	8.57 ^d	>55.00	5.65 ^e	50.81 ^a	23.50 ^b	>55.00
<i>A. baumannii</i>	0.25 ^g	2.34 ^e	6.31 ^d	54.81 ^a	1.22 ^f	11.01 ^b	5.95 ^c	53.57 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	5.75 ^e	51.71 ^b	20.08 ^c	>55.00	4.61 ^f	41.49 ^a	8.58 ^d	>55.00
<i>C. albicans</i>	8.50 ^d	>55.00	1.22 ^f	11.02 ^b	5.74 ^e	51.66 ^a	9.07 ^c	>55.00
<i>C. krusei</i>	4.58 ^d	41.19 ^a	0.54 ^g	4.84 ^d	3.48 ^e	31.33 ^b	1.26 ^f	11.35 ^c

EUEO = *E. uniflora* essential oil; NEUEO = nanoemulsion of *E. uniflora* essential oil; PGEO = *P. guajava* essential oil; NPGEO = nanoemulsion of *P. guajava* essential oil; Different letters within the same line mean significant differences at $p < 0.05$ according to the Tukey test at the 95% confidence level.

For the Gram-negative bacteria *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, the essential oil of *E. uniflora* showed the lowest MIC (0.25–1.39 mg/mL) and MBC (2.34–12.49 mg/mL) values among the tested compounds. For the Gram-positive bacterium *S. aureus*, the essential oil of *E. uniflora* presented an MIC value of 1.95 mg/mL and an MBC value of 17.53 mg/mL. Antonelo et al. [73] reported that the essential oil of *E. uniflora* from the southeast region of Brazil (City of Ibiúna, State of São Paulo) showed similar antimicrobial activity when tested against *S. aureus* (MIC of 3.13 mg/mL and MBC of 12.50 mg/mL). Obuotor et al. [74] analyzed the essential oil of *E. uniflora* obtained from leaves collected in Ota, Nigeria, Africa, and obtained the following values: against *S. aureus*, an MIC of 25.00 mg/mL and an MBC of 50.00 mg/mL; against *K. pneumoniae*, an MIC and an MBC of 50.00 mg/mL; and against *P. aeruginosa*, an MIC of 50.00 mg/mL and an MBC of 100.00 mg/mL.

For the Gram-positive bacterium *S. aureus* and the Gram-negative bacterium *E. coli*, the essential oil of *P. guajava* showed the lowest MIC (0.42–1.13 mg/mL) and MBC (3.86–10.16 mg/mL) values among the tested compounds. Hanif et al. [75] reported similar results with the essential oils extracted from the leaves of two *P. guajava* cultivars (white and pink fruits) from the local fields of Faisalabad, Punjab, Pakistan. *P. guajava* essential oils exhibited MIC values of 2.50–3.13 against *S. aureus* and MIC values of 8.50–12.5 mg/mL against *E. coli*.

Thus, in the present study, for the tested bacteria (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, and *E. coli*), the nanoemulsions exhibited higher MIC and MBC values than the essential oils. Nevertheless, the nanoemulsions exhibited MIC values (3.38–20.08 mg/mL against *E. uniflora* and 3.52–23.50 mg/mL against *P. guajava*) comparable to those reported in the literature. Hassanshahian et al. [67] observed that an *A. maurorum* essential oil nanoemulsion had MIC values of 6.25 mg/mL against *S. aureus*, 1.75 against *E. coli*, 12.5 mg/mL against *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, and 25.0 mg/mL for *K. pneumoniae*. Shehabeldine et al. [76] reported that a clove essential oil nanoemulsion had antimicrobial activity values of 1.25 mg/mL against *S. aureus*, 2.50 mg/mL against *E. coli*, and 10 mg/mL against *Klebsiella oxytoca*.

Studies in the literature have reported the synergistic effect of nanoemulsions of essential oils and synthetic antimicrobials. Synergistic interactions enhance antimicrobial and antioxidant activity by utilizing the efficiencies of the combined agents in the best possible manner and thereby result in a severalfold reduction in the required doses of the combined agents. Sharma et al. [77] reported that the synergistic interactions in binary mixtures of essential oils from *Callistemon lanceolatus*, *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Mentha longifolia*, and *Vitex negundo* with synthetic compounds (chloramphenicol and ampicillin) enhanced the antimicrobial activity of the combinations in vitro. The resulting reduction in the effective doses of the synthetic compounds may lower the adverse effects, high costs, toxicity, and multi-drug resistance associated with their large doses when used alone.

Time–growth inhibition assays of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and nanoemulsions against *S. aureus* were evaluated (Figure 2). This test provides information about the dynamic interaction between the antimicrobial agent and the microbial strain. Additionally, the test reveals whether the antimicrobial effect is time-dependent and/or concentration-dependent [72].

The bacterium *S. aureus* presented an initial inoculum size at time 0 of 7.12–7.13 log CFU/g. After 6 h of incubation, at all tested MIC concentrations, the *P. guajava* essential oil showed a count of 5.00–6.34 log CFU/g (Figure 2A), the *P. guajava* nanoemulsion showed a count of 4.70–6.60 log CFU/g (Figure 2B), the *E. uniflora* essential oil showed a count of 5.18–5.95 log CFU/g (Figure 2C), and the *E. uniflora* nanoemulsion showed a count of 5.00–5.81 log CFU/g (Figure 2D), indicating a reduction in the original inoculum size of the bacterium *S. aureus*.

At 6 h, the positive microbial growth control in tests of *P. guajava* essential oil and its nanoemulsion was 8.19–8.35 log CFU/g, and for *E. uniflora* essential oil and its nanoemulsion, the range was 7.74–7.85 log CFU/g. All tested compounds demonstrated a reduction of at least 2.0 log cycles in the *S. aureus* count compared to the positive microbial growth control.

Thus, in the time–growth inhibition assay with the essential oils and nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava*, the bacteriostatic activity (MIC) values of these compounds were used. The results against *S. aureus* demonstrated bacteriostatic activity after 6 h of exposure to the tested compounds, showing antimicrobial activity equivalent to that of the antibiotic oxacillin, which presented values ranging from 4.70 to 6.19 log CFU/g in 6 h.

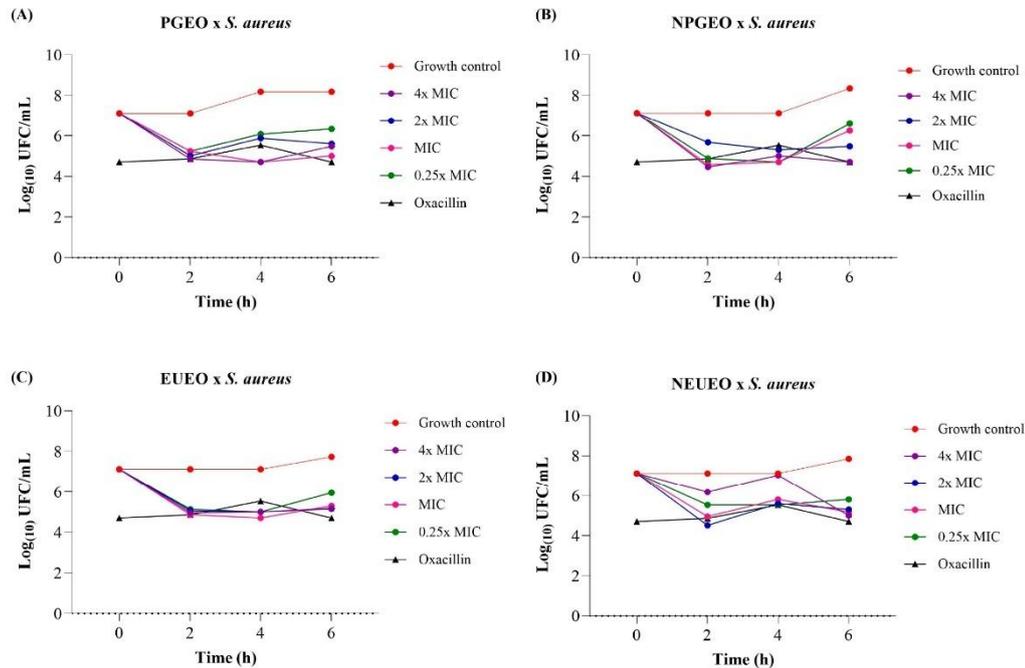


Figure 2. Time–growth inhibition assay of *S. aureus* for different concentrations of (A) *P. guajava* essential oil (PGEO), (B) *P. guajava* nanoemulsion (NPGE), (C) *E. uniflora* essential oil (EUEO), and (D) *E. uniflora* nanoemulsion (NEUEO). Based on the MIC determined for the essential oil and nanoemulsion, the tested concentrations were defined as $4 \times \text{MIC}$, $2 \times \text{MIC}$, MIC, and $0.25 \times \text{MIC}$. The control growth corresponds to positive microbial growth, and the MIC of oxacillin was used as a growth inhibition control.

Similarly, Jawaid et al. [66] reported that *S. aureus* growth was reduced after treatment with citronella essential oil nanoemulsion (from 6.0 to 3.9 log CFU/mL) and citronella essential oil (from 6.0 to 3.3 log CFU/mL), using MIC concentrations of the compounds, after 8 h of exposure. El-Sayed et al. [78] observed a 2.2 log cycle reduction in *S. aureus* count after 3 h of exposure to *T. vulgaris* nanoemulsion at 0.05% concentration, showing a bacteriostatic effect.

Figure 3 presents the time–growth inhibition assays of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and nanoemulsions against *E. coli*, which had an initial inoculum size at time 0 of 7.06 log CFU/g. After 6 h of incubation, at all tested MIC concentrations, the *P. guajava* essential oil showed a count of 6.61–8.07 log CFU/g (Figure 3A), the *P. guajava* nanoemulsion showed a count of 7.38–7.60 log CFU/g (Figure 3B), the *E. uniflora* essential oil showed a count of 7.33–7.73 log CFU/g (Figure 3C), and the *E. uniflora* nanoemulsion showed a count of 4.70–7.88 log CFU/g (Figure 3D), often surpassing the initial inoculum value of 7.06 log CFU/g.

The positive microbial growth control presented values of 9.31–9.34 log CFU/g for the *P. guajava* essential oil and its nanoemulsion and 9.56–9.71 log CFU/g for the *E. uniflora* essential oil and its nanoemulsion after 6 h. The *E. uniflora* nanoemulsion, *P. guajava* essential oil, and *P. guajava* nanoemulsion tested at $4 \times \text{MIC}$ demonstrated a reduction of 5.0, 2.7, and 2.2 log cycles, respectively, in the *E. coli* count compared to the positive microbial growth

control. The other compounds showed a reduction of 1.3 to 1.8 log cycles in the *E. coli* count, indicating that the bacteriostatic activity against *E. coli* was dose-dependent.

The antibiotic cefepime showed a lower microbial count of 4.70 log CFU/g at 6 h compared to most tested compounds. Thus, it can be concluded that the tested compounds were more effective against *S. aureus* than against *E. coli*. El-Sayed et al. [78] observed similar results with the *T. vulgaris* nanoemulsion at a concentration of 0.05%, finding a lower reduction in viable *E. coli* count (0.86 log cycles) than *S. aureus* count, which demonstrated a 2.20 log cycle reduction after 3 h of exposure.

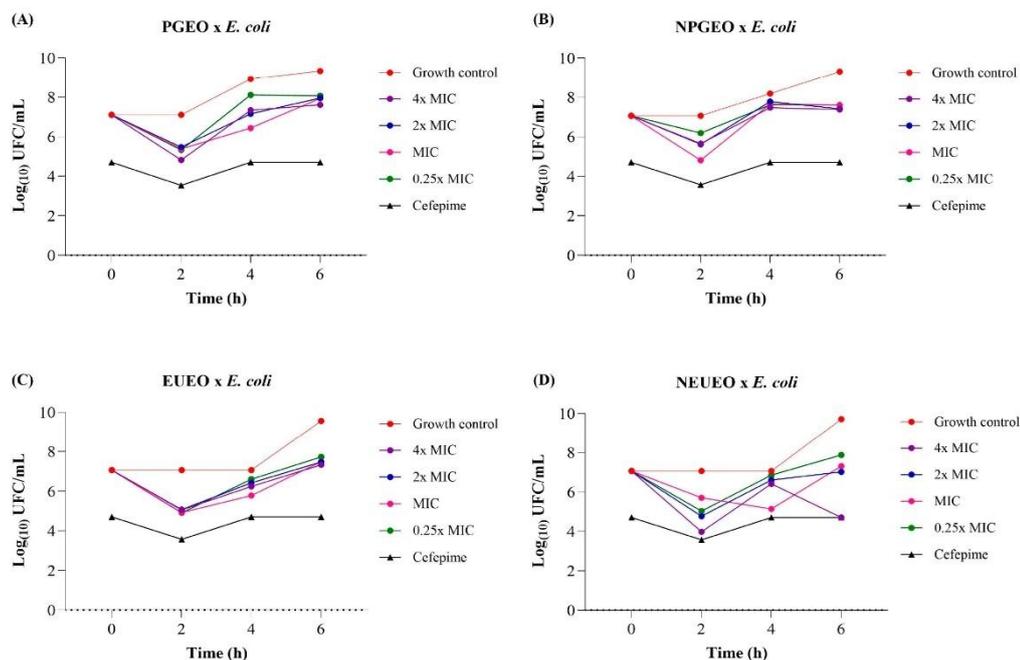


Figure 3. Time-growth inhibition assay of *E. coli* for different concentrations of (A) *P. guajava* essential oil (PGEO), (B) *P. guajava* nanoemulsion (NPGEO), (C) *E. uniflora* essential oil (EUEO), and (D) *E. uniflora* nanoemulsion (NEUEO). Based on the MIC determined for the essential oil and nanoemulsion, the tested concentrations were defined as $4 \times \text{MIC}$, $2 \times \text{MIC}$, MIC , and $0.25 \times \text{MIC}$. The control growth corresponds to positive microbial growth, and the MIC of cefepime was used as a growth inhibition control.

According to Chouhan et al. [72], Gram-positive bacteria are more susceptible to essential oils than Gram-negative bacteria are. This can be attributed to the fact that Gram-negative bacteria possess an outer membrane that is rich in lipopolysaccharides and more complex, limiting the diffusion of hydrophobic compounds through it. In contrast, this complex outer membrane is absent in Gram-positive bacteria, facilitating the access of hydrophobic compounds to the cell membrane. However, the bioactive components present in essential oils can bind to the cell surface and subsequently penetrate the phospholipid bilayer of the cell membrane in Gram-negative bacteria, leading to cell death.

In conclusion, the results of this study showed that, in the agar diffusion method, the *E. uniflora* nanoemulsion demonstrated the highest antimicrobial activity, followed by the *P. guajava* nanoemulsion, both of which outperformed their respective essential oils. The

largest inhibition zones were observed against the yeasts *C. albicans* and *C. krusei* (in the case of the *E. uniflora* nanoemulsion), and inhibition zones were also noted for the Gram-positive bacterium *S. aureus* and the Gram-negative bacteria *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *A. baumannii*. These findings highlight the importance of nanoemulsion formulation in enhancing the aqueous solubility of essential oils.

In the determination of MIC and MBC, the *E. uniflora* nanoemulsion showed the highest antimicrobial activity against the yeasts *C. albicans* and *C. krusei*, while the *P. guajava* nanoemulsion also exhibited low MIC and MBC values for *C. krusei*. However, for the tested bacteria, the essential oils exhibited lower MIC and MBC values than the nanoemulsions. In the microbial growth inhibition assay over time, both the nanoemulsions and essential oils displayed similar behavior, showing a better bacteriostatic effect against the Gram-positive bacterium *S. aureus* than against the Gram-negative bacterium *E. coli*.

Shahabi et al. [79] also reported that the antimicrobial effect of *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion strongly depended on the type of antimicrobial assay, the nanoemulsion concentration, the exposure time, and the type of bacteria tested.

3. Materials and Methods

3.1. Essential Oils of *E. uniflora* and *P. guajava*

Locally produced essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava* with organic certification were purchased from a commercial establishment located in São Paulo, Brazil. Both essential oils were extracted from the leaves using a steam distillation technique according to the manufacturer protocols.

3.2. Identification of Major Volatile Compounds of *E. uniflora* and *P. guajava* Essential Oils

The essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava* were subjected to chemical characterization using gas chromatography coupled with mass spectrometry (Agilent equipment, Model MSD5977B, Santa Clara, CA, USA). The chromatographic analysis parameters were as follows: injector temperature at 280 °C; injection volume: 1 µL; injection mode: split (1:20); flow rate: 1 mL min⁻¹; carrier gas: helium; capillary column: DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm); oven temperature gradient: initial temperature 60 °C, 2 min, rate of 4 °C/min up to 200 °C, and rate of 6 °C/min up to 260 °C, 10 min; mass detector temperature: 260 °C; ion source temperature: 280 °C; acquisition mode: scan. The compounds were identified by comparing the mass spectra of the peaks with those in the NIST17.L library (NIST Chemistry WebBook—webbook.nist.gov), and the similarity degree of each identification is presented in the results. The relative percentage area of each peak was calculated based on the sum of areas of all eluted peaks from the column and originating from the analyzed sample.

3.3. Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *E. uniflora* and *P. guajava* Essential Oils

The total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method [80], and the results were expressed as mg gallic acid equivalent per mL (mg GAE/mL). The antioxidant activity was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay according to Rufino et al. [81] and ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) free radical scavenging assay as described by Rufino et al. [82]. The results were expressed as µmol Trolox equivalents per mL of sample (µmol TE/mL). The Folin–Ciocalteu, DPPH, and ABTS reagents were from Sigma-Aldrich-Merck (Darmstadt, Germany).

3.4. Development of the *P. guajava* and *E. uniflora* Nanoemulsions

The nanoemulsions were prepared using *P. guajava* and *E. uniflora* essential oils at a proportion of 15% (v/v), Cremophor® EL was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and used as a surfactant at a proportion of 30% (v/v), Plurol® Oleique was provided by Gatefossè (Saint-Priest, France) and used as a co-surfactant at a proportion of 5% (v/v), and phosphate buffer was used at pH 5.5 at a proportion of 50% (v/v). A 15% (v/v) concentration of the essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava* was used for the formulation of the nanoemulsions, as it was observed that for both essential oils, this concentration was above the minimum bactericidal concentration for all tested microorganisms. The surfactants were selected according to Cardoso et al. [83], who used Cremophor® EL as a surfactant due to its non-irritant characteristics, combined with Plurol® Oleique, a co-surfactant that reduces the surface tension of the nanoemulsion. The mixtures were homogenized using an ultrasonic processor (Vibra-Cell VC 750, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA). The formulations were sonicated for 20 min at an amplitude of 20%; each cycle consisted of a 30 s pulse on and a 30 s pulse off. During the process, the temperature was controlled using ice around the beaker. Finally, the nanoemulsions were centrifuged at 4000 rotations per minute (rpm) for 10 min to ensure that no phase separation occurred.

3.5. Characterization of *E. uniflora* and *P. guajava* Nanoemulsions

The droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the *P. guajava* and *E. uniflora* nanoemulsions (diluted at a ratio of 1:50 in ultrapure water) were analyzed using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). The droplet size was determined using the dynamic light scattering (DLS) technique, and the zeta potential was measured by electrophoretic mobility. The pH was measured with a digital pH meter (Digimed, model DM-22, São Paulo, Brazil) by directly immersing the electrode in the undiluted nanoemulsion at 25 ± 1 °C.

3.6. Stability Study of *P. guajava* and *E. uniflora* Nanoemulsions

A stability study of *P. guajava* and *E. uniflora* nanoemulsions was carried out for 30 days, with the samples stored in hermetically sealed 15 mL Falcon tubes, under three conditions: room temperature (25 ± 2 °C), refrigerated (4 ± 2 °C), and 40 ± 2 °C. At time intervals of 0, 1, 3, 7, 14, and 30 days of storage, the samples were tested for droplet size, PDI, zeta potential, and pH [84].

3.7. Study of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of *P. guajava* and *E. uniflora*

3.7.1. Microorganisms and Inoculum Preparation

For the determination of antimicrobial activity of the essential oils of *E. uniflora* and *P. guajava* and the nanoemulsions, the following microorganisms were used: Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213), Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, and *Escherichia coli* ATCC 25922), and yeasts (*Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida krusei* ATCC 6258). The bacterial inoculum was prepared through direct suspension of microbial growth in Mueller–Hinton broth (Himedia, Thane, India), with turbidity adjusted between 0.08 and 0.10 on a spectrophotometer (Hitach U-3900H, Tokyo, Japan) at 625 nm (equivalent to the McFarland standard 0.5 and 1.0×10^8 CFU/mL) [85]. For the yeasts, the inoculum was prepared by direct suspension of microbial growth in RPMI broth (Merck, Darmstadt, Germany), and the inoculum was adjusted using a spectrophotometer

(Hitach U-3900H, Tokyo, Japan) to an absorbance between 0.08 and 0.13 at a wavelength of 530 nm [86].

3.7.2. Agar-Well Diffusion Assay

For the comparison of antimicrobial activity between the nanoemulsions and essential oils, the agar-well diffusion method was used, as the paper disk method was not suitable for the diffusion of the nanoemulsions in gel. Additionally, the essential oils were tested pure and diluted to 15% (*v/v*) using Mueller–Hinton broth and 4% Tween 80 (Sigma-Aldrich-Merck, Darmstadt, Germany), allowing for comparison with the nanoemulsions, which were formulated with a 15% concentration of essential oil. Thus, the microbial inoculum was seeded, with the aid of a sterile swab, on the surface of a Mueller–Hinton agar plate (Himedia, Thane, India) until a uniform smear was obtained. After the inoculum dried, 6 mm diameter wells were punched into the plates using a sterile stainless-steel puncher. Following that, 50 μL of each sample was added to the wells. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. At the end of the incubation, the inhibition zones that had formed around the wells were measured in millimeters [87].

3.7.3. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined according to the methodology of the Clinical and Laboratories Standards Institute [85,86]. The microbial inoculum (1.0×10^8 CFU/mL) was diluted in Mueller–Hinton broth (bacterial inoculum) or RPMI broth (yeast inoculum) at a ratio of 1:150, resulting in a concentration of 1.0×10^6 CFU/mL. Then, the essential oil and nanoemulsion samples were diluted at different concentrations (MIC 0.20–25.00 mg/mL and MBC 2.00–55.00 mg/mL) in Mueller–Hinton broth (bacterial inoculum) or RPMI broth (yeast inoculum) using serial dilution. The assays were carried out in 96-well flat-bottom microplates in triplicate. Each well received 100 μL of the diluted sample and 100 μL of the microbial inoculum, resulting in a final inoculum concentration of 1.0×10^5 CFU/mL in a total volume of 200 μL per well. For the positive microbial growth control, each well received 100 μL of broth and 100 μL of microbial inoculum. For the non-growth microbial control, 100 μL of Mueller–Hinton broth (bacterial inoculum) or RPMI broth (yeast inoculum) and 100 μL of the essential oils or nanoemulsions was used. To avoid interference from the coloration of the samples and the broth, 100 μL of Mueller–Hinton or RPMI broth and 100 μL of the essential oils or nanoemulsions were used as blanks. The microplates were incubated at 37 °C for 24 h for bacterial tests and 48 h for yeast tests. Then, the turbidity of each well was read at 620 nm using a Multiskan[®] microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). For the confirmation of the MBC, 100 μL of each sample was seeded on Mueller–Hinton agar plates for 24 h (for bacteria) and on potato dextrose agar (Himedia, Thane, India) for 48 h (for yeasts) at 37 °C. MBC was determined as the lowest concentration that allowed no visible microbial growth in agar. For the confirmation of MIC, 20 μL of resazurin dye (Sigma-Aldrich-Merck, Darmstadt, Germany) at 0.01% (*w/v*) was added to each well containing 100 μL of each sample. Resazurin is a redox indicator used to assess cell viability. Initially non-fluorescent and blue, it turns pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells [88]. The MIC was defined as the lowest concentration at which there was no change in color.

3.8. Time–Kill Kinetics Assays of *E. uniflora* and *P. guajava* Essential Oils and Nanoemulsions

Time–kill kinetics or time–growth inhibition assays of *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils and nanoemulsions were conducted against *S. aureus* and *E. coli*. The bacterial inoculum

(1.0×10^8 CFU/mL) was diluted in Mueller–Hinton broth, resulting in a concentration of 1.0×10^6 CFU/mL. The essential oils and nanoemulsions were tested at concentrations of at $4 \times \text{MIC}$, $2 \times \text{MIC}$, MIC , $0.5 \times \text{MIC}$, and $0.25 \times \text{MIC}$. The assays were carried out in 96-well flat-bottom microplates. Each well received 100 μL of the diluted sample and 100 μL of the microbial inoculum, resulting in a final inoculum concentration of 1.0×10^5 CFU/mL in a total volume of 200 μL per well. For the positive microbial growth control, each well received 100 μL of broth and 100 μL of bacterial inoculum. The MIC of oxacillin was used as a growth inhibition control for *S. aureus*, and the MIC of cefepime was used as a growth inhibition control for *E. coli*. Samples were collected at 0, 2, 4, and 6 h and spread on Mueller–Hinton agar plates, which were then incubated for 24 h at 37 °C. The number of resulting colony-forming units in \log_{10} (\log_{10} CFU/mL) was plotted against time [89].

3.9. Statistics

All analyses were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). All data were treated with the aid of the STATISTICA software version 10.0. Analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences between the analyses, and when differences were statistically significant, Tukey's test for mean comparisons was used.

4. Conclusions

The results of this study demonstrated the promising potential of using *E. uniflora* and *P. guajava* essential oils for the formulation of gel-based nanoemulsions, which exhibited droplet sizes below 200 nm and stability for 30 days under ambient storage conditions. The *E. uniflora* nanoemulsion showed promising antifungal activity against the yeasts *C. albicans* and *C. krusei*, while the *P. guajava* nanoemulsion also exhibited low MIC and MBC values against *C. krusei*. The nanoemulsions developed in this study also demonstrated sufficient inhibitory effects against the tested Gram-negative and Gram-positive bacteria. Further studies are needed to evaluate the cytotoxicity and biocompatibility of gel-based nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* to verify the safety of these formulations for human or animal cells. Therefore, the gel-based nanoemulsions of *E. uniflora* and *P. guajava* can be used as suitable antimicrobial compounds against pathogenic yeasts and bacteria. Future studies will focus on the development of dressings with bacteriostatic effects to aid in the treatment of wounds and burns.

Author Contributions: Conceptualization: R.D.d.S., G.M.G. and D.C.O.; methodology and validation: R.D.d.S., D.O.F., B.N.M., C.A.G.d.C., M.M.d.M., G.M.G. and D.C.O.; investigation and formal analysis: R.D.d.S., F.S.d.S., B.A.d.P., K.O.G., M.O.d.A., C.A.B. and L.F.S.R.; writing—original draft preparation: D.C.O. and R.D.d.S.; writing—review and editing: D.C.O., I.C.R.d.S. and L.C.L.d.S.B.; supervision: G.M.G. and D.C.O.; funding acquisition: D.C.O., L.C.L.d.S.B. and I.C.R.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was partly financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), with Finance Code 001 applying to the scholarships, and by FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (Edital 3/2021)).

Institutional Review Board Statement: The study did not require ethical approval.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy interests.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- da Costa, J.S.; Barroso, A.S.; Mourão, R.H.V.; da Silva, J.K.R.; Maia, J.G.S.; Figueiredo, P.L.B. Seasonal and antioxidant evaluation of essential oil from *Eugenia uniflora* L., curzerene-rich, thermally produced in situ. *Biomolecules* **2020**, *10*, 328. [CrossRef] [PubMed]
- da Silva, A.C.; Navarro, D.M.A.F.; Marques, A.M.; Figueiredo, M.R.; de Aguiar, J.C.R.O.F.; da Câmara, C.A.G.; de Moraes, M.M.; dos Santos, F.H.G.; Santos, E.F.; Vieira, G.J.D.G.; et al. Oviposition deterrent activity of hydrolate, aqueous extract and major constituents of essential oil from the leaves of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) for the control of *Aedes aegypti*. *Ind. Crop Prod.* **2023**, *198*, 116710. [CrossRef]
- de Jesus, E.N.S.; Tavares, M.S.; Barros, P.A.C.; Miller, D.C.; da Silva, P.L.C.; Freitas, J.J.S.; de Lima, A.B.; Setzer, W.N.; da Silva, J.K.R.; Figueiredo, P.L.B. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory activities of the curzerene type essential oil of *Eugenia uniflora* from Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2023**, *317*, 116859. [CrossRef] [PubMed]
- Alam, A.; Jawaid, T.; Alsanad, S.M.; Kamal, M.; Balaha, M.F. Composition, antibacterial efficacy, and anticancer activity of essential oil extracted from *Psidium guajava* (L.) leaves. *Plants* **2023**, *12*, 246. [CrossRef] [PubMed]
- de Souza, W.F.C.; de Lucena, F.A.; de Castro, R.J.S.; de Oliveira, C.P.; Quirino, M.R.; Martins, L.P. Exploiting the chemical composition of essential oils from *Psidium cattleianum* and *Psidium guajava* and its antimicrobial and antioxidant properties. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 4637–4649. [CrossRef] [PubMed]
- Silva, R.C.; Costa, J.S.; Figueiredo, R.O.; Setzer, W.N.; Silva, J.K.R.; Maia, J.G.S.; Figueiredo, P.L.B. Monoterpenes and sesquiterpenes of essential oils from *Psidium* species and their biological properties. *Molecules* **2021**, *26*, 965. [CrossRef] [PubMed]
- Ahmed, S.K.; Hussein, S.; Qurbani, K.; Ibrahim, R.H.; Fareeq, A.; Mahmood, K.A.; Mohamed, M.G. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *J. Med. Surg. Public Health* **2024**, *2*, 100081. [CrossRef]
- Salam, M.A.; Al-Amin, M.Y.; Salam, M.T.; Pawar, J.S.; Akhter, N.; Rabaan, A.A.; Alqumber, M.A.A. Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. *Healthcare* **2023**, *11*, 1946. [CrossRef] [PubMed]
- 9- Ahmad-Mansour, N.; Loubet, P.; Pouget, C.; Dunyach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J.P.; Molle, V. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins* **2021**, *13*, 677. [CrossRef] [PubMed]
- Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [CrossRef]
- Ahuatzin-Flores, O.E.; Torres, E.; Chávez-Bravo, E. *Acinetobacter baumannii*, a multidrug-resistant opportunistic pathogen in new habitats: A systematic review. *Microorganisms* **2024**, *12*, 644. [CrossRef] [PubMed]
- Ashurst, J.V.; Dawson, A. *Klebsiella Pneumonia*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
- Bonten, M.; Johnson, J.R.; van den Biggelaar, A.H.J.; Georgalis, L.; Geurtsen, J.; de Palacios, P.I.; Gravenstein, S.; Verstraeten, T.; Hermans, P.; Poolman, J.T. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: A systematic literature review. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *72*, 1211–1219. [CrossRef]
- Nji, E.; Kazibwe, J.; Hambridge, T.; Joko, C.A.; Larbi, A.A.; Dampney, L.A.O.; Nkansa-Gyamfi, N.A.; Stålsby Lundborg, C.; Lien, T.Q. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3372. [CrossRef]
- Navarro-Arias, M.J.; Hernández-Chávez, M.J.; García-Carnero, L.C.; Amezcua-Hernández, D.G.; Lozoya-Pérez, N.E.; Estrada-Mata, E.; Martínez-Duncker, I.; Franco, B.; Mora-Montes, H.M. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 783–794. [CrossRef] [PubMed]
- Cómez-Gaviria, M.; Mora-Montes, H.M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. *Infect Drug Resist.* **2020**, *13*, 1673–1689. [CrossRef] [PubMed]
- Abdallah, E.M.; Alhatlani, B.Y.; de Paula Menezes, R.; Martins, C.H.G. Back to nature: Medicinal plants as promising sources for antibacterial drugs in the post-antibiotic era. *Plants* **2023**, *12*, 3077. [CrossRef] [PubMed]
- Yammine, J.; Chihib, N.E.; Gharsallaoui, A.; Dumas, E.; Ismail, A.; Karam, L. Essential oils and their active components applied as: Free, encapsulated and in hurdle technology to fight microbial contaminations: A review. *Heliyon* **2022**, *8*, e12472. [CrossRef]
- de Amorim, M.S.; Verdan, M.H.; Oliveira, C.S.; Santos, A.D.C. Essential oils of neotropical *Myrtaceae* species from 2011 until 2023: An update. *Chem. Biodivers.* **2024**, e202401503. [CrossRef] [PubMed]
- Barradas, T.N.; Silva, K.G.d.H.e. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 1153–1171. [CrossRef]
- Weerapol, Y.; Manmuan, S.; Chuenbarn, T.; Limmatvapirat, S.; Tubtimsri, S. Nanoemulsion-based orodispersible film formulation of guava leaf oil for inhibition of oral cancer cells. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2631. [CrossRef] [PubMed]
- Tavares, T.M.B.; Almeida, H.M.D.S.; Lage, M.V.M.; de Carvalho Feitosa, R.; da Silva Júnior, A.A. Nanoemulsions: A promising strategy in the fight against bacterial infections. *Med. Sci. Forum.* **2024**, *24*, 18.
- Hanan, E.; Dar, A.H.; Shams, R.; Goksen, G. New insights into essential oil nano emulsions loaded natural biopolymers recent development, formulation, characterization and packaging applications: A comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *280*, 135751. [CrossRef] [PubMed]

24. Figueiredo, P.L.B.; Pinto, L.C.; da Costa, J.S.; da Silva, A.R.C.; Mourão, R.H.V.; Montenegro, R.C.; da Silva, J.K.R.; Maia, J.G.S. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *232*, 30–38. [CrossRef]
25. Doodman, S.; Saeidi, K.; Lorigooini, Z.; Kiani, M. Chemical composition of essential oils from *Smyrniurn cordifolium* Boiss (Apiaceae) ecotypes. *Biochem. Syst. Ecol.* **2023**, *110*, 104682. [CrossRef]
26. Poudel, D.K.; Ojha, P.K.; Rokaya, A.; Satyal, R.; Satyal, P.; Setzer, W.N. Analysis of volatile constituents in *Curcuma* species, viz. *C. aeruginosa*, *C. zedoaria*, and *C. longa*, from Nepal. *Plants* **2022**, *11*, 1932. [CrossRef]
27. Thin, D.B.; Thinh, B.B.; Hanh, D.H. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from leaves and rhizomes of *Curcuma zedoaria* obtained via supercritical fluid extraction. *Nexo Rev. Cient.* **2022**, *35*, 1091–1098. [CrossRef]
28. dos Santos, F.R.; Rezende, S.R.d.F.; dos Santos, L.V.; da Silva, E.R.M.N.; Caiado, M.S.; de Souza, M.A.A.; Pontes, E.G.; de Carvalho, M.G.; Filho, R.B.; Castro, R.N. Larvicidal and fungicidal activity of the leaf essential oil of five *Myrtaceae* species. *Chem. Biodivers.* **2023**, *20*, e202300823. [CrossRef] [PubMed]
29. Souza, T.S.; Ferreira, M.F.; Menini, L.; Souza, J.R.C.L.; Parreira, L.A.; Cecon, P.R.; Ferreira, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. *Sci. Hortic.* **2017**, *216*, 38–44. [CrossRef]
30. Sarma, N.; Begum, T.; Pandey, S.K.; Gogoi, R.; Munda, S.; Lal, M. Chemical profiling of leaf essential oil of *Lantana camara* Linn. from north-east India. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* **2020**, *23*, 1035–1041. [CrossRef]
31. Hong, M.; Kim, M.; Jang, H.; Bo, S.; Deepa, P.; Sowndhararajan, K.; Kim, S. Multivariate analysis of essential oil composition of *Artemisia annua* L. collected from different locations in Korea. *Molecules* **2023**, *28*, 1131.
32. Chandra, M.; Prakash, O.; Kumar, R.; Bachheti, R.K.; Bhushan, B.; Kumar, M.; Pant, A.K. β -Selinene-rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. *Medicines* **2017**, *4*, 52. [CrossRef]
33. Dahham, S.S.; Tabana, Y.M.; Iqbal, M.A.; Ahamed, M.B.; Ezzat, M.O.; Majid, A.S.; Majid, A.M. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* **2015**, *20*, 29. [CrossRef] [PubMed]
34. Woo, H.J.; Yang, J.Y.; Lee, M.H.; Kim, H.W.; Kwon, H.J.; Park, M.; Kim, S.K.; Park, S.Y.; Kim, S.H.; Kim, J.B. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Helicobacter pylori* infection in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1008. [CrossRef] [PubMed]
35. Toledo, A.G.; de Souza, J.G.D.L.; da Silva, J.P.B.; Favreto, W.A.J.; da Costa, W.F.; Pinto, F.G.D.S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucreta* DC. *Biosci. J.* **2020**, *36*, 568–577. [CrossRef]
36. Abd-ElGawad, A.M.; Elgamal, A.M.; El-Amier, Y.A.; Mohamed, T.A.; El Gendy, A.E.-N.G.; Elshamy, A.I. Chemical Composition, Allelopathic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of sesquiterpenes rich essential oil of *Cleome amblyocarpa* Barratte & Murb. *Plants* **2021**, *10*, 1294. [CrossRef] [PubMed]
37. da Costa, J.S.; da Cruz, E.N.S.; Setzer, W.N.; da Silva, J.K.R.; Maia, J.G.S.; Figueiredo, P.L.B. Essentials oils from Brazilian *Eugenia* and *Syzygium* species and their biological activities. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1155. [CrossRef] [PubMed]
38. Jerônimo, L.B.; da Costa, J.S.; Pinto, L.C.; Montenegro, R.C.; Setzer, W.N.; Mourao, R.H.V.; da Silva, J.K.R.; Maia, J.G.S.; Figueiredo, P.L.B. Antioxidant and cytotoxic activities of Myrtaceae essential oils rich in terpenoids from Brazil. *Nat. Prod. Commun.* **2021**, *16*. [CrossRef]
39. Özgen, P.S.O.; Biltekin, S.N.; İduğ, T.; Macit, C.; Ayrancı, İ.; Çelik, S.A.; Kültür, Ş.; Kan, Y.; Omurtag, G.Z. Chemical composition and in vitro mutagenic, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil from Turkey. *J. Res. Pharm.* **2022**, *26*, 781–789.
40. Mechergui, K.; Jaouadi, W.; Coelho, J.; Khouja, M.L. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *90*, 32–37. [CrossRef]
41. El-Demerdash, F.M.; El-Sayed, R.A.; Abdel-Daim, M.M. *Rosmarinus officinalis* essential oil modulates renal toxicity and oxidative stress induced by potassium dichromate in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2021**, *67*, 126791. [CrossRef] [PubMed]
42. Preeti, S.S.; Malik, R.; Bhatia, S.; Al Harrasi, A.; Rani, C.; Saharan, R.; Kumar, S.G.; Sehrawat, R. Nanoemulsion: An emerging novel technology for improving the bioavailability of drugs. *Scientifica* **2023**, *1*, 6640103. [CrossRef] [PubMed]
43. Naseema, A.; Kovooru, L.; Behera, A.K.; Kumar, K.P.; Srivastava, P. A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *287*, 102318.
44. Moazeni, M.; Davari, A.; Shabanzadeh, S.; Akhtari, J.; Saeedi, M.; Mortyza-Semnani, K.; Abastabar, M.; Nabili, M.; Moghadam, F.H.; Roohi, B.; et al. In vitro antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. *J. Herb. Med.* **2021**, *28*, 100452. [CrossRef]
45. Chu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; Zhang, N.; Xu, T.; Feng, X.; Yang, Y.; Shen, X.; Tang, X. Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. *LWT* **2020**, *122*, 109054. [CrossRef]
46. Ntalli, N.; Zochios, G.; Nikolaou, P.; Winkiel, M.; Petrelli, R.; Bonacucina, G.; Perinelli, D.R.; Spinozzi, E.; Maggi, F.; Benelli, G. *Carlina acaulis* essential oil nanoemulsion for managing *Meloidogyne incognita*. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *193*, 116180. [CrossRef]

47. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [CrossRef]
48. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Akbari, J.; Eghbali, M.; Babaei, A.; Hashemi, S.M.H.; Nokhodchi, A. Development of a novel nanoemulgel formulation containing cumin essential oil as skin permeation enhancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12*, 1455–1465. [CrossRef]
49. Dakhlaoui, S.; Bourgou, S.; Zar Kalai, F.; Hammami, M.; Essafi, M.; Jallouli, S.; Msaada, K. Essential oil and its nanoemulsion of *Eucalyptus cladocalyx*: Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. *Int. J. Environ. Health Res.* **2024**, *34*, 2899–2912. [CrossRef]
50. Soulaïmani, B.; Abbad, I.; Varoni, E.; Iriti, M.; Mezrioui, N.E.; Hassani, L.; Abbad, A. Optimization of antibacterial activity of essential oil mixture obtained from three medicinal plants: Evaluation of synergism with conventional antibiotics and nanoemulsion effectiveness. *S. Afr. J. Bot.* **2022**, *151*, 900–908. [CrossRef]
51. Gurpreet, K.; Singh, S.K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 781–789. [CrossRef]
52. Wu, M.-H.; Yan, H.H.; Chen, Z.-Q.; He, M. Effects of emulsifier type and environmental stress on the stability of curcumin emulsion. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2017**, *38*, 1375–1380. [CrossRef]
53. Naves, L.B.; Dhand, C.; Venugopal, J.R.; Rajamani, L.; Ramakrishna, S.; Almeida, L. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. *Prog. Biomater.* **2017**, *6*, 13–26. [CrossRef] [PubMed]
54. Firoozy, M.; Anarjan, N. Preparation of maltodextrin stabilized α -tocopherol nanoemulsions using solvent-displacement technique. *Food Sci. Technol. Int.* **2019**, *25*, 404–413. [CrossRef] [PubMed]
55. Chookiat, S.; Theansungnoen, T.; Kiattisin, K.; Intharuksa, A. Nanoemulsions containing *Mucuna pruriens* (L.) DC. seed extract for cosmetic applications. *Cosmetics* **2024**, *11*, 29. [CrossRef]
56. Rahman, M.M.; Kotturi, H.; Nikfarjam, S.; Bhargava, K.; Ahsan, N.; Khandaker, M. Antimicrobial activity of polycaprolactone nanofiber coated with lavender and neem oil nanoemulsions against airborne bacteria. *Membranes* **2024**, *14*, 36. [CrossRef] [PubMed]
57. Pavoni, L.; Perinelli, D.R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G.F. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 135. [CrossRef]
58. Somala, N.; Laosinwattana, C.; Teerarak, M. Formulation process, physical stability and herbicidal activities of *Cymbopogon nardus* essential oil-based nanoemulsion. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10280. [CrossRef]
59. Yin, H.A.; Wahab, R.A.; Rehman, G.U.; Abidin, M.H.Z.; Wong, K.Y. A novel water-in-oil-in-water double nanoemulsion of α -mangostin and kojic acid for topical applications. *Arab. J. Sci. Eng.* **2024**, *49*, 9291–9305. [CrossRef]
60. Teng, F.; He, M.; Xu, J.; Chen, F.; Wu, C.; Wang, Z.; Li, Y. Effect of ultrasonication on the stability and storage of soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions. *Sci Rep.* **2020**, *10*, 14010. [CrossRef]
61. Kaur, G.; Panigrahi, C.; Agarwal, S.; Khuntia, A.; Sahoo, M. Recent trends and advancements in nanoemulsions: Production methods, functional properties, applications in food sector, safety and toxicological effects. *Food Phys.* **2024**, *1*, 100024. [CrossRef]
62. Chuesiang, P.; Siripatrawan, U.; Sanguandeeul, R.; McClements, D.J.; McLandsborough, L. Antimicrobial activity of PIT-fabricated cinnamon oil nanoemulsions: Effect of surfactant concentration on morphology of foodborne pathogens. *Food Control.* **2019**, *98*, 405–411. [CrossRef]
63. Amasha, R.H. Inhibition of some multidrug-resistant bacteria using prepared essential oil nanoemulsion formulas and their mode of action. *J. Contemp. Med. Sci.* **2024**, *10*, 142–149. [CrossRef]
64. Pilog, P.; Chuesiang, P.; Mishra, D.K.; Siripatrawan, U. Characteristics and antimicrobial activity of microfluidized clove essential oil nanoemulsion optimized using response surface methodology. *J. Food Process. Preserv.* **2022**, *46*, e16886. [CrossRef]
65. Liu, M.; Pan, Y.; Feng, M.; Guo, W.; Fan, X.; Feng, L.; Huang, J.; Cao, Y. Garlic essential oil in water nanoemulsion prepared by high-power ultrasound: Properties, stability and its antibacterial mechanism against MRSA isolated from pork. *Ultrason Sonochem.* **2022**, *90*, 106201. [CrossRef] [PubMed]
66. Jawaid, T.; Alaseem, A.M.; Khan, M.M.; Mukhtar, B.; Kamal, M.; Anwer, R.; Ahmed, S.; Alam, A. Preparation and evaluation of nanoemulsion of citronella essential oil with improved antimicrobial and anti-cancer properties. *Antibiotics* **2023**, *12*, 478. [CrossRef] [PubMed]
67. Hassanshahian, M.; Saadatfar, A.; Masoumpour, F. Formulation and characterization of nanoemulsion from *Alhagi maurorum* essential oil and study of its antimicrobial, antibiofilm, and plasmid curing activity against antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *J. Environ. Health Sci. Eng.* **2020**, *18*, 1015–1027. [CrossRef] [PubMed]
68. Fidelis, E.M.; Savall, A.S.P.; Pereira, F.O.; Quines, C.B.; Ávila, D.S.; Pinton, S. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15*, 103691.

69. Mohamed, S.; Elsayed, H.; Ibrahim, R.; Kamal, A.; Saleh, M. Chemical profile, anti-inflammatory, and antimicrobial activities of the essential oil and lipoidal matter obtained from two *Eugenia* species cultivated in Egypt. *Egypt. J. Chem.* **2023**, *66*, 849–859. [CrossRef]
70. Ferreira, O.O.; da Silva, S.H.M.; de Oliveira, M.S.; Andrade, E.H.d.A. Chemical composition and antifungal activity of *Myrcia multiflora* and *Eugenia florida* essential oils. *Molecules* **2021**, *26*, 7259. [CrossRef] [PubMed]
71. Wang, L.; Wu, Y.; Huang, T.; Shi, K.; Wu, Z. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Psidium guajava* L. leaves from different geographic regions in China. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700114. [CrossRef] [PubMed]
72. Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines* **2017**, *4*, 58. [CrossRef] [PubMed]
73. Antonelo, F.A.; Rodrigues, M.S.; Cruz, L.C.; Pagnoncelli, M.G.; da Cunha, M.A.A.; Bonatto, S.J.R.; Busso, C.; Júnior, A.W.; Montanher, P.F. Bioactive compounds derived from Brazilian Myrtaceae species: Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2023**, *48*, 102629. [CrossRef]
74. Obuotor, T.M.; Omankhanlen, A.; Lasisi, A.A. Antimicrobial efficacy of the extract, fractions and essential oils from the leaves of *Eugenia uniflora* Linn (Myrtaceae). *Ife J. Sci.* **2017**, *19*, 159–168. [CrossRef]
75. Hanif, M.U.; Hussain, A.I.; Chatha, S.A.S.; Kamal, G.M.; Ahmad, T. Variation in composition and bioactivities of essential oil from leaves of two different cultivars of *Psidium guajava* L. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* **2018**, *21*, 65–76. [CrossRef]
76. Shehabeldine, A.M.; Doghish, A.S.; El-Dakrouy, W.A.; Hassanin, M.M.H.; Al-Askar, A.A.; AbdElgawad, H.; Hashem, A.H. Antimicrobial, antibiofilm, and anticancer activities of *Syzygium aromaticum* essential oil nanoemulsion. *Molecules* **2023**, *28*, 5812. [CrossRef]
77. Sharma, K.; Guleria, S.; Razdan, V.K.; Babu, V. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, 112569. [CrossRef]
78. El-Sayed, S.M.; El-Sayed, H.S. Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. *J. Mater. Res. Technol.* **2021**, *10*, 1029–1041. [CrossRef]
79. Shahabi, N.; Tajik, H.; Moradi, M.; Forough, M.; Ezati, P. Physical, antimicrobial and antibiofilm properties of *Zataria multiflora* Boiss essential oil nanoemulsion. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1645–1652. [CrossRef]
80. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158. [CrossRef]
81. Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.G. *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas Pela Captura do Radical Livre DPPH*, 1st ed.; Comunicado Técnico; Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, CE, Brasil, 2007; pp. 1–4.
82. Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.G. *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas Pela Captura do Radical Livre ABTS*, 1st ed.; Comunicado Técnico; Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, CE, Brasil, 2007; pp. 1–4.
83. Cardoso, C.O.; Ferreira-Nunes, R.; Cunha-Filho, M.; Gratieri, T.; Gelfuso, G.M. In situ gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. *J. Mol. Liq.* **2022**, *360*, 119559. [CrossRef]
84. Brasil. Resolution RDC 318/2019 of the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa). Available online: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=384462> (accessed on 23 December 2024).
85. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M27 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 4th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2017; 46p.
86. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2018; 91p.
87. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; CLSI Document M02-A1; CLSI: Wayne, PA, USA, 2012.
88. Ristivojević, P.; Dimkić, I.; Guzelmeric, E.; Trifković, J.; Knežević, M.; Berić, T.; Yesilada, E.; Milojković-Opsenica, D.; Stanković, S. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. *LWT* **2018**, *95*, 367–379. [CrossRef]
89. Leber, A.L. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2020; pp. 967–978.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.