



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO

**Avaliação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões dos óleos essenciais de
vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*)**

Brasília - DF

2025

BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO

**Avaliação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões dos óleos essenciais de
vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Brasília - DF

2025

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

DD631a Do Prado, Bruno Alcântara
Avaliação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões dos
óleos essenciais de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) e
aroeira (*Schinus terebinthifolius*) / Bruno Alcântara Do
Prado; orientador Daniela Castilho Orsi. Brasília, 2025.
113 p.

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

1. Óleo essencial. 2. Nanoemulsão. 3. Atividade
antimicrobiana. 4. Curva de tempo-morte. I. Orsi, Daniela
Castilho, orient. II. Título.

BRUNO ALCÂNTARA DO PRADO

**Avaliação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões dos óleos essenciais de
vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*)**

Brasília, DF 16 de dezembro de 2025.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (Presidente)
Universidade de Brasília /Faculdade de Ceilândia

Profa. Dra. Vânia Silva Carvalho (membro avaliador)
Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri (membro avaliador)
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris (suplente)
Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, a força maior que comanda o universo e nossas vidas. Agradeço por sempre ter me dado saúde e ânimo para seguir em frente.

Agradeço meus pais, que eu amo tanto, sempre me incentivaram e mostraram a importância dos estudos na vida. A minha mãe, a mulher e rainha da minha vida.

Agradeço a Universidade de Brasília, essa instituição maravilhosa que tem a missão de gerar o conhecimento e que tenho muito orgulho de ter sido estudante.

Agradeço a todos que contribuem para o funcionamento da Universidade.

Agradeço a todos os professores que compartilharam seus conhecimentos para a minha formação.

E por fim, agradeço imensamente pela orientação recebida, a minha orientadora a professora Dra. Daniela Castilho Orsi, simplesmente melhor orientadora e professora da Universidade, sempre disposta a passar seus conhecimentos

RESUMO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido amplamente investigada como alternativa para potencializar a ação de antimicrobianos e contribuir para a redução da resistência bacteriana. Os óleos essenciais de *Chrysopogon zazanioides* (vetiver) e *Schinus terebinthifolius* (aroeira) apresentam composição química complexa, composta por metabólitos secundários com reconhecida atividade antimicrobiana. Esses óleos são substâncias lipofílicas, voláteis e instáveis, podendo perder sua atividade biológica quando expostos ao oxigênio, à luz e a variações de temperatura e pH. A nanoemulsificação surge como uma estratégia eficaz para preservar o princípio ativo, aumentar a estabilidade, melhorar a biodisponibilidade e favorecer a solubilidade em meio aquoso. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de suas nanoemulsões de vetiver e aroeira, bem como realizar a caracterização química dos óleos essenciais. A composição química foi determinada por cromatografia gasosa. As nanoemulsões foram formuladas e caracterizadas quanto ao tamanho das gotículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do método de microdiluição em caldo em caldo, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Ensaios de tempo-morte foram realizados com o óleo essencial de vetiver e sua nanoemulsão frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No óleo essencial de vetiver, os compostos majoritários foram: ácido vetivênico (22,95%), α -vetiveno (7,50%), khusimol (7,42%) e β -vetiveno (5,63%). No óleo essencial de aroeira, predominaram α -felandreno (35,96%), α -pineno (15,41%), limoneno (14,39%) e δ -3-careno (10,70%). As nanoemulsões apresentam tamanhos médios de gotículas de 105,7 nm (aroeira) e 304,7 nm (vetiver), com PDI de 0,20 e 0,32 e potencial zeta de 0,33 mV e -0,82 mV, respectivamente. O óleo essencial de vetiver apresentou elevada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, com destaque para *Bacillus cereus* (CIM 0,10 μ L/mL) e *S. aureus* (CIM 0,40 μ L/mL), e menor atividade frente às Gram-negativas. A nanoemulsão de vetiver potencializou a ação antimicrobiana, reduzindo os valores de CIM para diversas cepas. Resultados semelhantes foram observados para a nanoemulsão de aroeira, que apresentou maior atividade em comparação ao óleo essencial puro. Nos ensaios de tempo-morte, a nanoemulsão de vetiver demonstrou efeito bactericida mais rápido e eficaz, especialmente contra *E.coli*.

Conclui-se que a nanoemulsificação constitui uma alternativa tecnológica viável e eficaz para potencializar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de vetiver e aroeira.

Palavras-chave: óleo essencial de vetiver; óleo essencial de aroeira, nanoemulsão; atividade antibacteriana; Concentração Inibitória Mínima; Concentração Bactericida Mínima; curva de tempo morte.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of essential oils has been widely investigated as an alternative to enhance the action of antimicrobial agents and to contribute to the reduction of bacterial resistance. The essential oils of *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) and *Schinus terebinthifolius* (aroeira) exhibit a complex chemical composition, consisting of secondary metabolites with well-established antimicrobial activity. These oils are lipophilic, volatile, and unstable substances, and may lose their biological activity when exposed to oxygen, light, and variations in temperature and pH. Nanoemulsification emerges as an effective strategy to preserve the active compounds, increase stability, improve bioavailability, and enhance solubility in aqueous media. Therefore, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of vetiver and aroeira essential oils and their respective nanoemulsions, as well as to perform the chemical characterization of the essential oils. Chemical composition was determined by gas chromatography. The nanoemulsions were formulated and characterized in terms of droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta potential. Antimicrobial activity was assessed using the broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Time-kill assays were performed with vetiver essential oil and its nanoemulsion against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In vetiver essential oil, the major compounds were vetivenic acid (22,95%), α -vetivene (7,50%), khusimol (7,42%), and β -vetivene (5,63%). In aroeira essential oil, the predominant compounds were α -phellandrene (35,96%), α -pinene (15,41%), limonene (14,39%), and δ -3-carene (10,70%). The nanoemulsions presented mean droplet sizes of 105,7 nm (Brazilian pepper tree) and 304,7 nm (vetiver), with PDI values of 0,20 and 0,32 and zeta potentials of 0,33 mV and -0,82 mV, respectively. Vetiver essential oil exhibited high antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, particularly *Bacillus cereus* (MIC 0,10 μ L/mL) and *S. aureus* (MIC 0,40 μ L/mL), and lower activity against Gram-negative bacteria. The vetiver nanoemulsion enhanced antimicrobial activity, reducing MIC values for several strains. Similar results were observed for the aroeira oil. In the time-kill assays, the vetiver nanoemulsion demonstrated a faster and more effective bactericidal effect, especially against *E. coli*. It can be concluded that nanoemulsification represents a viable and effective technological alternative to enhance the antimicrobial activity of vetiver and aroeira.

Keywords: vetiver essential oil; aroeira essential oil; nanoemulsion; antibacterial activity; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Bactericidal Concentration; time–kill curve.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana em bactérias.....	19
Figura 2. Mecanismo de ação dos óleos essenciais.....	22
Figura 3. Plantação de vetiver e suas raízes.....	23
Figura 4. Folhas e frutos da aroeira.....	26
Figura 5. Esquema de nanoemulsão óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).....	29
Figura 6. Nanoemulsões a 15% dos óleos essenciais de aroeira, vetiver e nanoemulsão controle de oleato de etila.....	36
Figura 7. Curva de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e sua nanoemulsão para <i>S. aureus</i>	54
Figura 8. Curva de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e sua nanoemulsão para <i>E. coli</i>	56
Figura 9. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para <i>S. aureus</i>	72
Figura 10. Placa de teste curva tempo morte nanoemulsão de vetiver para <i>S. aureus</i>	72
Figura 12. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para <i>E.coli</i>	73
Figura 11. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para <i>E.coli</i>	73
Figura 13. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial e aroeira.....	74
Figura 14. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de vetiver	74
Figura 15. Nanoemulsões produzidas	75

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Composição das nanoemulsões contendo os óleos essenciais.....	35
Tabela 2. Composição química do óleo essencial das raízes de vetiver (<i>C. zizanioides</i>).	40
Tabela 3. Composição química do óleo essencial das folhas de aroeira (<i>S. terebinthifolius</i>).....	43
Tabela 4. Caracterização das nanoemulsões de vetiver e aroeira.....	45
Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais e das nanoemulsões de vetiver e aroeira frente às bactérias testadas.	50

RELAÇÃO DE APÊNDICES

APÊNDICE A	72
APÊNDICE B	73
APÊNDICE C	74
APÊNDICE D	75

RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO 1 - comprovante de submissão do artigo	76
ANEXO 2 – artigo	77

RELAÇÃO DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Símbolo estatístico para desvio padrão, significa mais ou menos
µg/mL	Micrograma po mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
A/O	Água em óleo
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CXE	Etanol expandido com dióxido de carbono
<i>et al.</i>	E colaboradores
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
h	hora
HD	Hidrodestilação
HLB	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
HPC	Equipamento para homogeneização de alta pressão
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITU	Infecção do trato urinário
IVD	Destilação Indireta a Vapor
Log ₁₀ (UFC/mL)	Unidades Formadoras de Colônias, por mililitro, em logaritmo de 10
LPS	Lipopolissacarídeos
m	Metros
ml	Mililitros
MDR	Patógenos multirresistentes

mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL/min ⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
mV	Milivolts
NE-Aro	Nanoemulsão de óleo essencial de aroeira
NE-Vet	Nanoemulsão de óleo essencial de vetiver
nm	Nanômetros
O/A	Óleo em água
°C	Graus célsius
°C/min	Graus célsius por minutos
OEAró	Óleo essencial de aroeira
OEvet	Óleo essencial de vetiver
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
RAM	Resistência antimicrobiana
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFE	Fluido supercrítico
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	18
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.3	ÓLEO ESSENCIAL DE VETIVER (<i>CHRYSOPOGON ZIZANIOIDES</i>)	22
2.3.1	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver	24
2.4	ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA (<i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI</i>).....	25
2.4.1	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de aroeira	27
2.5	SISTEMAS NANOEMULSIONADOS.....	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE AROEIRA E VETIVER.....	33
4.2	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA.....	33
4.2.1	Análise por GC-FID	33
4.2.2	Análise por GC-MS	34
4.2.3	Identificação dos componentes	34
4.3	NANOEMULSÃO CONTENDO OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA	35
4.3.1	Preparo das Nanoemulsões	35
4.3.2	Caracterização das nanoemulsões	36
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA	37
4.4.1	Preparo das amostras e inóculos	37
4.4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	37
4.4.3	Ensaio de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo (<i>Time kill curve</i>) do óleo essencial e da nanoemulsão de vetiver	38
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1	PERFIL FITOQUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA	40
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA..	45
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA	49
5.4	CURVA DE TEMPO MORTE DA NANOEMULSÃO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE VETIVER PARA <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i>	54
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A	72
	APÊNDICE B	73
	APÊNDICE C	74
	ANEXO 1 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	76
	ANEXO 2 - ARTIGO.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são classificados como metabólitos secundários das plantas e são compostos por uma mistura complexa de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, como alcaloides, flavonoides, isoflavonas, monoterpenos, ácidos fenólicos, carotenoides e aldeídos. Os óleos essenciais são produzidos naturalmente por diferentes partes das plantas com a finalidade de defesa contra a ação de agentes externos como a luz UV, animais herbívoros, insetos e patógenos (Dima; Dima, 2015; Seow *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais são conhecidos há décadas por suas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antibacteriana, anticâncer e inseticida (Belhoussaine *et al.*, 2022). Dentre os óleos essenciais com propriedades antimicrobianas, destacam-se a aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e o vetiver (*Chrysopogon zizanioides*). Essas plantas estão amplamente distribuídas no território brasileiro e são tradicionalmente utilizadas na medicina popular por suas reconhecidas propriedades terapêuticas (Jeddi *et al.*, 2023; Ramos *et al.*, 2022).

Já o óleo essencial de aroeira é rico em monoterpenos como δ -3-careno, limoneno, α -felandreno e α -pineno (Costa da Silva *et al.*, 2023). A aroeira é muito utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções bacterianas e estudos recentes também reportaram atividade inseticida e larvicida (Dannenberg *et al.*, 2019). Já o óleo essencial de vetiver possui majoritariamente os compostos sesquiterpenos khusimol, α -vetiveno e β -vetiveno (Lunz e Stappen, 2021). Diversos estudos têm investigado a atividade biológica do óleo essencial de vetiver, demonstrando sua ação antimicrobiana (Kurrimboccus *et al.*, 2021), analgésica, anti-inflamatória (Grover *et al.*, 2021), antifúngica e antioxidante (Jeddi *et al.*, 2023).

Os óleos essenciais possuem em sua composição uma mistura complexa de compostos químicos que apresentam atividade antimicrobiana. No entanto, os óleos essenciais são compostos lipofílicos voláteis e instáveis e quando expostos a oxigênio, luz e alterações de temperatura e pH podem perder a atividade biológica. Uma estratégia para preservar a atividade biológica é a nanoestruturação dos óleos essenciais (Al-Asmari *et al.*, 2024; Maes; Bouquillon; Fauconnier, 2019).

O processo de nanoencapsulamento envolve as partículas do óleo essencial com uma fina cobertura polimérica, gerando a nanopartícula. A técnica de

incorporação em nanopartículas protege os óleos essenciais da degradação ocasionada pelos fatores ambientais, mantendo as propriedades físico-químicas e atividade biológica, bem como promove a liberação controlada do composto ativo elevando seu tempo de ação e potencializando seu efeito biológico (Frank *et al.*, 2015; Maes; Bouquillon; Fauconnier, 2019).

Outra técnica de nanoestruturação consiste na formação de nanoemulsões, que são sistemas coloidais compostos por dois líquidos imiscíveis (geralmente uma fase oleosa e uma fase aquosa) estabilizados por agentes tensoativos. Quando essas fases de polaridades distintas são submetidas a intensa agitação ou a métodos de emulsificação específicos, formam-se gotículas dispersas com diâmetro nanométrico, resultando em um sistema estável denominado nanoemulsão (Al-Asmari *et al.*, 2024; Donsì; Ferrari, 2016).

A resistência antimicrobiana é um problema em todo o mundo, assim, há uma necessidade crescente por novas alternativas terapêuticas para combater os microrganismos resistentes, bem como pela descoberta de novos fármacos antimicrobianos com novas estruturas químicas e mecanismos de ação. Diante disso, há muitas pesquisas explorando o potencial dos produtos naturais como possíveis alternativas terapêuticas para auxiliar no tratamento das infecções causadas por microrganismos resistentes (Kurrimboccus *et al.*, 2021).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PROBLEMA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) tem causado preocupação global devido a sua grande ameaça à saúde humana. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a RAM é prevalente e pode afetar indivíduos de qualquer idade, em qualquer país do mundo. As consequências da RAM incontrolada são abrangentes e extremamente onerosas, não apenas financeiramente, mas também em termos de saúde global, segurança alimentar, bem-estar ambiental e desenvolvimento socioeconômico (Painter *et al.*, 2025).

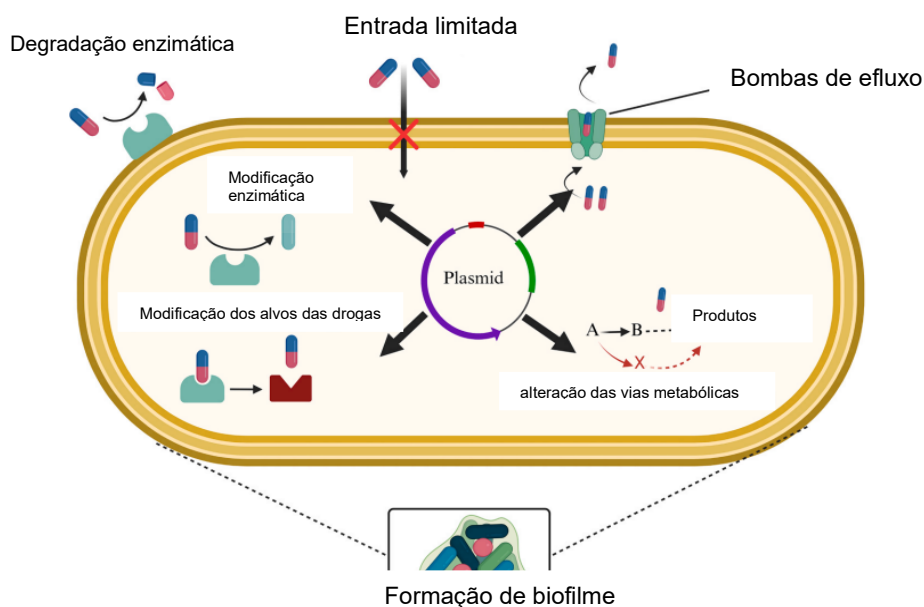
Projeções indicam que, até 2050, na ausência de estratégias eficazes de controle, as infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos poderão resultar em custos de até 10 milhões de dólares. Esse fenômeno é impulsionado por uma combinação de fatores, incluindo o uso inadequado e excessivo de antimicrobianos em ambientes clínicos e agrícolas, medidas inadequadas de controle de infecções hospitalares e o desenvolvimento limitado de novos antimicrobianos (Ahmed *et al.*, 2024; Mancuso *et al.*, 2021; Parvin *et al.*, 2025).

Alguns patógenos descritos como grupo de bactérias “ESKAPE”, incluindo formas resistentes de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, representam as ameaças mais problemáticas que os hospitais enfrentam atualmente (Sakalauskiene *et al.*, 2025).

Os antibióticos apresentam maior facilidade de penetração em bactérias Gram-positivas, uma vez que estas possuem apenas uma espessa camada de peptidoglicano em sua parede celular. Em contrapartida, as Gram-negativas contam com uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos (LPS), que atua como barreira à entrada dos antimicrobianos, conferindo-lhe maior resistência e, muitas vezes, maior patogenicidade. Além dessa resistência intrínseca, as bactérias podem apresentar outros mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos, tais como: ativação de bombas de efluxo, alterações na proteína alvo, inativação dos fármacos por hidrólise enzimática, formação de biofilmes e bloqueio de penetração dos

antibióticos conforme ilustrado na Figura 1. Essas adaptações dos microrganismos diminuem significativamente a eficácia dos tratamentos atuais (Ahmed *et al.*, 2024).

Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana em bactérias.



Fonte: Traduzido de Ahmed *et al.*, 2024.

Com o intuito de superar o desafio da RAM, diversas estratégias terapêuticas têm sido amplamente investigadas, entre elas 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. As nanopartículas podem ser projetadas para comprometer a integridade da parede ou da membrana celular bacteriana, promovendo a eliminação eficiente de cepas resistentes. Nesse contexto, pesquisas recentes têm se dedicado ao estudo de abordagens inovadoras para contornar a RAM e aprimorar a eficácia terapêutica (Lan *et al.*, 2025; Muteeb, 2023).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são extratos líquidos de caráter lipofílico, altamente concentrados e produzidos naturalmente por diferentes partes das plantas, como

folhas, flores, frutos, caules e raízes. Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades aromáticas e medicinais, sendo amplamente utilizados em perfumaria, cosméticos, medicamentos naturais, aromaterapia e até mesmo na indústria alimentícia (Dhifi *et al.*, 2016; Seow *et al.*, 2014).

Atualmente, há mais de 3000 óleos essenciais conhecidos e uma diversidade deles apresenta interesse comercial para a indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e perfumaria (Dima; Dima, 2015). Os óleos essenciais possuem em sua composição uma mistura complexa, podendo conter cerca de 300 compostos químicos que apresentam diversas atividades biológicas (Sell, 2015).

No entanto, os óleos essenciais são compostos lipofílicos voláteis e instáveis e quando expostos a oxigênio, luz e alterações de temperatura e pH, podem perder a atividade biológica. Uma estratégia para preservar a atividade biológica é a micro ou nanoestruturação (Al-Asmari *et al.*, 2024; Maes; Bouquillon; Fauconnier, 2019). O encapsulamento de óleos essenciais representa uma estratégia eficaz e viável a fim de aumentar a sua estabilidade e solubilidade, protegendo-os da degradação por fatores ambientais e melhorando sua atividade biológica (Hill; Gomes; Taylor, 2013).

A constituição química dos óleos essenciais pode variar entre diferentes partes da mesma planta e em função de fatores ambientais, como localização geográfica, condições climáticas, tipos de solo e regime de chuvas, o que impacta diretamente em suas propriedades e usos (Dhifi *et al.*, 2016). Essa variabilidade na composição química dos óleos essenciais faz com que plantas pertencentes a mesma espécie possa apresentar perfis distintos de metabólitos secundários, determinados pelas características ambientais do local de coleta (Zhang *et al.*, 2023). Pacheco *et al.* (2021) identificaram a composição química do óleo essencial dos ramos, folhas, frutos e sementes da aroeira e encontraram distintos compostos químicos em cada parte analisada.

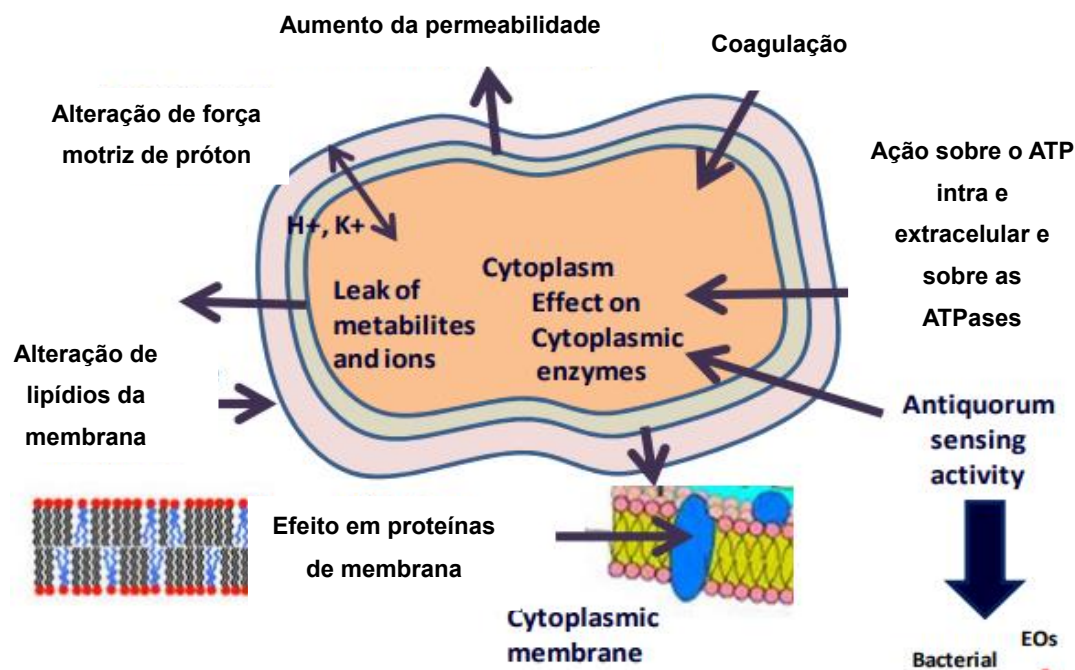
A composição química majoritária dos óleos essenciais são misturas variáveis da classe dos terpenos. Os terpenos e seus derivados oxigenados, denominados terpenoides, constituem uma das mais amplas e diversificadas classes de metabólitos naturais. Sua estrutura resulta da união de múltiplas unidades de isopreno (C₅H₈), sendo classificados em subgrupos conforme a quantidade dessas unidades presentes na molécula. Os monoterpenos, por exemplo, são formados por duas unidades de isopreno, totalizando 10 átomos de carbono, enquanto os sesquiterpenos apresentam três unidades, correspondendo a 15 carbonos. Já os diterpenos, triterpenos e

tetraterpenos (carotenoides) derivam, respectivamente, de quatro, seis e oito unidades de isopreno. É importante destacar que triterpenos e tetrarpenos, por apresentarem elevado peso molecular, não são voláteis e, conseqüentemente, não compõem a fração dos óleos essenciais, estando, no entanto, presentes em extratos vegetais. Exemplos de terpenos comumente presentes em óleos essenciais são p-cimeno, limoneno, sabineno e pineno, entre outros (Chouhan; Sharma; Guleria, 2017).

Existem diversas técnicas para a extração de óleos essenciais, sendo que o método empregado influencia diretamente tanto o rendimento quanto a qualidade do produto. Entre as principais abordagens destacam-se: destilação a vapor, hidroestilação, extração com solventes, extração com fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas (Abd Elhefez, 2022; Swain *et al.*, 2023). A destilação por arraste a vapor é o método mais empregado. O vapor passa pelo material vegetal, promovendo a vaporização dos compostos voláteis, que são posteriormente condensados e retornam ao estado líquido, permitindo a separação do óleo essencial da fração aquosa (Abd Elhefez, 2022).

O mecanismo ação dos óleos essenciais está diretamente relacionado a sua composição química, e sua atividade antimicrobiana não resulta de um único processo, mas sim de uma série de interações que afetam diferentes alvos na célula bacteriana, inibindo tanto o crescimento das bactérias quanto reduzindo a síntese de metabólitos tóxicos. Observa-se, ainda, que a maioria dos óleos essenciais apresenta maior eficácia contra bactérias Gram-positivas do que frente as Gram-negativas, o que se deve, em grande parte, as diferenças estruturais nas membranas celulares. Os mecanismos de ação dos óleos essenciais incluem a degradação da parede celular, dano à membrana citoplasmática, danos às proteínas de membrana, aumento da permeabilidade levando ao vazamento do conteúdo celular, redução da força motriz de próton, redução da síntese de ATP e aumento da hidrólise (Figura 2) (Nazzaro *et al.*, 2013).

Figura 2. Mecanismo de ação dos óleos essenciais.



Fonte: Traduzido de Nazzaro *et al.*, 2013.

2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE VETIVER (*CHRYSOPOGON ZIZANIOIDES*)

O vetiver (*Chrysopogon zizanioides* ou *Vetiveria zizanioides*) (Figura 3) é uma planta nativa de regiões tropicais do norte da Índia, mas é distribuída em outros países onde as condições ambientais são propícias ao seu desenvolvimento, sendo popularmente conhecida como capim-de-cheiro, capim-vetiver e grama-das-índias. O vetiver é uma espécie pertencente à família Poaceae do gênero *Chrysopogon*, que é composto por onze espécies distintas. Essa planta é classificada como uma gramínea perene e apresenta uma densa formação de tufo, tendo uma aparência que se assemelha a do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (Grover *et al.*, 2021; Ramírez-Rueda; Marinho; Salvador, 2019).

Figura 3. Plantação de vetiver e suas raízes.



Fonte: Adaptado de Srivastava *et al.*, 2008.

Notas: plantação de vetiver e raízes de vetiver.

As raízes do vetiver são fortes, esponjosas, aromáticas, distribuídas de maneira densa e compacta, e de onde é produzido o óleo essencial. Essas plantas crescem rapidamente e as raízes podem atingir uma profundidade de até 4 metros no primeiro ano, o que as torna resistentes a longos períodos de seca. Devido as características das raízes, o vetiver é empregado para conservação do solo, e assim, evita a erosão, ajuda na conservação da água e no manejo florestal (Grover *et al.*, 2021).

O óleo essencial de *C. zizanioides* pode apresentar variação quantitativa e qualitativa dos constituintes químicos, dependendo do tipo de solo em que é cultivado, clima, temperatura e condições ambientais (Grover *et al.*, 2021). Champagnat *et al.* (2006) compararam o óleo essencial de vetiver produzido por nove países, e dentre eles o Brasil. A análise reportou 114 compostos, sendo a maior fração de hidrocarbonetos e álcoois e a menor fração de cetonas. Os autores concluíram que os óleos essenciais são relativamente homogêneos com composição majoritária dos compostos khusimol, β -vetiveno e β -vetispireno. O vetiver é muito empregado na perfumaria e cosmética devido as propriedades aromáticas desses compostos.

Champagnat *et al.* (2006) realizaram uma análise comparativa de óleos essenciais comerciais obtidos a partir de amostras de raízes de *C. zizanioides* de nove países diferentes (Brasil, China, Haiti, Índia, Java, Madagascar, México, Ilha da

Reunião e Salvador), sendo que a comparação de 21 estudos sugeriu uma interação significativa entre genótipos e locais de cultivo em rendimentos de óleo essencial, com teores variando de 0,29 a 9,61%. No entanto, a concentração percentual dos compostos variou menos que os rendimentos absolutos, sendo os principais constituintes khusimol (3,4–13,7%), β -vetiveno (2,2–7,1%), vetiselinenol (1,3–7,8%) e α -vetiveno (2,5–6,3%).

2.3.1 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver

O óleo essencial de *C. zizaoides* é utilizado na medicina popular devido às propriedades curativas. A atividade biológica do óleo essencial de *C. zizaoides* demonstra ação antimicrobiana, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante (Grover *et al.*, 2021; Jeddi *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2022).

David *et al.* (2019) compararam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver (OEV) obtido por diferentes métodos de extração: extração expandida de etanol com dióxido de carbono (CXE), extração com fluido supercrítico (SFE), hidrodestilação (HD) e destilação indireta por vapor (IVD). Os óleos essenciais foram testados contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) e bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). O OEV obtido por HD apresentou a maior inibição contra *S. aureus* (CIM = 39 $\mu\text{g/mL}$) e atividade moderada frente a *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (CIM = 312,5 $\mu\text{g/mL}$). Os OEVs obtidos por CXE e SFE também exibiram elevada atividade contra *S. aureus* (CIM = 78 $\mu\text{g/mL}$). De forma semelhante, o OEV extraído por IVD demonstrou maior atividade frente a *S. aureus*, além de *B. subtilis* (CIM = 78 $\mu\text{g/mL}$).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver foi testada frente a bactérias periodonto-patogênicas e demonstrou ótima atividade antibacteriana contra *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, com Concentração Inibitória Mínima entre 22 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e Concentração Bactericida Mínima entre 22 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Os autores concluíram que diante dos resultados, o óleo essencial de vetiver possui potencial para o desenvolvimento de um produto para a higiene bucal (Oliveira *et al.*, 2022).

Kurrimboccus *et al.* (2021) desenvolveram uma loção tópica antiacne de óleo de vetiver emulsionado. A loção apresentou notável atividade antimicrobiana com uma CIM média de 0,14 mg/mL contra *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*. As loções emulsionadas foram desenvolvidas por meio da abordagem do equilíbrio hidrofílico-lipofílico. A loção emulsionada no equilíbrio hidrofílico-lipofílico 9 inibiu completamente o crescimento de *C. acnes* e eliminou *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes* em 24 horas. Além disso, a loção manteve a atividade antimicrobiana contra esses microrganismos testados ao longo do período de teste de estabilidade de 84 dias. Assim, a loção emulsionada com óleo de *C. zizanioides* demonstrou estabilidade física e eficiência antimicrobiana, tornando-se um tratamento viável para acne. Vários óleos essenciais comerciais têm mostrado atividade promissora contra patógenos relacionados à acne. Devido à sua volatilidade e instabilidade térmica, a formulação de óleos essenciais em produtos comerciais continua sendo um desafio farmacêutico.

Kannappan *et al.* (2017) avaliaram um extrato de vetiver contra a formação de biofilme por *S. aureus* metilicina resistente (MRSA). A extração dos componentes da raiz de *C. zizanioides* foi realizada pelo método de extração Soxhlet com uso do solvente diclorometano. O extrato seco foi pesado e dissolvido em metanol para obter a concentração final de 100 mg/mL. O extrato de raiz de *C. zizanioides* mostrou uma redução significativa sobre a formação de biofilme por *S. aureus* MRSA.

2.4 ÓLEO ESSENCIAL DE AROEIRA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI)

A planta *Schinus terebinthifolius* Raddi (Figura 4) é um arbusto pertencente à família Anacardiaceae, nativa da América do Sul. No Brasil, essa planta é conhecida popularmente como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira, e espalha-se de norte a sul ao longo da costa brasileira. Os frutos da aroeira, comumente conhecidos como pimenta-rosa, despertam grande interesse na indústria alimentícia devido ao seu sabor e aroma (El-Nashar *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2016).

Figura 4. Folhas e frutos da aroeira.



Fonte: autoria própria, 2025.

Todas as partes da aroeira, incluindo folhas, cascas, frutos, sementes e resinas têm sido utilizadas por povos indígenas de diferentes regiões e pela medicina popular para diversos fins terapêuticos, como no tratamento de tosse, bronquite, cistite, uretrite, diarreia, febre e processos inflamatórios. Os extratos de aroeira obtidos da casca e das folhas são tradicionalmente empregados no tratamento de infecções (El-Nashar *et al.*, 2022). Além do uso popular, estudos científicos confirmam o potencial farmacológico e a diversidade de atividades biológicas da espécie, destacando efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, anti-histamínicos e antileishmania (Ramos *et al.*, 2022).

O óleo essencial da aroeira pode ser extraído tanto das folhas quanto dos frutos (Dannenberg *et al.*, 2019; Uliana *et al.*, 2016). Belhoussaine *et al.* (2022) reportaram que os óleos essenciais das folhas e frutos de aroeira são ricos em limoneno (14,21–16,99%), germacreno D (11,45–10,85%) e cadineno (9,21–3,31%).

Uliana *et al.* (2016) estudaram a composição química do óleo essencial de *S. terebinthifolius* extraído das folhas frescas e no total, foram identificados 32 compostos que representaram 97,9% da composição do óleo. O composto majoritário identificado no óleo essencial foi 3-careno (68,78%), seguido do e-cariofileno (8,22%), mirceno (6,78%) e pineno (4,05%). Nenaah *et al.* (2021) identificaram no óleo essencial dos frutos da aroeira a presença majoritária de α -pineno, δ -3-careno, α -felandreno e limoneno.

Carvalho *et al.* (2017) obtiveram o óleo essencial de frutos da pimenta rosa (*S. terebinthifolius*) por hidrodestilação com rendimento de 5,3% (m/m) em relação à massa seca dos frutos. Os constituintes do óleo essencial foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama e espectrometria de massas (CG-DIC e CG-EM) e os componentes majoritários encontrados foram: delta-3-careno (40,53%), silvestreno (17,63%), beta-felandreno (14,25%), e alfa-pineno (11,90%).

2.4.1 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de aroeira

A aroeira é amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções do trato urinário (ITU), uma vez que os microrganismos comumente associados a essas infecções apresentam suscetibilidade tanto ao extrato quanto ao óleo essencial da planta. Uliana *et al.* (2016) investigaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e do óleo essencial das folhas de aroeira, na concentração máxima de 1000 µg/mL. O extrato etanólico, testado frente a microrganismos comumente envolvidos em ITU e utilizando o norfloxacino como controle positivo, apresentou atividade contra *S. aureus* (CIM = 500 µg/mL) e *E. coli* (CIM = 250 µg/mL), sendo essa atividade comparável à do norfloxacino, fármaco empregado no tratamento de ITU. Em relação ao óleo essencial, apenas *Candida albicans* demonstrou maior sensibilidade, com valor de CIM de 65 µg/mL, enquanto *E. coli* e *S. aureus* apresentaram maiores valores de CIM de 500 µg/mL e >1000 µg/mL, respectivamente.

A literatura reporta a ação dos extratos e óleo essencial da aroeira contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Martinelli *et al.* (2017) avaliaram a atividade de óleos essenciais de oito espécies de plantas contra várias bactérias. O óleo essencial da aroeira obteve o melhor resultado frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Piras *et al.* (2017) relataram a atividade antifúngica do óleo essencial extraído de folhas e frutos de *S. terebinthifolius* cultivada na Tunísia contra *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans*, com valores de CIM variando entre 0,32 e 0,64 mg/mL. Salem *et al.* (2018) utilizaram óleo essencial (OE), extrato de acetona (ACE) e extrato de n-hexano (HexE) de frutos amadurecidos de *S.*

terebinthifolius. O OE mostrou boa atividade contra *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* com valores CIM de 16 µg/mL e 32 µg/mL e halos de inibição 16,3 mm e 18,6 mm, respectivamente.

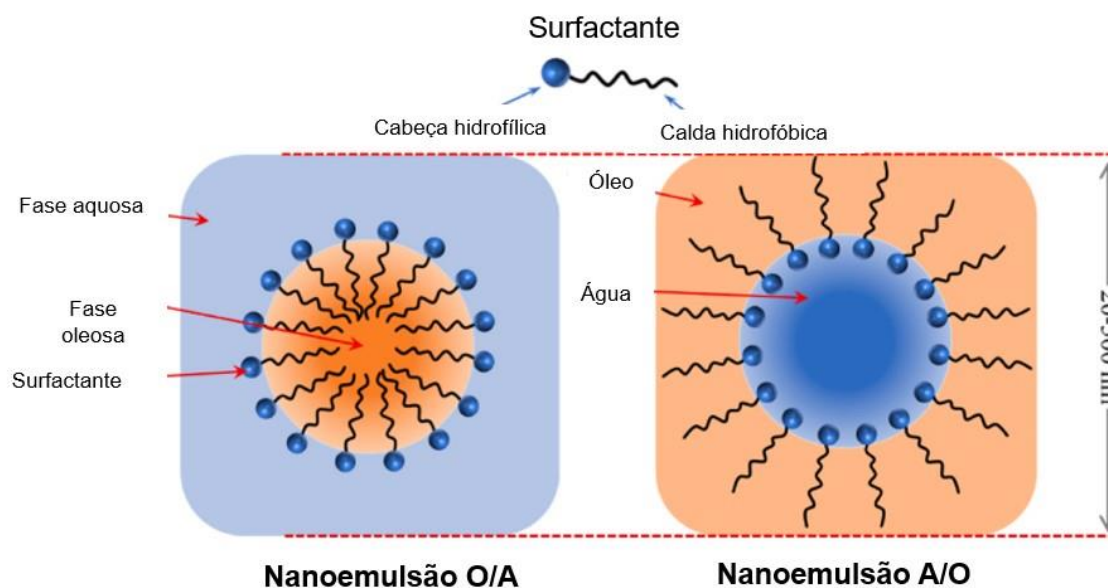
Atualmente, está disponível no mercado como um produto para saúde chamado Kronel[®], que é um gel oriundo do extrato aquoso da casca da *S. terebinthifolius*. É empregado no tratamento de cervicites, vaginites e cervicovaginites, combatendo processos inflamatórios e infecciosos urogenitais (Rosas *et al.*, 2019).

2.5 SISTEMAS NANOEMULSIONADOS

Nanoemulsões são formulações coloidais heterogêneas formadas por dois líquidos imiscíveis, como água e óleo, que apresentam tamanho de gotículas em escala nanométrica (20-500 nm) geralmente estabilizadas por um tensoativo. É um sistema composto por duas fases distintas, um líquido imiscível disperso em gotículas (fase dispersa) dentro de outro líquido (fase contínua). Esse sistema pode ser classificado em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (Figura 5), sendo que emulsões múltiplas do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) também podem ser produzidas, dependendo da fase contínua e da fase dispersa (Das *et al.*, 2022; Yousefi *et al.*, 2024; Tavares *et al.*, 2024).

A estabilidade das nanoemulsões é alcançada com o emprego de surfactantes e co-surfactantes, chamados de tensoativos, que atuam por meio do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLB). A seleção de tensoativos é um aspecto essencial da formulação com características físico-químicas desejadas, pois desempenham um papel fundamental na estabilidade das nanoemulsões, prevenindo fenômenos como floculação e coalescência, que comprometem a estabilidade e características da formulação (Das *et al.*, 2022; Yousefi *et al.*, 2024; Tavares *et al.*, 2024).

Figura 5. Esquema de nanoemulsão óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).



Fonte: Adaptado de Hou e Sheng (2023).

Nanoemulsões podem ser preparadas por método de alta energia e método de baixa energia. De modo geral, os métodos de alta energia envolvem a aplicação de grandes quantidades de energia mecânica, fornecida por dispositivos específicos, como geradores ultrassônicos, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão. Esses equipamentos promovem a ruptura da interface óleo-água por meio de intensas forças de cisalhamento, fragmentando gotículas maiores em menores, resultando em uma emulsão de tamanho nanométrico. A abordagem de baixa energia emprega a energia química e/ou física armazenada nos componentes das soluções, envolve a temperatura ou composição do sistema que faz com que gotículas maiores sejam reduzidas à medida que passam por um estado de baixa tensão superficial durante essa alteração do sistema (Begum *et al.*, 2024; Hou e Sheng, 2023).

Após a formulação da nanoemulsão, a caracterização é fundamental para avaliar sua qualidade, tamanho das partículas, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (Hanan *et al.*, 2024).

O PDI é um parâmetro que indica a homogeneidade da distribuição do tamanho das partículas. O valor numérico de PDI varia de 0 a 1,0 e um valor de PDI está entre 0 - 0,30 indica que o sistema de nanoemulsão está uniformemente disperso. Valores de PDI inferiores a 0,30 são, geralmente, considerados aceitáveis e indicam uma distribuição monodispersa, característica desejável para formulações mais estáveis. Valores elevados de PDI >0,50 indicam uma ampla variação no tamanho das

gotículas, o que pode comprometer a estabilidade da nanoemulsões (Danaei *et al.*, 2018).

Já o potencial Zeta é uma métrica que dosa a carga superficial das partículas e está diretamente relacionado à estabilidade eletrostática do sistema. Valores absolutos de potencial Zeta superiores a ± 30 mV são indicativos de boa estabilidade. Valores elevados de potencial Zeta (tanto positivo quanto negativo) levam à repulsão eletrostática entre as partículas, o que previne a coalescência entre elas e a sedimentação. Potenciais Zeta baixos podem favorecer a agregação e a instabilidade do sistema (Singh e Pulikkal, 2022).

O tamanho médio das gotículas é uma das propriedades mais relevantes das nanoemulsões, pois influencia diretamente a estabilidade do sistema, a liberação do princípio ativo e a penetração em tecidos biológicos. Partículas de menor diâmetro apresentam maior resistência à sedimentação gravitacional, o que contribui para a estabilidade da formulação. Em geral, as nanoemulsões apresentam tamanhos de partícula variando entre 20 e 500 nm, valores que podem se alterar conforme a composição e o método de preparo da nanoemulsão (Kumar, Kanwar e Mehta, 2025).

As nanoemulsões têm ganhado espaço na indústria farmacêutica, cosmética e de alimento devido à sua versatilidade e capacidade carreadora de medicamentos e compostos bioativos. Elas têm sido aplicadas com sucesso em formulações orais e parenterais, bem como em terapias transdérmicas, oftálmicas e direcionadas ao câncer (Mishra *et al.*, 2025). Li *et al.* (2025) produziram uma formulação cosmética contendo nanoemulsões de Hydroxypinacolone Retinoate (HPR) que é um ingrediente com grande potencial no combate aos efeitos do envelhecimento, mas sua formulação costuma ser instável. A encapsulação resultou em maior estabilidade e biodisponibilidade do HPR. Zhu *et al.* (2025) desenvolveram um filme de revestimento com nanoemulsão de óleo essencial de orégano que prolongou a vida útil de carne suína.

Recentemente, tem ocorrido crescente interesse na utilização de óleos essenciais, devido às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, a incorporação desses óleos essenciais em formulações é limitada por fatores como lipofilicidade, baixa solubilidade e reduzida permeabilidade intracelular (Barradas, De Holanda e Silva, 2020). Nesse contexto, a técnica de nanoemulsão tem se mostrado uma alternativa promissora para contornar essas limitações, pois atua como um nanocarreador eficiente de compostos bioativos,

oferecendo vantagens como aumento da solubilidade, proteção do princípio ativo, controle da liberação e potencial incremento da penetração em barreiras biológicas. Além disso, as nanoemulsões apresentam grande área superficial devido ao tamanho nanométrico das gotículas, o que contribui para o aumento da solubilidade e, conseqüentemente, para maior biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água (Bolgen *et al.*, 2025; Kayiran *et al.*, 2025).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar o perfil químico dos óleos essenciais por análise cromatográfica (Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama (GC-FID) e Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS));
- Desenvolver nanoemulsões incorporando os óleos essenciais de aroeira e vetiver;
- Realizar a caracterização (tamanho das gotas, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH) das nanoemulsões;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais e nanoemulsões;
- Realizar os ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo do óleo essencial com maior atividade antimicrobiana (vetiver) e de sua nanoemulsão contra *Staphylococcus aureus* e *Echerichi coli*.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE AROEIRA E VETIVER

O óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* foi adquirido de uma marca comercial pertencente a uma empresa localizada em Santa Catarina, região Sul do Brasil, com produção local das plantas. O óleo essencial de aroeira foi extraído por arraste a vapor a partir das folhas, de acordo com os protocolos do fabricante. O óleo essencial de *Chrysopogon zizanioides* também foi obtido de uma marca comercial de uma empresa brasileira; contudo, as plantas utilizadas foram cultivadas no Haiti, e a extração do óleo essencial de vetiver foi realizada a partir das raízes por destilação com arraste a vapor, seguindo os protocolos do fabricante.

4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA

4.2.1 Análise por GC-FID

A análise quantitativa por cromatografia gasosa (GC-FID) foi realizada utilizando um equipamento PerkinElmer Clarus 500 GC, equipado com detector de ionização por chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida não polar DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (J & W Scientific). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 °C. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, com vazão de 1 mL min⁻¹, no modo *split* (1:30). O volume de injeção foi de 1,0 µL de uma solução diluída (1/100) do óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas dos picos obtidos por GC-FID, na ordem de eluição na coluna DB-5, e expressa como porcentagem relativa da área total dos cromatogramas.

4.2.2 Análise por GC-MS

A análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi realizada em um sistema Shimadzu GC-MS QP2010 SE Plus, equipado com detector seletivo de massas, utilizando ionização por impacto eletrônico (EI) a 70 eV, com intervalo de varredura de 0,5 s e fragmentos de 40 a 550 Da. O sistema utilizou a mesma coluna e o mesmo programa de temperatura empregado na análise por GC-FID, com os seguintes parâmetros: gás de arraste = hélio; vazão = 1 mL min⁻¹; modo *split* (1:30); e volume de injeção = 1 µL de uma solução diluída (1/100) do óleo em n-hexano, injetada automaticamente pelo amostrador AOC-20i.

4.2.3 Identificação dos componentes

A identificação dos componentes foi baseada nos índices de retenção obtidos por GC-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos C8–C40, calculados segundo a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool & Kratz, 1963). A identificação também foi confirmada por comparação com bibliotecas espectrais de massas do sistema GC-MS (NIST 14 e WILEY 14^a edição), co-injeção com padrões autênticos e comparação com espectros de massas publicados (Adams, 2017). As porcentagens das áreas foram obtidas a partir das respostas do GC-FID, sem o uso de padrão interno ou fatores de correção.

4.3 NANOEMULSÃO CONTENDO OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA

4.3.1 Preparo das Nanoemulsões

O preparo das nanoemulsões foi realizado com base no método descrito por Ferreira-Nunes *et al.* (2018), com adaptações. Foram utilizados os óleos essenciais de aroeira e vetiver como fase oleosa, sendo pesada uma alíquota correspondente a 15% do total. Os surfactantes Labrasol® e Plurol® Oleique (Gattefossé, Saint-Priest, França) foram misturados na proporção 4:1 (m/m) sob agitação vigorosa, atuando como surfactante e co-surfactante, respectivamente; assim, foi pesada uma alíquota correspondente a 42% dessa mistura. Após a homogeneização, a mistura de surfactantes foi incorporada à fase oleosa, gota a gota, sob agitação vigorosa. Posteriormente, a mistura de óleo essencial, surfactante e co-surfactante foi titulada continuamente, gota a gota, em água ultrapura sob agitação em vórtice (1000 rpm) por 10 minutos. Uma formulação controle contendo 10% de oleato de etila (Merck, Alemanha) foi preparada para fins de comparação dos parâmetros, nas mesmas condições. As concentrações de cada constituinte estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das nanoemulsões contendo os óleos essenciais

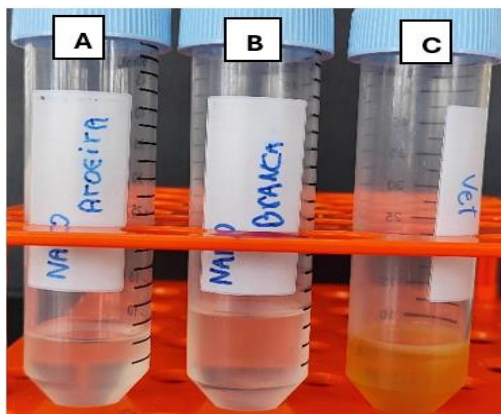
Nanoemulsão	Composição (g)		
	óleo	Labrasol + Plurol	água
aroeira	2,25 (15%)	6,30 (42%)	6,45 (43%)
vetiver	2,25 (15%)	6,30 (42%)	6,45 (43%)
controle	1,65 (10%)	6,30 (42%)	6,45 (43%)

Fonte: Autoria própria, 2025.

As formulações foram colocadas em um béquer e homogeneizadas por meio de um processador ultrassônico (Vibra-Cell VC 750 - Sonics & Materials, Inc., Newtown, EUA) com sonicação por 10 min, onde, cada ciclo consistiu em pulsos de 30 s ligados e de 30 s desligados, como descrito por Prakash *et al.* (2019). Para o controle do calor gerado durante o processo de sonicação, foi colocado um recipiente

com gelo sob o frasco com as amostras. Após o preparo, as nanoemulsões foram mantidas sob refrigeração.

Figura 6. Nanoemulsões a 15% dos óleos essenciais de aroeira, vetiver e nanoemulsão controle de oleato de etila.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: A) nanoemulsão de aroeira; B) nanoemulsão de oleato de etila e C) nanoemulsão de vetiver.

4.3.2 Caracterização das nanoemulsões

O tamanho das partículas (diâmetro), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta foram mensurados utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). As análises foram feitas com 1 mL de cada nanoemulsão diluída logo após o preparo. Para as análises, uma alíquota de 20 μL das nanoemulsões foi diluída 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 valor de pH foi mensurado por pHmetro digital, previamente calibrado com solução de calibração imergindo a ponta dos eletrodos no recipiente com as nanoemulsões, em temperatura ambiente (27°C). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA

4.4.1 Preparo das amostras e inóculos

Foram utilizadas as cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Gram-positivas) e *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* INCQS 00236 (Gram-negativas). As bactérias foram cultivadas em estufa bacteriológica a 37 °C, em ágar sangue, por 24 horas antes dos ensaios. O inóculo bacteriano foi elaborado com turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC/mL), ajustado entre 0,08 e 0,10 na densidade óptica de 625 nm no espectrofotômetro usando 0,85% (m/v) de salina estéril. Em seguida, o inóculo bacteriano foi diluído a 1:100 em caldo Muller Hinton, obtendo-se concentração de 10^6 UFC/mL. Os óleos essenciais e as nanoemulsões foram diluídos em caldo Mueller Hinton (MH) obtendo-se uma solução padrão a uma concentração de 10% (100 μ L/mL). Para os óleos essenciais, adicionou-se 2% de Tween 20 (Vetec[®]) para melhorar a solubilidade. Uma nanoemulsão com oleato de etila incorporado foi preparada nas mesmas condições, como controle negativo de atividade antimicrobiana, a fim de verificar uma possível atividade antimicrobiana dos excipientes da formulação.

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

A atividade de CIM e CBM dos óleos essenciais e das nanoemulsões foram realizadas empregando-se o método de microdiluição em caldo, conforme recomendação do *Clinical and Laboratories Standards Institute* (CLSI, 2023), com adaptações. A solução padrão de cada óleo essencial e nanoemulsão foram diluídas em diferentes concentrações em caldo Mueller- Hinton por diluição seriada (100 μ L/mL

a 0,4 µL/mL). O volume de 0,1 mL das suspensões de inóculo a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL foi distribuído em uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 0,1 mL das diferentes concentrações de amostras, resultando em uma concentração bacteriana final de 10^5 UFC/mL. Para determinar a CIM, o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de 20 µL de corante resazurina (0,01% p/v) a cada poço. A resazurina é um indicador de oxirredução usado para avaliar o crescimento celular. Possui uma cor azul não fluorescente que se torna rosa e fluorescente quando reduzida a resorufina por oxidoredutases dentro de células viáveis (Sarker *et al.*, 2007). A menor concentração de óleo essencial que não apresentou alteração na cor foi definida como CIM, ou seja, os valores de CIM foram definidos como a menor concentração de um determinado óleo essencial que inibiu o crescimento bacteriano. Para determinar a CBM, alíquotas de 10 µL de cada amostra incubada foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton por 24 h, a 37°C. A CBM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial que não permitiu o crescimento bacteriano visível no ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração testada.

4.4.3 Ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo (*Time kill curve*) do óleo essencial e da nanoemulsão de vetiver

Os ensaios de inibição do crescimento microbiano ao longo do tempo (*Time-kill curve*) do óleo essencial de vetiver e da nanoemulsão foram realizados contra *S. aureus* e *E. coli*. Os óleos essenciais e as nanoemulsões foram testados em concentrações de $4,00 \times \text{CIM}$, $2,00 \times \text{CIM}$, $1,00 \times \text{CIM}$, $0,50 \times \text{CIM}$ 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 10^5 UFC/mL e um volume total de 200 µL por poço. Para o controle de crescimento microbiano, cada poço recebeu 100 µL de caldo e 100 µL de inóculo bacteriano. Foi usado como um controle negativo de atividade antimicrobiana a nanoemulsão com oleato de etila, a fim de verificar se os componentes da formulação interferem na ação antimicrobiana. As amostras foram coletadas em 0, 2, 4, 6, 8, 18 e 24 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).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com auxílio do software STATISTICA[®], versão 10.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para detectar diferenças significativas entre as médias e, quando as diferenças foram estatisticamente significativas, o teste de Tukey foi aplicado para as comparações da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VETIVER E AROEIRA

A Tabela 2 apresenta a composição química do óleo essencial de vetiver. Foram identificados 52 compostos sesquiterpenos, que correspondem a 96,63% da composição total do óleo essencial. Os principais sesquiterpenos foram: ácido vetivênico (22,95%), α -vetiveno (7,50%), khusimol (7,42%) e β -vetiveno (5,63%).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial das raízes de vetiver (*C. zizanioides*)
(*Continua*)

Compostos	Classe	IR calculado	IR Literatura	%
Silphiperfol-5,7(14)-diene	Sesquiterpeno	1360	1358	0,28
Y α -langene	Sesquiterpeno	1374	1373	0,18
β -Bourbonene	Sesquiterpeno	1389	1387	0,27
β -Elemene	Sesquiterpeno	1392	1389	0,28
α -Cedrene	Sesquiterpeno	1412	1410	0,06
Funebrene < β ->	Sesquiterpeno	1416	1413	0,14
Copaene< β ->	Sesquiterpeno	1433	1430	0,17
Ambrinol <cis- α ->	Sesquiterpeno	1442	1439	0,28
Prezizaene	Sesquiterpeno	1446	1444	0,99
Khusimene	Sesquiterpeno	1456	1453	0,80
Aromadendrene <allo->	Sesquiterpeno	1460	1458	0,61
Muurolene < γ ->	Sesquiterpeno	1479	1478	1,01
Amorphene < α ->	Sesquiterpeno	1484	1483	2,49
Eudesma-6,11-diene <cis->	Sesquiterpeno	1493	1489	2,66
Vetispirene < β ->	Sesquiterpeno	1494	1493	2,25
Amorphene < γ ->	Sesquiterpeno	1495	1495	0,71
Nootkatene	Sesquiterpeno	1519	1517	0,57
7-epi- α -Selinene <>	Sesquiterpeno	1520	1520	0,66

Calamenene <trans->	Sesquiterpeno	1525	1521	0,39
γ -Vetivenene	Sesquiterpeno	1534	1531	1,63
α -Copaen-11-ol	Sesquiterpeno	1542	1539	0,24
α -Calacorene	Sesquiterpeno	1547	1544	0,73
Selina-3,7(11)-diene	Sesquiterpeno	1549	1545	0,21
Elemol	Sesquiterpeno	1548	1548	2,20
β -Vetivenene	Sesquiterpeno	1555	1554	2,33
Maaliol	Sesquiterpeno	1569	1566	0,07
Germacrene D-4-ol	Sesquiterpeno	1579	1574	0,48
Thujopsan-2- α -ol	Sesquiterpeno	1588	1586	0,38
Thujopsan-2- β -ol	Sesquiterpeno	1589	1588	0,30
cis- β -Elemenone	Sesquiterpeno	1590	1589	0,82
Globulol	Sesquiterpeno	1591	1590	3,05
Viridiflorol	Sesquiterpeno	1594	1592	1,62
Fokienol	Sesquiterpeno	1598	1596	0,47
Guaiol	Sesquiterpeno	1603	1600	2,25
Aromadendrene epoxide	Sesquiterpeno	1644	1639	2,64
<allo->				
elin-11-en-4- α -ol	Sesquiterpeno	1661	1658	0,92
epi-Zizanone	Sesquiterpeno	1671	1668	1,25
Ishwarone	Sesquiterpeno	1684	1680	0,93
Germacrone	Sesquiterpeno	1695	1693	0,69
Eudesm-7(11)-en-4-ol	Sesquiterpeno	1706	1700	1,17
Guaiol acetate	Sesquiterpeno	1727	1725	0,83
Vetiselinenol	Sesquiterpeno	1733	1730	3,10
Khusimol	Sesquiterpeno	1744	1741	7,42
(E)-Isovalencenol	Sesquiterpeno	1796	1793	5,56
Amorpha-4,7(11)-diene<2- α - acetox>	Sesquiterpeno	1809	1805	1,72
Vetivenic acid	Sesquiterpeno	1816	1811	22,90
β -Vetivone	Sesquiterpeno	1825	1822	5,63
Khusinol acetate	Sesquiterpeno	1828	1823	0,66
α -Vetivone	Sesquiterpeno	1845	1842	7,50

α -Chenopodiol	Sesquiterpeno	1859	1855	0,27
cis-Thujopsenic acid	Sesquiterpeno	1867	1863	0,88
Flourensadiol	Sesquiterpeno	1872	1869	0,93
Total de sesquiterpenos (%)				96,30

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: IR: Índice de Retenção.

O perfil químico do óleo essencial de vetiver obtido neste estudo se assemelhou aos resultados relatados por Burger *et al.* (2017), que analisaram três óleos essenciais de vetiver comerciais adquiridos na cooperativa agrícola de óleos essenciais da Ilha Reunião, que fica localizada no Oceano Índico e pertence a França e os principais compostos identificados foram α -vetiveno (8,4–13,3%), khusimol (0,6–8,9%) e β -vetiveno (2,2–3,7%). Kurrimboccus *et al.* (2021) relataram como constituintes majoritários do óleo comercial de vetiver ácido khusenico (15,87%), khusimol (7,93%), isovalencenol (7,39%) e α -vetiveno (3,73%).

Lunz e Stappen (2021) realizaram uma análise comparativa de óleos essenciais comerciais obtidos a partir de amostras de raízes de *C. zizanioides* de nove países diferentes (Brasil, China, Haiti, Índia, Java, Madagascar, México, Reunião e Salvador), sendo os principais constituintes khusimol (3,4–13,7%), β -vetiveno (2,2–7,1%), vetiselinol (1,3–7,8%) e α -vetiveno (2,5–6,3%).

A Tabela 3 apresenta a composição química do óleo essencial de aroeira (*S. terebinthifolius*). No total, 19 compostos foram identificados, incluindo 5 sesquiterpenos (6,24%) e 14 monoterpenos (90,54%), que representaram o total 96,78% do óleo essencial. Os constituintes químicos mais abundantes foram os monoterpenos: α -felandreno (35,96%), α -pineno (15,41%), limoneno (14,39%) e δ -3-careno (10,70%).

Outros estudos na literatura reportaram resultados similares para os compostos majoritários identificados no óleo essencial das folhas e dos frutos da aroeira. Ribeiro e colaboradores (2025) analisaram o óleo essencial de frutos de aroeira oriundos da região sudeste do Brasil (São Mateus, Espírito Santo) e os constituintes majoritários foram δ -3-careno (42,49%), limoneno (15,37%), α -felandreno (14,68%) e α -pineno (10,29%). Ennigrou *et al.* (2018) relataram como compostos majoritários do óleo essencial das folhas de aroeira (região de Al Ghazala, Ariana, norte da Tunísia), α -felandreno (33,10%), α -pineno (15,20%), limoneno

(6,60%) e β -felandreno (4,80%). Enquanto, Cole *et al.* (2014) identificaram no óleo essencial dos frutos da aroeira coletados no Brasil (Vitória, Espírito Santo) como os principais componentes δ -3-careno (30,37%), seguido do limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%) e α -pineno (12,59%).

Tabela 3. Composição química do óleo essencial das folhas de aroeira (*S. terebinthifolius*)

Compostos	Classe	IR calculado	IR literatura	%
α -Thujene	Monoterpeno	920	924	0,51
α -pinene	Monoterpeno	930	932	15,41
α -Fenchene	Monoterpeno	941	945	0,15
Sabinene	Monoterpeno	965	969	0,56
β -Pinene	Monoterpeno	970	972	0,65
Myrcene	Monoterpeno	982	988	2,01
α -Phellandrene	Monoterpeno	999	1002	35,96
δ -3-Carene	Monoterpeno	1002	1008	10,7
α -Terpinene	Monoterpeno	1011	1014	0,14
o-cymene	Monoterpeno	1019	1020	7,21
Limonene	Monoterpeno	1020	1024	14,39
γ -Terpinene	Monoterpeno	1049	1054	0,09
Terpinolene	Monoterpeno	1082	1086	1,70
trans-Sabinol	Sesquiterpeno	1138	1137	0,49
δ -Elemene	Sesquiterpeno	1337	1335	0,57
β -caryophyllene	Sesquiterpeno	1413	1417	3,09
α -trans-Bergamotene	Sesquiterpeno	1435	1432	0,23
γ -Cadinene	Sesquiterpeno	1516	1513	2,69
trans-Cadinene ether	Sesquiterpeno	1557	1557	0,23
	Monoterpeno			90,54
	Sesquiterpeno			6,24
	Total (%)			96,78

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: IR: Índice de Retenção.

Embora haja variações quantitativas no perfil químico dos óleos essenciais, observa-se que os mesmos compostos aparecem de forma recorrente nos diferentes estudos. Essas diferenças podem estar relacionadas a fatores como o método de extração, a origem geográfica, a parte da planta utilizada, alterações no metabolismo secundário, bem como aos processos de biossíntese e acúmulo, influenciados por fatores abióticos, como temperatura, ciclo circadiano e disponibilidade de nutrientes no solo (Zhang *et al.*, 2023).

Piras e colaboradores (2017) investigaram a composição química dos óleos essenciais das folhas e dos frutos maduros da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) cultivada na Tunísia. A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação (HD), utilizando um aparelho de Clevenger e por extração com fluido supercrítico (SFE), utilizando dióxido de carbono. No caso dos frutos, ambas as técnicas de extração produziram óleos essenciais com composição semelhante e caracterizaram-se por alto teor de α -felandreno (39,6 vs 36,2 %), β -felandreno (22,9 vs 21,3 %), α -pineno (18,4 vs 13,2 %) e germacreno D (10,0 vs 19,6 %), nas técnicas HD e SFE, respectivamente. Já a comparação entre os óleos essenciais das folhas obtidos por HD e SFE revelou diferenças significativas nos teores de α -pineno (6,1% vs traços), α -felandreno (22,7% vs 0,8%) e β -felandreno (14,6% vs 1,2%).

Pacheco *et al.* (2021) analisaram amostras do óleo essencial de aroeira (cultivado no estado de Goiás, Brasil) obtido dos ramos, folhas, frutas e sementes. Nas folhas e sementes o composto principal foi o δ -3-careno (16,13% e 50,11%), respectivamente; nos frutos o α -felandreno (15,25%) e nos ramos o α -ylangeno (18,83%).

Diante dos achados desse estudo e dos dados da literatura, os compostos identificados no óleo essencial da aroeira demonstram que, apesar da variação quantitativa dos compostos, as amostras tendem a apresentar α - e β -felandreno, δ -3-careno, limoneno e α -pineno entre os constituintes principais. Sendo assim, os compostos do óleo essencial de aroeira do presente estudo estão em concordância com os dados da literatura.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA

A Tabela 4 apresenta a caracterização física das nanoemulsões dos óleos essenciais de vetiver e aroeira, bem como de uma nanoemulsão controle preparada com oleato de etila, utilizada para fins de comparação dos parâmetros avaliados.

Tabela 4. Caracterização das nanoemulsões de vetiver e aroeira

Análises	Nanoemulsões		
	Vetiver	Aroeira	Controle
Tamanho (nm)	304,7 ± 11,6 a	105,7 ± 0,95 b	97,1 ± 0,33 c
Potencial Zeta (mV)	-0,83 ± 0,77 c	0,34 ± 0,21 a	0,37 ± 0,05 a
PDI	0,32 ± 0,05 a	0,20 ± 0,02 c	0,27 ± 0,00 b
pH	5,70 ± 0,08 c	6,24 ± 0,14 b	6,87 ± 0,03 a

Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: PDI: índice de polidispersão. Os valores representam média ± desvio-padrão de análises em triplicata. 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%.

As nanoemulsões de vetiver e aroeira apresentaram tamanhos médios de gotículas de 304,7 nm e 105,7 nm, respectivamente. Para que uma formulação seja classificada em escala nanométrica, o tamanho de suas gotículas deve situar-se entre 20 e 500 nm (Hou e Sheng, 2025). Assim, as formulações desenvolvidas apresentam tamanhos de gotícula adequados para serem consideradas nanoemulsões. O tamanho das gotículas é uma das propriedades mais relevantes das emulsões, pois influencia diretamente a estabilidade do sistema. Gotículas de menor diâmetro tendem a apresentar maior resistência à coalescência, contribuindo para a manutenção da estabilidade da nanoemulsão (Hanan *et al.*, 2024).

Os resultados dos tamanhos de gotículas do presente estudo são semelhantes a nanoemulsões elaboradas com outros óleos essenciais. Sharma *et al.* (2022) reportaram que a nanoemulsão de com óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* apresentou tamanho de gotícula 279,0 nm. Yang e colaboradores (2021) elaboraram uma nanoemulsão com óleo essencial de canela com tamanho de gotícula de 195,2 nm. Dos Santos e colaboradores (2025) elaboraram nanoemulsões em gel de óleos

essenciais de *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* e as formulações tiveram tamanhos de gotículas de 105,30 e 99,50 nm, respectivamente.

Araújo *et al.* (2025) desenvolveram um produto antisséptico contendo uma nanoemulsão composta por quercetina, carragenina e óleo essencial de melaleuca para higiene das mãos, visando a atividade antiviral contra o SARS-CoV-2 e obtiveram tamanho das nanopartículas de 150 nm, além de atividade contra o SARS-CoV-2. Zhu *et al.* (2025) elaboraram um filme para aumentar a vida útil da carne de porco contendo uma nanoemulsão de orégano que apresentou tamanho de gotícula de 82,46 nm. Yousef *et al.* (2020) utilizaram óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) encapsulado em nanopartículas de quitosana em diferentes concentrações e obtiveram valores médios de tamanhos das nanopartículas de 198,13 a 318,26 nm.

Diante dos trabalhos encontrados na literatura, percebe-se que ocorre uma variação no tamanho médio das gotículas para cada formulação. Há vários fatores que influenciam no tamanho da gotícula de uma nanoemulsão, entre eles, o método empregado, a quantidade de óleo essencial utilizada para compor a fase interna da formulação, as características físico-químicas do óleo essencial, bem como a concentração de surfactante utilizada (Artigas-Artigas *et al.*, 2019; Nirmala *et al.*, 2020).

Outra característica que influencia a estabilidade de uma nanoemulsão é o potencial zeta. Valores de potencial zeta entre +30 mV e -30 mV indicam boa estabilidade da formulação, enquanto valores entre -10 mV e +10 mV são considerados neutros. O potencial zeta depende de diversos fatores, incluindo o tipo de surfactante e co-surfactante utilizados, as propriedades físico-químicas da formulação, a presença de eletrólitos e a capacidade de adsorção das partículas (Hanan *et al.*, 2024; Kumari *et al.*, 2018; Preeti *et al.*, 2023).

As nanoemulsões de vetiver e aroeira apresentaram potenciais zeta de -0,83 e 0,34 mV, respectivamente, valores considerados neutros. Esse comportamento é característico de nanoemulsões formuladas com surfactantes não iônicos, como foi o caso neste estudo, que utilizou Labrasol e Plurol. Esses surfactantes promovem a estabilidade das gotículas principalmente por barreira estática, ou seja, por meio do impedimento físico da aproximação e coalescência das partículas, devido à presença de cadeias poliméricas ou grupos hidrofílicos que criam uma camada hidratada ao redor das gotículas.

Por outro lado, os surfactantes iônicos estabilizam o sistema através de repulsão eletrostática, conferindo às gotículas cargas positivas ou negativas que se repelem mutuamente. Assim, enquanto os surfactantes iônicos dependem da manutenção de um potencial zeta elevado para evitar a agregação, os não iônicos garantem a estabilidade mesmo com potenciais zeta próximos de zero, devido ao predomínio do efeito estérico (Preeti *et al.*, 2023).

Os resultados de potencial zeta neutros foram relatados por diversos autores em nanoemulsões elaboradas com outros óleos essenciais. Morteza Semnani *et al.* (2023) desenvolveram uma nanoformulação em gel com óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum*) que apresentou potencial zeta de $-6,90$ mV. Seibert *et al.* (2018) obtiveram uma nanoemulsão contendo óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon densiflorus*), que apresentou potencial zeta de $-8,98$ mV e apesar de neutro o sistema manteve-se estável no teste de estabilidade acelerada. Já Prakash *et al.* (2019) formularam nanoemulsões com óleo essencial de capim-limão e seu composto predominante (citral) e essas formulações apresentaram potenciais zeta considerados neutros, de $-12,33$ mV e $-8,42$ mV, respectivamente.

As formulações com valores de potencial zeta altamente negativos podem não ser ideais para a atividade antimicrobiana, uma vez que tanto as partículas quanto a superfície bacteriana apresentam carga negativa, resultando em repulsão eletrostática. Recentemente, essa hipótese foi confirmada por Tinh *et al.* (2025), que desenvolveram formulações contendo óleos essenciais de *Elsholtzia kachinensis* (hortelã-chinesa) e *Elsholtzia ciliata* (hortelã-em-pente) por meio de homogeneização ultrassônica e avaliaram a atividade antibacteriana. Os potenciais zeta obtidos foram de $-27,8$ mV e $-11,2$ mV, respectivamente. Embora a formulação de *E. kachinensis* tenha apresentado maior estabilidade devido ao valor mais negativo do potencial zeta ($-27,8$ mV), a formulação de *E. ciliata* demonstrou maior atividade antimicrobiana e seu potencial zeta foi considerado neutro ($-11,2$ mV).

Por outro lado, valores positivos de potencial zeta podem potencializar a atividade antimicrobiana. Esse efeito é atribuído à atração eletrostática entre as cargas catiônicas das nanoemulsões e as cargas aniônicas da membrana bacteriana, o que aumenta a biodisponibilidade do princípio ativo diretamente no sítio de ação (Begum *et al.*, 2024; Halder *et al.*, 2015). Com o objetivo de investigar o mecanismo antibacteriano da nanoemulsão do óleo essencial de *Zanthoxylum bungeanu*, Zheng *et al.* (2024) desenvolveram uma formulação com potencial zeta de $+50,97$ mV, que

demonstrou potente atividade antimicrobiana contra todas as cepas bacterianas testadas.

O índice de polidispersão (PDI) também influencia diretamente a estabilidade da formulação e a liberação do fármaco. O PDI está relacionado à homogeneidade da distribuição do tamanho das gotículas nas nanoemulsões, indicando o grau de variação entre elas. Seu valor numérico varia de 0 a 1,0; valores entre 0 e 0,30 indicam que o sistema de nanoemulsão apresenta distribuição uniforme (De Oca-Ávalos *et al.*, 2017; Hanan *et al.*, 2024; Nirmala *et al.*, 2020). No presente estudo, os valores de PDI obtidos foram de 0,20 para a nanoemulsão contendo óleo essencial de aroeira e 0,32 para a nanoemulsão contendo óleo essencial de vetiver, ambos indicando sistemas com distribuição uniforme do tamanho das gotículas.

Os resultados de PDI obtidos neste estudo são semelhantes aos relatados para nanoemulsões elaboradas com outros óleos essenciais. Lima *et al.* (2024) desenvolveram oito formulações contendo óleo essencial de aroeira, nas quais os melhores valores de PDI variaram entre 0,27 e 0,30. Yang *et al.* (2022) observaram valores de PDI entre 0,19 e 0,28 em nanoemulsões com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), que também apresentaram excelente atividade antimicrobiana. Seugling *et al.* (2019) reportaram valor de 0,23 para nanoemulsão contendo óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). Ozogul *et al.* (2020) obtiveram nanoemulsão com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentando menor valor de PDI de 0,16 e de forma semelhante, Yazgan *et al.* (2020) relataram um valor de PDI de 0,12 para nanoemulsão com óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*).

As nanoemulsões de vetiver e aroeira apresentaram valores de pH de 5,70 e 6,24, respectivamente. De modo geral, as nanoemulsões de óleos essenciais descritas na literatura apresentam pH variando entre 5,40 e 7,20 (Prakash *et al.*, 2019 b; Yakoubi *et al.*, 2021), faixa considerada adequada tanto para aplicações farmacêuticas quanto cosméticas, pois reduz o risco de irritação cutânea e preserva as características físico-químicas, como tamanho de partícula e potencial zeta.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DAS NANOEMULSÕES DE VETIVER E AROEIRA

A Tabela 5 apresenta a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das nanoemulsões de vetiver e aroeira frente às diferentes bactérias testadas. De modo geral, o óleo essencial de vetiver demonstrou maior atividade antimicrobiana em relação ao essencial de óleo de aroeira. Assim, o óleo essencial de vetiver apresentou valores de CIM variando de 0,10 a 6,30 $\mu\text{L/mL}$, com destaque para a elevada sensibilidade das bactérias Gram-positivas *B. cereus* (CIM de 0,10 $\mu\text{L/mL}$ e CBM de 0,20 $\mu\text{L/mL}$) e *S. aureus* (CIM de 0,40 $\mu\text{L/mL}$ e CBM de 1,60 $\mu\text{L/mL}$). Já o óleo essencial de aroeira exibiu maiores valores de CIM de 1,60 a 12,50 $\mu\text{L/mL}$, indicando menor atividade antimicrobiana.

Esses resultados sugerem que os compostos majoritários do óleo essencial de vetiver (composto por 96,63% de compostos sesquiterpenos como sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos) possuem maior atividade antimicrobiana do que os componentes predominantes do óleo essencial de aroeira (composto por 90,54% de compostos monoterpenos). Estudos anteriores indicam que terpenos oxigenados (terpenoides) exibem atividade antimicrobiana superior à de monoterpenos hidrocarbonetos, como limoneno, terpineno, canfeno e pineno. Assim, a presença de grupos funcionais oxigenados nas moléculas terpênicas tem sido associada ao aumento da eficácia antimicrobiana. Portanto, os fatores determinantes da atividade biológica dos óleos essenciais incluem sua composição química, os grupos funcionais presentes nos constituintes ativos e as possíveis interações sinérgicas entre esses compostos (Guimarães *et al.*, 2019).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais e das nanoemulsões de vetiver e aroeira frente às bactérias testadas.

Bactérias testadas	Óleos essenciais (OE) e nanoemulsões (NE)							
	OE Vetiver		NE Vetiver		OE Aroeira		NE Aroeira	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(µL/mL)							
<i>S. aureus</i>	0,40 c	1,60 b	1,60 b	3,10 a	3,10 a	>100	3,10 a	>100
<i>B. cereus</i>	0,10 e	0,20 d	0,05 f	3,10 b	1,60 c	12,50 a	0,04 f	0,08 e
<i>E. coli</i>	0,80	50,0 a	12,50 b	50,0 a	12,50 b	>100	3,10	>100
<i>S. enterica</i>	6,30 b	>100	0,80 d	>100	1,60 c	>100	6,30 b	50,0 a
<i>K. pneumoniae</i>	1,60 d	>100	0,80 e	>100	6,25 b	50,0 a	3,10 c	>100

Notas: OE = óleo essencial; NE = nanoemulsão. Os valores representam média \pm desvio-padrão de análises em triplicata. 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%.

Fonte: Autoria própria, 2025.

Estudos disponíveis na literatura têm demonstrado a atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver principalmente contra bactérias Gram-positivas. Atif *et al.* (2020) relataram uma concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL frente a *S. aureus*, enquanto Kurrimboccus *et al.* (2021) observaram valor de CIM de 170 µg/mL para a mesma espécie. Vázquez-Sánchez, Cabo e Rodríguez-Herrera (2014) avaliaram 19 óleos essenciais distintos contra cepas de *S. aureus* de origem alimentar, verificando que o óleo essencial de vetiver apresentou elevada atividade antimicrobiana (CIM = 0,70 µL/mL). Em outro estudo, David *et al.* (2019) compararam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de vetiver obtido por diferentes métodos de extração: etanol expandido com dióxido de carbono (CXE), fluido supercrítico (SFE), hidrodestilação (HD) e destilação indireta a vapor (IVD). Os óleos essenciais obtidos por CXE e SFE inibiram o crescimento de *S. aureus* (CIM = 78 µg/mL), enquanto o óleo extraído por HD apresentou maior eficácia frente a *S. aureus* (CIM =

39 µg/mL) e atividade moderada contra *E. coli* (CIM = 312,5 µg/mL). Jeddi e colaboradores (2023) obtiveram para o óleo essencial de vetiver valores de CIM de 5,0 µL/mL para *S. aureus* e 10,0 µL/mL para a bactéria Gram-negativa *S. enterica*.

Os estudos pesquisados na literatura mostraram para o óleo essencial de aroeira uma maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas em relação a bactérias Gram-negativas. Carvalho *et al.* (2017) identificaram compostos majoritários no óleo essencial de aroeira (delta-3-careno 40,53%, silvestreno 17,63%, beta-felandreno 14,25% e alfa-pineno 11,90%) semelhantes aos observados no presente trabalho (α-felandreno 35,96%, α-pineno 15,41%, limoneno 14,39% e δ-3-careno 10,70%), reportando atividade antimicrobiana contra *S. aureus* com halo de inibição de 9,17 mm, enquanto não foi observada formação de halo para *E. coli*. De forma semelhante, Salem *et al.* (2018) obtiveram para o óleo essencial de aroeira composição química (α-pineno 36,9% e α-felandreno 32,8%) comparável ao presente estudo e valores de CIM de 16 µg/mL para *S. aureus* e 500 µg/mL para *E. coli*. De modo consistente, Dannenberg *et al.* (2019) relataram efeito inibitório apenas para *S. aureus*, com valores de CIM e CBM de 0,68 mg/mL e 2,72 mg/mL, respectivamente. O tempo de contato necessário para que a concentração bactericida mínima (CBM) atuasse de forma eficaz sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi inferior a 12 h, enquanto as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* não foram inibidas, mas apresentaram crescimento significativamente reduzido. Além disso, observaram-se alterações na permeabilidade e na integridade da membrana celular de todas as bactérias avaliadas, indicando que o dano à parede celular é um dos seus mecanismos de ação.

Após a nanoemulsificação, observou-se um aumento da eficácia antimicrobiana para ambos os óleos essenciais (vetiver e aroeira) frente a parte das bactérias testadas. No caso das bactérias Gram-negativas, a nanoemulsão de vetiver apresentou redução dos valores de CIM para *S. enterica* (de 6,30 para 0,80 µL/mL) e *K. pneumoniae* (de 1,60 para 0,80 µL/mL), evidenciando melhora da atividade antimicrobiana sobre essas espécies. De forma semelhante, a nanoemulsão de aroeira também promoveu redução dos valores de CIM frente a *E. coli* e *K. pneumoniae*, passando de 12,50 para 3,10 µL/mL e de 6,25 para 3,10 µL/mL, respectivamente.

Por outro lado, frente a *E. coli*, o óleo essencial de vetiver apresentou melhor desempenho (CIM de 0,80 µL/mL) em comparação à nanoemulsão (12,5 µL/mL),

embora os valores de CBM tenham permanecido elevados em ambos os casos (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). De forma semelhante, para *S. enterica* observou-se redução da eficácia antimicrobiana da nanoemulsão em relação ao óleo essencial de aroeira (CIM de 1,60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ no óleo essencial e 6,30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ na nanoemulsão).

Para a bactéria Gram-positiva *B. cereus*, a nanoemulsão de vetiver apresentou menor valor de CIM (0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do que o óleo essencial (0,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), indicando maior efeito inibitório, porém o valor de CBM aumentou significativamente em relação ao óleo essencial (de 0,20 para 3,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), o que sugeriu ação bacteriostática mais pronunciada da nanoemulsão de vetiver contra *B. cereus*, mas com redução do efeito bactericida. Já a nanoemulsão de aroeira mostrou melhora significativa de desempenho contra *B. cereus*, com redução da CIM de 1,60 para 0,04 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e da CBM de 12,50 para 0,08 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Para a bactéria *S. aureus*, a nanoemulsificação do óleo essencial de aroeira não alterou significativamente a atividade antimicrobiana (CIM de 3,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em ambas as formas), com valor de CBM >100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sugerindo uma atividade bacteriostática para *S. aureus* tanto do óleo essencial quanto da nanoemulsão de aroeira. Já a nanoemulsificação do óleo essencial de vetiver teve menor atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* em relação ao óleo essencial.

As bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) foram mais sensíveis tanto aos óleos essenciais quanto as nanoemulsões de vetiver e aroeira, apresentando menores valores de CIM (0,04 a 3,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), enquanto as bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *S. enterica* e *K. pneumoniae*) mostraram maiores valores de CIM (0,80 a 12,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Esses achados estão de acordo com a literatura, que reconhece a maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas aos compostos naturais de óleos essenciais, devido à ausência da membrana externa lipopolissacarídica característica das bactérias Gram-negativas, que funciona como uma barreira a entrada de compostos lipofílicos nas células, diminuindo a eficácia antimicrobiana desses compostos (Wińska *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2022).

Adicionalmente, é relevante observar que *B. cereus* foi a bactéria mais sensível dentre todas, com CIM variando de 0,05 a 0,40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e CBM variando de 0,20 a 3,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ nas diferentes formulações. Esse comportamento pode ser explicado pela alta permeabilidade de sua parede celular a compostos lipofílicos, além de características estruturais próprias que favorecem a ação de agentes antimicrobianos naturais. Em contrapartida, *K. pneumoniae* demonstrou ser o microrganismo mais resistente, com

CIM de 3,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e CBM > 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para quase todas as amostras, o que reforça sua notoriedade clínica como patógeno multirresistente.

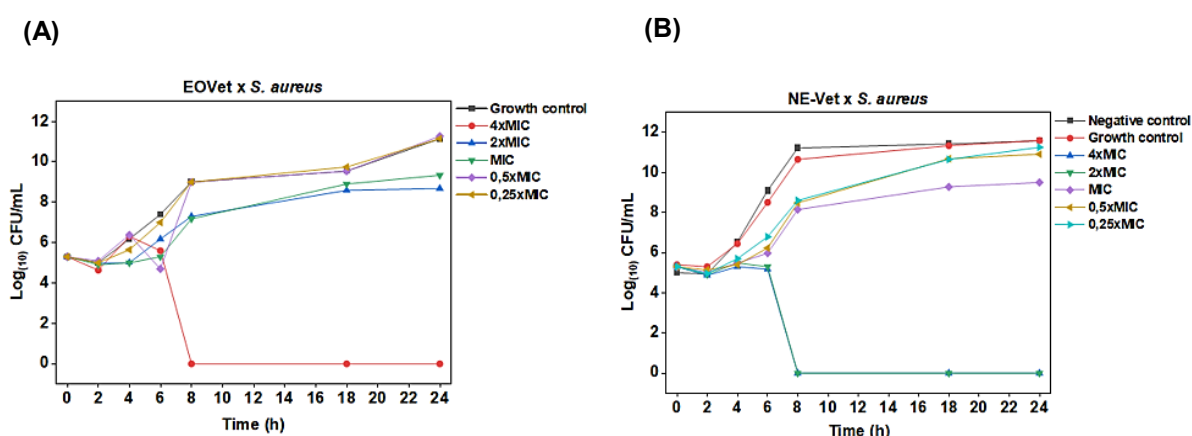
De modo geral, os resultados indicaram que a nanoemulsificação dos óleos essenciais de vetiver e aroeira resultou em incremento significativo da atividade antimicrobiana, sobretudo frente a cepas de bactérias Gram-negativas. Tal comportamento pode ser atribuído a redução do tamanho das partículas que resulta em maior dispersão do óleo essencial no meio aquoso, aumento da área superficial de contato e, por conseguinte, maior facilidade de penetração de compostos hidrofóbicos através das membranas bacterianas, por consequência potencializando a ação antimicrobiana (Donsi e Ferrari, 2015).

Outros estudos disponíveis na literatura também relataram o aumento da atividade antimicrobiana de nanoemulsões formuladas com diferentes óleos essenciais. Tinh *et al.* (2025) compararam a atividade antimicrobiana de nanoformulações e dos óleos essenciais de *Elsholtzia kachinensis* e *Elsholtzia ciliata*. Ambas as nanoemulsões apresentaram maior eficácia antibacteriana em relação aos óleos essenciais correspondentes, com destaque para *E. ciliata*, que apresentou valores de CIM para *S. aureus* (0,39 e 0,15 mg/mL), *E. coli* (0,93 e 0,46 mg/mL) e *Klebsiella pneumoniae* (0,46 e 0,31 mg/mL), correspondendo ao óleo essencial puro e à nanoemulsão, respectivamente. Kahni *et al.* (2023) desenvolveram formulações à base de óleo essencial de cominho e avaliaram sua ação antibacteriana frente a patógenos alimentares relevantes e bactérias resistentes a antibióticos, observando que a bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* apresentou baixo valor de CIM de 0,05 mg/mL. Zheng *et al.* (2024) demonstraram que a nanoemulsão de óleo essencial de pimenta-da-China (*Zanthoxylum bungeanum*) promoveu a desintegração da integridade das membranas celulares, resultando em vazamento do conteúdo intracelular e consequente inibição do crescimento bacteriano.

5.4 CURVA DE TEMPO MORTE DA NANOEMULSÃO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE VETIVER PARA *S. AUREUS* E *E. COLI*

A Figura 7 apresenta as curvas de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e de sua nanoemulsão (4,00xCIM, 2,00xCIM, 1,00xCIM, 0,50xCIM e 0,25xCIM) para *S. aureus*.

Figura 7. Curva de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e sua nanoemulsão para *S. aureus*.



Os resultados de crescimento de *Staphylococcus aureus* foram expressos em logaritmo da unidade formadora de colônia por mililitro ($\text{Log}_{(10)}$ UFC/mL), ao longo de 24 horas. **A)** óleo essencial de vetiver (EOVet); **B)** nanoemulsão de vetiver (NE-Vet). As concentrações testadas incluem o controle positivo de crescimento bacteriano (inóculo bacteriano e caldo de cultura), o controle negativo para atividade antimicrobiana (nanoemulsão com óleo inerte) e as concentrações correspondentes a 4,00xCIM, 2,00xCIM, 1,00xCIM, 0,50xCIM e 0,25xCIM.

Observou-se que o OEVet, na concentração de 4,00xCIM, apresentou efeito bactericida sobre *S. aureus* após 8 horas de incubação. As concentrações de 2,00xCIM e 1,00xCIM promoveram redução parcial da viabilidade bacteriana, limitando a multiplicação microbiana em níveis inferiores aos observados no controle positivo de crescimento. Por outro lado, as concentrações de 0,50xCIM e 0,25xCIM não foram eficazes em impedir o crescimento bacteriano após 6 horas, evidenciando o caráter dose-dependente da atividade antimicrobiana do OEVet contra *S. aureus*.

Sreepian e Sreepian (2025) observaram resultado similar no ensaio de tempo morte empregando o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) com efeito bactericida para *S. aureus* na concentração 2,00xCIM em 8 horas. Este efeito

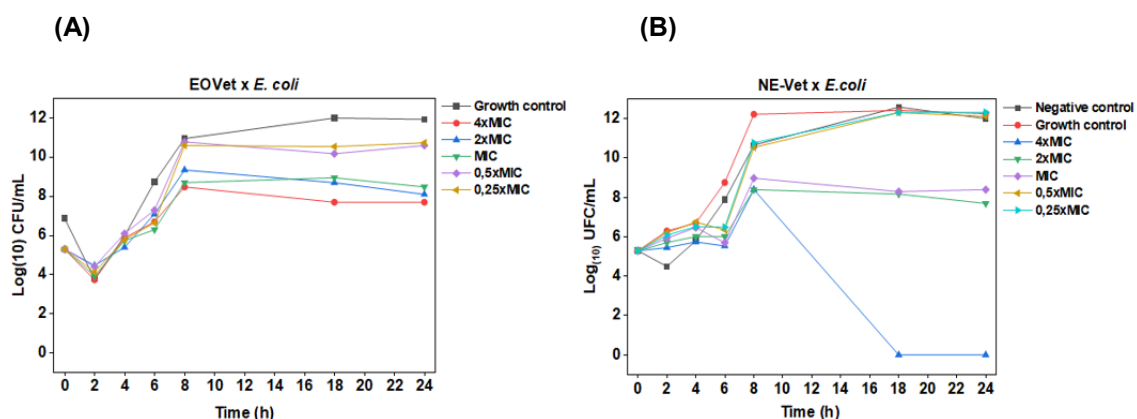
bactericida rápido é particularmente relevante no contexto clínico, uma vez que *S. aureus* apresenta capacidade de formar biofilmes e resistência aos tratamentos convencionais (Michalik; Podbielska-Kubera; Dmowska-Koroblewska, 2025).

Verificou-se que a NE-Vet, nas concentrações de 4,00×CIM e 2,00×CIM, apresentou efeito bactericida sobre *S. aureus* após 8 horas de incubação. A concentração de 1,00×CIM promoveu redução parcial da viabilidade bacteriana, limitando a multiplicação microbiana em níveis inferiores aos observados no controle positivo de crescimento. Por outro lado, as concentrações de 0,50×CIM e 0,25×CIM não foram eficazes em impedir o crescimento bacteriano após 8 horas. Dessa forma, a nanoformulação do óleo essencial de vetiver potencializou sua atividade antibacteriana, possivelmente em função da maior dispersão e do aumento da área de contato com a membrana bacteriana. Como consequência, há melhora na solubilidade dos compostos lipofílicos e intensificação das interações com a bicamada lipídica, resultando em desorganização estrutural, aumento da permeabilidade e lise celular (Zheng *et al.*, 2024).

Liu *et al.* (2022) relataram que nanoemulsões formuladas com carvacrol exibiram maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* em comparação ao carvacrol puro e às soluções aquosas comerciais, todas avaliadas nas mesmas concentrações. De forma semelhante, Jawaid *et al.* (2023) observaram inibição significativa do crescimento de *S. aureus*, sendo que o tratamento com nanoemulsão de óleo essencial de citronela apresentou maior eficácia antimicrobiana (redução de 6,00 para 1,69 log UFC/mL) em relação ao óleo essencial puro (redução de 6,00 para 2,30 log UFC/mL) após 20 horas de incubação. Cecchini *et al.* (2021) desenvolveram uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Minthostachys verticillata*, que demonstrou ação antibacteriana potencializada contra *S. aureus* ATCC 29213. Nesse estudo, a nanoemulsão reduziu a carga microbiana de 8,20 para 4,12 log UFC/mL, enquanto o óleo essencial puro promoveu redução de 8,17 para 5,35 log UFC/mL, após 24 horas de incubação.

A Figura 8 apresenta as curvas de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e de sua nanoemulsão (4,00×CIM, 2,00×CIM, 1,00×CIM, 0,50×CIM e 0,25×CIM) para *E. coli*.

Figura 8. Curva de tempo morte de diferentes concentrações do óleo essencial de vetiver e sua nanoemulsão para *E. coli*.



Os resultados de crescimento de *E. coli* foram expressos em logaritmo da unidade formadora de colônia por mililitro ($\text{Log}_{(10)}$ UFC/mL), ao longo de 24 horas. **A)** óleo essencial de vetiver (EOVet); **B)** nanoemulsão de vetiver (NE-Vet). As concentrações testadas incluem o controle positivo de crescimento bacteriano (inóculo bacteriano e caldo de cultura), o controle negativo para atividade antimicrobiana (nanoemulsão com óleo inerte) e as concentrações correspondentes a 4,00xMIC, 2,00xMIC, 1,00xMIC, 0,50xMIC e 0,25xMIC.

O OEVet, mesmo na concentração de 4,00xMIC, não apresentou efeito bactericida contra *E. coli* após 8 horas de incubação, mantendo contagens bacterianas superiores a 7 log UFC/mL após 24 horas. Observou-se apenas efeito bacteriostático nas concentrações de 4,00xMIC, 2,00xMIC e 1,00xMIC. Dessa forma, a bactéria Gram-negativa *E. coli* demonstrou menor sensibilidade ao OEVet em comparação a *S. aureus*, o que está em concordância com a literatura, que atribui essa resistência à presença da membrana externa lipopolissacarídica característica das bactérias Gram-negativas, a qual atua como barreira à permeabilidade de compostos hidrofóbicos, como os presentes no OEVet (Nazzaro *et al.*, 2013).

Por outro lado, a NE-Vet exibiu atividade antimicrobiana superior contra *E. coli* em relação ao OEVet, apresentando efeito bactericida na concentração de 4,00xMIC após 18 horas de incubação, reforçando, mais uma vez, que sistemas nanoemulsionados de óleos essenciais contribuem para o aumento da eficácia antimicrobiana. Tais achados são consistentes com estudos recentes que demonstram que nanoemulsões à base de óleos essenciais conseguem superar as barreiras de penetração impostas pela membrana externa de *E. coli*, resultando em aumento significativo da atividade bactericida. Al-Asmari *et al.* (2024) relataram que a nanoemulsão de óleo essencial de tomilho promoveu redução de 5 log UFC/mL de *E. coli* em apenas 2 horas durante o ensaio de tempo de morte. De forma semelhante,

Moghimi *et al.* (2016) observaram a atividade bactericida da nanoemulsão de tomilho, com eliminação de *E. coli* em 5 minutos, enquanto o óleo essencial puro provocou apenas uma redução de 1 log UFC/mL no mesmo período.

Nirmal *et al.* (2023) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma nanoemulsão de óleo essencial de canela. Observou-se que *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, foi mais suscetível à nanoemulsão do que *S. aureus*, e que a formulação nanoemulsionada apresentou atividade antimicrobiana superior em comparação ao óleo essencial puro frente a todos os microrganismos testados. As proteínas do tipo porinas formam canais na membrana externa das bactérias Gram-negativas, permitindo a passagem de moléculas hidrofílicas; contudo, essas estruturas atuam como barreira seletiva para compostos lipofílicos, restringindo sua penetração em função do tamanho molecular. Nesse contexto, a incorporação do óleo essencial em um sistema nanoemulsionado pode favorecer sua interação com as proteínas de membrana, ampliando a eficácia antimicrobiana, o que explicaria a maior sensibilidade observada para *E. coli*.

Portanto, os resultados obtidos indicam que a NE-Vet constitui uma formulação promissora, capaz de potencializar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, especialmente frente a patógenos Gram-positivos. O perfil dose- e tempo-dependente observado reforça a necessidade de estudos complementares que investiguem novos modelos de sistemas nanoemulsionados, diferentes excipientes, concentrações intermediárias, mecanismos de ação mais detalhados e a eficácia em modelos biológicos mais complexos, incluindo biofilmes e matrizes orgânicas. Além disso, considerando a relevância clínica de *S. aureus* e *E. coli* na saúde pública, o desenvolvimento de alternativas naturais e tecnologicamente aprimoradas representa uma contribuição significativa para o enfrentamento da resistência antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram o potencial dos óleos essenciais de vetiver e aroeira como agentes antimicrobianos naturais, com destaque para o óleo essencial de vetiver, que apresentou maior eficácia antimicrobiana, especialmente frente a *B. cereus* e *S. aureus*. A comparação entre os óleos essenciais na forma livre e suas respectivas nanoemulsões demonstrou que a nanoemulsificação pode intensificar a atividade antimicrobiana, sobretudo frente a cepas de bactérias Gram-negativas.

Assim, os resultados permitem inferir que as nanoemulsões representam uma alternativa viável e eficaz para potencializar a ação antimicrobiana de óleos essenciais. Esse comportamento sugere que o sistema nanoemulsionado favorece a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, promove uma dispersão mais homogênea dos bioativos e aumenta a superfície de contato com as células bacterianas, intensificando as interações com a membrana celular e culminando na morte microbiana.

Tais achados reforçam a importância de otimizar as formulações contendo óleos essenciais, contemplando ajustes na composição e na escolha de tensoativos, bem como avaliações em sistemas biológicos mais complexos, a fim de superar as barreiras de permeabilidade celular e ampliar o espectro de ação. Dessa forma, este estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos e limitações das nanoemulsões de óleos essenciais, oferecendo subsídios relevantes para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas e antimicrobianas mais eficazes.

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

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4.1th ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2017. 809 p.

AHMED, S. K. *et al.* Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health**, v. 2, p. 100081, 2024.

AL-ASMARI, F. *et al.* Antimicrobial activity of formulated Origanum and Thyme essential oil nanoemulsions - a comparative study. **Current Nutrition & Food Science**, v. 20, n. 6, p. 757–766, 2024.

ARAÚJO, M. C. *et al.* Green antiseptic for hand hygiene with high activity against SARS-CoV-2: Iota-carrageenan, quercetin, and *Melaleuca alternifolia* essential oil based nanoemulsion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 305, p. 140920, 2025.

ARTIGA-ARTIGAS, M *et al.* Nanostructured systems to increase bioavailability of food ingredients. **In: Nanomaterials for Food Applications**, p. 13–33, 2019.

ATIF, M. *et al.* Essential oils of two medicinal plants and protective properties of jack fruits against the spoilage bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112239, 2020.

BARRADAS, T. N.; DE HOLANDA E SILVA, K. G. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 1153–1171, 2020.

BEGUM JP, S. *et al.* Antimicrobial nanoemulsion: a futuristic approach in antibacterial drug delivery system. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 101896, 29 2024.

BELHOSSAINE, O. *et al.* Chemical composition, antioxidant, insecticidal activity, and comparative analysis of essential oils of leaves and fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–12, 2022.

BOLGEN, U. M. G. *et al.* Essential oil-based nanoemulsions with current knowledge: Formulation, characterization, and applications in food and pharmaceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 233, p. 121411, 2025.

BURGER, P. *et al.* Vetiver essential oil in cosmetics: what is new? **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 41, 2017.

CARVALHO, J. A. M. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, Vitória. *Anais...* São Paulo: Editora Blucher, 2017. p. 59–63.

CECCHINI, M. E. *et al.* Nanoemulsion of *Minthostachys verticillata* essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e05896, 2021.

CHAMPAGNAT, P. *et al.* A study on the composition of commercial *Vetiveria zizanioides* oils from different geographical origins. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 4, p. 416–422, 2006.

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.

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

COLE, E. R. *et al.* Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 821–828, 2014.

COSTA DA SILVA, M. M. *et al.* Antibiotic-potentiating activity of the *Schinus terebinthifolius* Raddi essential oil against MDR bacterial strains. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1587, 2023.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DANNENBERG, G. DA S. *et al.* Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, p. 115–120, 2019.

DAS, P. *et al.* A comprehensive review of nanoemulsion applications & their recent advancements. **Current Nanomaterials**, v. 08, 2022.

DAVID, A. *et al.* Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash essential oil extracted by carbon dioxide expanded ethanol. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1897, 2019.

DE OCA-ÁVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 1–6, 2017.

DHIFI, W. *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food.

Journal of Biotechnology, v. 233, p. 106–120, 2016.

DOS SANTOS, R. D. *et al.* Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and nanoemulsions of *Eugenia uniflora* and *Psidium guajava*. **Antibiotics**, v. 14, n. 1, p. 93, 2025.

EL-NASHAR, H. A. S. *et al.* The genus *Schinus* (Anacardiaceae): a review on phytochemicals and biological aspects. **Natural Product Research**, v. 36, n. 18, p. 4833–4851, 2022.

ENNIGROU, A. *et al.* Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 1582–1590, 2018.

FERREIRA-NUNES, R. *et al.* Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 265, p. 408–415, 2018.

FRANK, L. A. *et al.* Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623–639, 2015.

GHAZALA MUTEEB. Nanotechnology a light of hope for combating antibiotic resistance. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1489–1489, 2023.

GIEDRĖ VALDONĖ SAKALAUŠKIENĖ *et al.* Unseen enemy: mechanisms of multidrug antimicrobial resistance in gram-negative ESKAPE pathogens. **Antibiotics**, v. 14, n. 1, p. 63–63, 2025.

GROVER, M. *et al.* *Chrysopogon zizanioides* - a review on its pharmacognosy, chemical composition and pharmacological activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 33, p. 44667–44692, 2021.

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in

essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.

HALDER, S. *et al.* Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

HANAN, E. *et al.* New insights into essential oil nano emulsions loaded natural biopolymers recent development, formulation, characterization and packaging applications: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135751, 2024.

HILL, L. E.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 86–93, 2013.

HOU, X.; SHENG, J. J. Properties, preparation, stability of nanoemulsions, their improving oil recovery mechanisms, and challenges for oil field applications - A critical review. **Geoenergy Science and Engineering**, v. 221, p. 211360, 2023.

SEUGLING J. *et al.* Development of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil nanoemulsion and its biological activity on pre-pupae of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 6, 2019.

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, p. 478, 2023.

JEDDI M. *et al.* Chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum* and *Vetiveria zizanioides* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 7, n. 1, p. 2244–2250, 2023.

KANNAPPAN, A. *et al.* Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 313–

324, 2017.

KAYIRAN, D. S. *et al.* Chemical composition and antibacterial properties of microemulsion and microemulgel formulations containing *Lavandula angustifolia* Mill. essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 226, p. 12065, 2025.

KHANI, F. *et al.* Development and characterization of cumin oil- nanoemulsions and its enhanced antibacterial activity against some bacteria. **Journal of Advances in Medical and Biomedical Research**, v. 32, n. 155, p. 427–437, 2024.

KUMAR, A.; KANWAR, R.; MEHTA, S. K. Nanoemulsion as an effective delivery vehicle for essential oils: Properties, formulation methods, destabilizing mechanisms and applications in agri-food sector. **Next Nanotechnology**, v. 7, p. 100096–100096, 2024.

KUMARI, S. *et al.* Thymol nanoemulsion exhibits potential antibacterial activity against bacterial pustule disease and growth promotory effect on soybean. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

KURRIMBOCCUS, F. *et al.* Antimicrobial formulation of *Chrysopogon zizanioides* essential oil in an emulsified lotion for acne. **Planta Medica**, v. 88, n. 13, p. 1256–1262, 2021.

LAN, J. *et al.* Nanomedicines as disruptors or inhibitors of biofilms: Opportunities in addressing antimicrobial resistance. **Journal of Controlled Release**, v. 381, p. 113589–113589, 2025.

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

LI, J. *et al.* Preparation of hydroxypinacolone retinoate nanoemulsion with high stability, low irritation and high permeability. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 107, p. 106822, 2025.

LIMA, M. A. *et al.* Physicochemical characterization, rheological properties, and antimicrobial activity of sodium alginate-pink pepper essential oil (PPEO) nanoemulsions. **Foods**, v. 13, n. 19, p. 3090, 2024.

LIU, Q. *et al.* Formulation optimization and characterization of carvacrol-loaded nanoemulsions: In vitro antibacterial activity/mechanism and safety evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114816, 2022.

LUNZ, K.; STAPPEN, I. Back to the roots - an overview of the chemical composition and bioactivity of selected root-essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3155, 2021.

MAES, C.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M.-L. Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: a review. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2539, 2019.

MANCUSO, G. *et al.* Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

MARTINELLI, L. *et al.* Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, p. 1–7, 2017.

MICHALIK, M.; PODBIELSKA-KUBERA, A.; DMOWSKA-KOROBLEWSKA, A. antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains - searching for new antimicrobial agents - review. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 1, p. 81, 2025.

MISHRA, N. *et al.* Nano emulsion drug delivery system: a review. **Current Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 2–16, 2023.

MOGHIMI, R. *et al.* Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 410–415, 2016.

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, 2021.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NENAAH, G. E. *et al.* The essential oil of *Schinus terebinthifolius* and its nanoemulsion and isolated monoterpenes: investigation of their activity against *Culex pipiens* with insights into the adverse effects on non-target organisms. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 1035–1047, 2021.

NIRMAL, N. P. *et al.* Cinnamon bark oil in water nanoemulsion formulation, characterization, and antimicrobial activities. **LWT**, v. 179, p. 114671, 2023.

NIRMALA, M. J. *et al.* Preparation of celery essential oil-based nanoemulsion by ultrasonication and evaluation of its potential anticancer and antibacterial activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 7651–7666, 2020.

OLIVEIRA, K. C. *et al.* Essential oil from the leaves, fruits and twigs of *Schinus terebinthifolius*: chemical composition, antioxidant and antibacterial potential. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 469, 2024.

OLIVEIRA, S. *et al.* Antibacterial, antiparasitic, and cytotoxic activities of chemical characterized essential oil of *Chrysopogon zizanioides* roots. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 8, p. 967–967, 2022.

OZOGUL, Y. *et al.* Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100635, 2020.

PACHECO, F. M. *et al.* Interactions of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Research Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e315101018892-e315101018892, 2021.

PAINTER, C. *et al.* Sustainable antimicrobial resistance surveillance: time for a global funding mechanism. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. e99–e103, 2025.

PARVIN, N.; JOO, S. W.; MANDAL, T. K. Nanomaterial-based strategies to combat antibiotic resistance: mechanisms and applications. **Antibiotics**, v. 14, n. 2, p. 207, 2025.

PIRAS, A. *et al.* Chemical composition and biological activity of volatile extracts from leaves and fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi from Tunisia. **Records of Natural Products**, v. 11, p. 9–16, 2017.

PRAKASH, A. *et al.* Effect of nanoemulsification on the antibacterial and anti-biofilm activities of selected spice essential oils and their major constituents against *Salmonella enterica* Typhimurium. **Journal of Cluster Science**, v. 31, n. 5, p. 1123–1135, 2019a.

PRAKASH, A. *et al.* Essential oil-based nanoemulsions as effective antimicrobial agents: a review. **Food Control**, v. 104, p. 209–220, 2019b.

PREETI *et al.* Nanoemulsion: an emerging novel technology for improving the bioavailability of drugs. **Scientifica**, v. 2023, p. 1–25, 2023.

RAMÍREZ-RUEDA, R. Y.; MARINHO, J.; SALVADOR, M. J. Bioguided identification of antimicrobial compounds from *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty root essential oil. **Future Microbiology**, v. 14, n. 14, p. 1179–1189, 2019.

RAMOS, H. *et al.* *Schinus terebinthifolius* Raddi: uma revisão bibliográfica associada a um estudo in silico. **Research Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e421111234262-e421111234262, 2022.

RIBEIRO, A. C. *et al.* Pink pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi): chemical composition, antimicrobial activity against foodborne pathogens, microencapsulation, biopreservation and sensorial acceptance in Minas Frescal cheese. **Journal of Food Science and Technology**, 2025.

ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; DAS GRAÇAS HENRIQUES, M. Antiinflammatory properties of *Schinus terebinthifolius* and its use in arthritic conditions. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**, p. 489–505, 2019.

SALEM, M. Z. M. *et al.* Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 119–127, 2018.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurina as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321–324, 2007.

SEIBERT, J. B. *et al.* Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 1, p. 5–14, 2018.

SELL, C. S. (Org.). **The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer**. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.

SEOW, Y. X. *et al.* Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625–644, 2014.

SHARMA, M. *et al.* Physico-chemical characterization of ultrasound assisted clove oil-loaded nanoemulsion: As enhanced antimicrobial potential. **Biotechnology Reports**, v. 34, p. e00720, 2022.

SILVA, M. M. *et al.* *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445–452, 2017.

SINGH, I. R.; PULIKKAL, A. K. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. **OpenNano**, v. 8, p. 100066, 2022.

SREEPIAN, A.; SREEPIAN, P. M. Antibacterial and antibiofilm efficacy of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil and its bioactives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of King Saud University–Science**, v. 37, 2025.

SRIVASTAVA, J. *et al.* Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 413–417, 2008.

SWAIN, S. S. *et al.* Nano-technology platforms to increase the antibacterial drug suitability of essential oils: A drug prospective assessment. **OpenNano**, v. 9, p. 100115, 2023.

TAVARES, T. M. B. *et al.* Nanoemulsions: a promising strategy in the fight against bacterial infections. **Medical Sciences Forum**, v. 18, p. 18–18, 2023.

TINH, N. Q. *et al.* Preparation of nanoemulsions from *Elsholtzia kachinensis* and *Elsholtzia ciliata* essential oils *via* ultrasonic homogenization and their antibacterial and anticancer activities. **RSC Advances**, v. 15, n. 14, p. 11243–11256, 2025.

ULIANA, M. P. *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235–240, 2016.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 8, p. 559–570, 2014.

WIŃSKA, K. *et al.* Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2130, 2019.

YAKOUBI, S. *et al.* Essential-oil-loaded nanoemulsion lipidic-phase optimization and modeling by response surface methodology (RSM). **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3149, 2021.

YANG, K. *et al.* Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. **Food Control**, v. 123, p. 107783, 2021.

YANG, Z. *et al.* Ultrasonication induced nano-emulsification of thyme essential oil: Optimization and antibacterial mechanism against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 133, p. 108609, 2022.

YAZGAN, H. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. **LWT**, v. 130, p. 109669, 2020.

YOUSEFI, S. *et al.* Mechanisms of nanoencapsulation to boost the antimicrobial efficacy of essential oils: A review. **Food hydrocolloids**, v. 150, p. 109655–109655, 1 2024.

YOUSEFI, M. *et al.* *Zingiber officinale* essential oil-loaded chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Fabrication, characterization and in-vitro antioxidant and antibacterial activities. **Food Science and Technology International**, v. 28, n. 7, p. 592–602, 2022.

ZHANG, T. *et al.* Chemical variation and environmental influence on essential oil of *Cinnamomum camphora*. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 973, 2023.

ZHENG, H. *et al.* Utilization of nanoemulsion to enhance antibacterial capacity of *Zanthoxylum bungeanum* pericarp essential oils against foodborne pathogenic bacteria. **LWT**, v. 207, p. 116657, 2024.

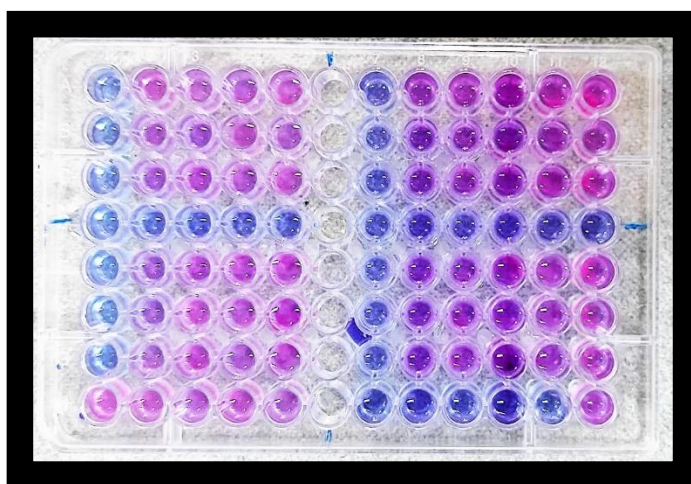
ZHOU, J. *et al.* Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

ZHU, C.-Y. *et al.* Antioxidant and antimicrobial PSE-like chicken protein isolate films

loaded with oregano essential oil nanoemulsion for pork preservation. **Food Chemistry**, v. 475, p. 143355, 2025.

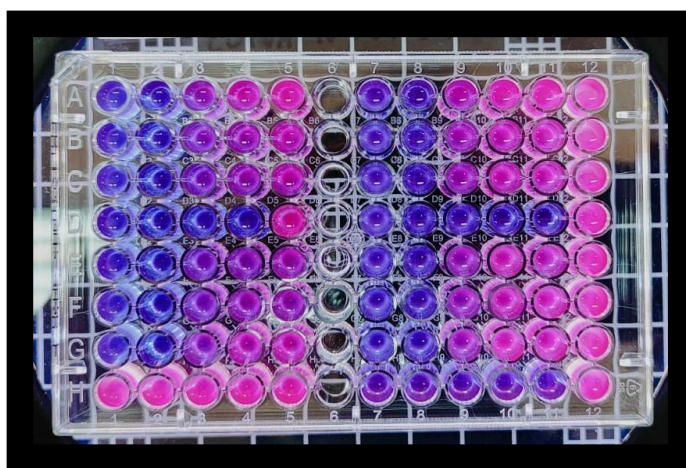
APÊNDICE A

Figura 9. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para *S. aureus*



Fonte: Autoria propria, 2025.

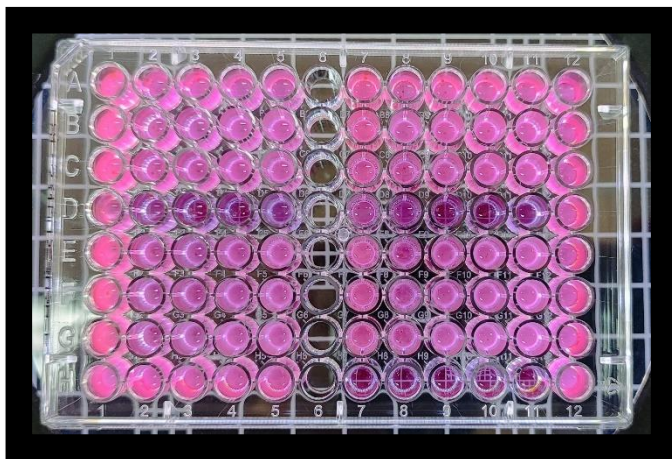
Figura 10. Placa de teste curva tempo morte nanoemulsão de vetiver para *S. aureus*



Fonte: Autoria propria, 2025.

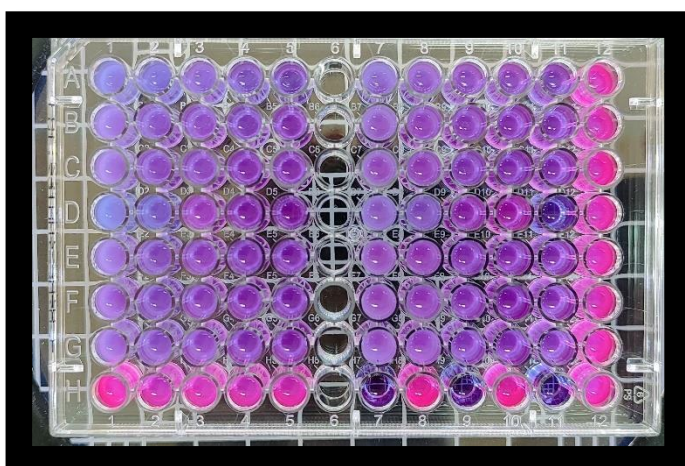
APÊNDICE B

Figura 11. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para *E.coli*



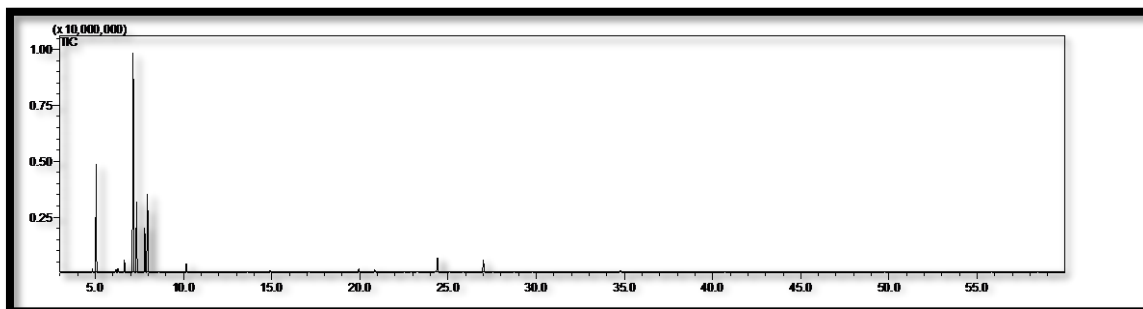
Fonte: Autoria propria, 2025.

Figura 12. Placa de teste curva tempo morte óleo essencial de vetiver para *E.coli*

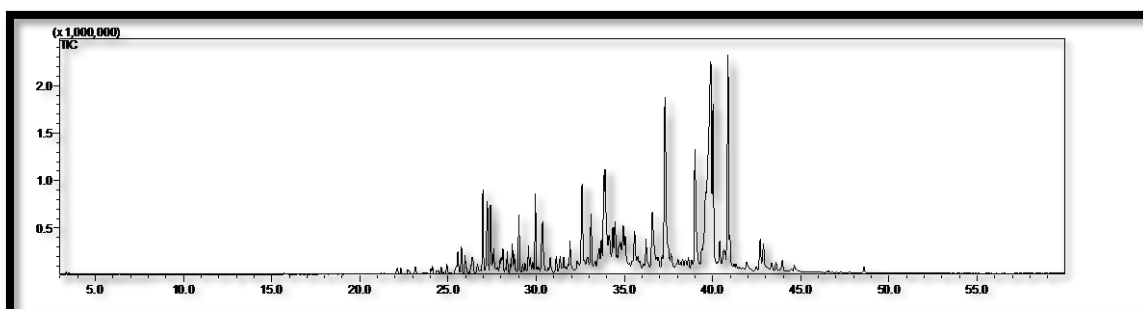


Fonte: Autoria propria, 2025.

APÊNDICE C

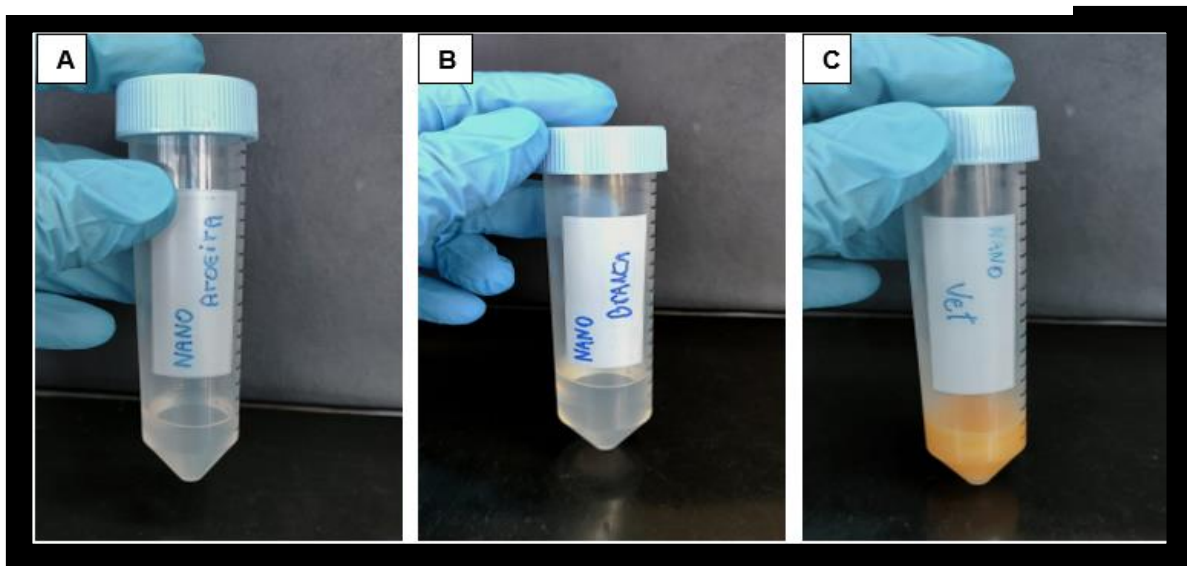
Figura 13. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial e aroeira

Fonte: Autoria propria, 2025.

Figura 14. Cromatograma GC-MS da amostra de óleo essencial de vetiver

Fonte: Autoria propria, 2025.

APÊNDICE D


Figura 15. Nanoemulsões produzidas



Fonte: Autoria própria, 2025.

Notas: A) nanoemulsão de aroeira; B) nanoemulsão branca; C) nanoemulsão de vetiver.







ANEXO 1 – comprovante de submissão do artigo

16/11/25, 22:14 Fwd: Submission Confirmation for Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of Chrysopogon z...

 Gmail

 Pesquisar e-mail
 

Escrever

<p>Caixa de entrada 3.121</p> <p>Com estrela</p> <p>Adiadas</p> <p>Enviados</p> <p>Rascunhos 131</p> <p>Compras 104</p> <p>Mais</p> <p>Marcadores</p>	<p>Your submission of Research Article entitled "Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of Chry Brazil" has been received by Chemistry and Biodiversity</p> <p>The submission number for your Research Article is cbdv.202503540.</p> <p>To check on the progress of your paper, please go to https://www.editorialmanager.com/chembiodiv/ and log in as an Author using : password. If you have forgotten your password, please use the "Send Access Credentials" option given on the login screen.</p> <p>If the manuscript is accepted for publication, this author's affiliation will be used to determine eligibility for some open access fundin</p> <p>This journal offers a number of license options; information about this is available here: https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Author/permissions/index.html</p> <p>The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of es that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the subm</p> <p>This message has been sent to all named co-authors listed in the submission process to serve as notification of submission.</p> <p>We will contact you again with the decision on this paper as soon as possible.</p> <p>Kind regards,</p> <p>Editorial Office Staff Chemistry and Biodiversity</p> <p>on behalf of</p> <p>Editorial Office Staff Chemistry and Biodiversity</p>
---	--

ANEXO 2 - artigo

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Nanoemulsions of *Chrysopogon zizanioides* and *Schinus terebinthifolius* Cultivated in Brazil

Bruno Alcântara do Prado,^{a,b} Daniel Oliveira Freire,^a Breno Noronha Matos,^b Rebeca Dias dos Santos,^{a,b} Carla Azevedo Bilac,^a Claudio Augusto Gomes da Camara,^c Marcilio Martins de Moraes,^c Livia Cristina Lira de Sá Barreto,^b Izabel Cristina Rodrigues da Silva,^a Guilherme Martins Gelfuso,^b Daniela Castilho Orsi^{*,a}

^a Laboratory of Quality Control, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^c Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence: Daniela Castilho Orsi (danielacastilhoorsi@gmail.com)

Abstract: This study evaluated the antimicrobial activity of *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) and *Schinus terebinthifolius* (aroeira) essential oils (EO) and their nanoemulsions, along with chemical characterization of the EO. The major compounds in *C. zizanioides* EO were the sesquiterpenes vetivenic acid (22.95%), α -vetivone (7.50%), khusimol (7.42%), and β -vetivone (5.63%), while *S. terebinthifolius* EO was rich in the monoterpenes α -phellandrene (35.96%), α -pinene (15.41%), limonene (14.39%), and δ -3-carene (10.70%). Nanoemulsion droplet sizes were 304.7 nm for vetiver and 105.7 nm for aroeira, with PDI values of 0.32 and 0.20, and zeta potentials of -0.82 mV and 0.33 mV, respectively. Vetiver nanoemulsion enhanced antimicrobial activity against *B. cereus*, *K. pneumoniae*, and *S. enterica*, while aroeira nanoemulsion increased activity against *B. cereus*, *K. pneumoniae*, and *E. coli*. These findings demonstrate that nanoemulsification is an effective strategy to potentiate the antimicrobial properties of vetiver and aroeira EO, improving their efficacy against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: nanoemulsion • *Chrysopogon zizanioides* essential oil • *Schinus terebinthifolius* essential oil • Minimum Inhibitory Concentration • time–kill curve.

Introduction

The plant *Chrysopogon zizanioides* (synonym *Vetiveria zizanioides*), commonly known as vetiver, is native to India but is distributed in other tropical countries. It is

mainly cultivated in India, Haiti, Indonesia, China, Madagascar, Brazil, and South Africa, and belongs to the Poaceae family. In traditional medicine, the root of this plant is used for its antiseptic properties in the treatment of skin infections, and it also exhibits anticancer, anti-inflammatory, and wound-healing properties. The essential oil of *C. zizanioides*, extracted from its roots, shows various biological activities, including antibacterial, antifungal, antiparasitic, and anti-inflammatory effects [1-3].

The plant *Schinus terebinthifolius* Raddi, commonly known in Brazil as aroeira and pink pepper, is native to Brazil and belongs to the Anacardiaceae family. In Brazilian folk medicine, *S. terebinthifolius* is used for the treatment of several health disorders due to its antiallergic, antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcer, and wound-healing properties. The essential oils extracted from the leaves and fruits of *S. terebinthifolius* exhibit numerous biological activities, including antibacterial, and antifungal effects [4, 5].

The antimicrobial activities of essential oils are widely studied, representing an alternative to enhance the action of antibiotics and contribute to reducing bacterial resistance [6]. The essential oils of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* contain a complex mixture of chemical compounds with recognized antimicrobial activity. The essential oil of *S. terebinthifolius* is rich in monoterpenes such as δ -3-carene, limonene, α -phellandrene, and α -pinene [7, 8]. The essential oil of *C. zizanioides* is mainly composed of sesquiterpenes, among which khusimol, α -vetivene, and β -vetivene are predominant [9]. Terpenes are the primary constituents of essential oils and have been widely reported to exhibit antimicrobial activity [6].

However, essential oils are lipophilic, volatile, and unstable compounds that can lose their biological activity when exposed to oxygen, light, or changes in temperature and pH. One strategy to preserve their biological activity is the formation of nanoemulsions, which are colloidal systems composed of two immiscible liquids (usually an oil phase and an aqueous phase) stabilized by surfactant agents. When these phases of distinct polarities are subjected to intense agitation or specific emulsification methods, dispersed droplets with nanometric diameters (20-500 nm) are formed, resulting in a stable system known as nanoemulsion. Nanoemulsions of essential oils exhibit antimicrobial activity because they can compromise the integrity of the bacterial cell wall or membrane, efficiently eliminating both Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens [10-13].

Thus, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils and nanoemulsions of *Chrysopogon zizanioides* and *Schinus terebinthifolius* cultivated in Brazil, as well as to perform the chemical characterization of the essential oils.

Results and Discussion

Table 1 presents the chemical composition of *C. zizanioides* essential oil. A total of 52 sesquiterpene compounds were identified, corresponding to 96.63% of the total essential oil composition. The main sesquiterpenes were vetivenic acid (22.95%), α -vetivone (7.50%), khusimol (7.42%), and β -vetivone (5.63%).

TABLE 1 Chemical composition of the essential oil from vetiver roots (*Cymbopogon zizanioides*)

Compounds	Class	Calculate RI	Literature RI	%
Silphiperfol-5,7(14)-diene	Sesquiterpene	1360	1358	0.28
α-Langene	Sesquiterpene	1374	1373	0.18
β-Bourbonene	Sesquiterpene	1389	1387	0.27
β-Elemene	Sesquiterpene	1392	1389	0.28
α-Cedrene	Sesquiterpene	1412	1410	0.06
β-Funebrene	Sesquiterpene	1416	1413	0.14
β-Copaene	Sesquiterpene	1433	1430	0.17
cis-α-Ambrinol	Sesquiterpene	1442	1439	0.28
Prezizaene	Sesquiterpene	1446	1444	0.99
Khusimene	Sesquiterpene	1456	1453	0.80
allo-Aromadendrene	Sesquiterpene	1460	1458	0.61
γ-Muurolene	Sesquiterpene	1479	1478	1.01
α-Amorphene	Sesquiterpene	1484	1483	2.49
cis-Eudesma-6,11-diene	Sesquiterpene	1493	1489	2.66

β-Vetispirene	Sesquiter pene	1494	1493	2.25
γ-Amorphene	Sesquiter pene	1495	1495	0.71
Nootkatene	Sesquiter pene	1519	1517	0.57
7-epi-α-Selinene	Sesquiter pene	1520	1520	0.66
trans-Calamenene	Sesquiter pene	1525	1521	0.39
γ-Vetivenene	Sesquiter pene	1534	1531	1.63
α-Copaen-11-ol	Sesquiter pene	1542	1539	0.24
α-Calacorene	Sesquiter pene	1547	1544	0.73
Selina-3,7(11)-diene	Sesquiter pene	1549	1545	0.21
Elemol	Sesquiter pene	1548	1548	2.20
β-Vetivenene	Sesquiter pene	1555	1554	2.33
Maaliol	Sesquiter pene	1569	1566	0.07
Germacrene D-4-ol	Sesquiter pene	1579	1574	0.48
Thujopsan-2-α-ol	Sesquiter pene	1588	1586	0.38
Thujopsan-2-β-ol	Sesquiter pene	1589	1588	0.30
cis-β-Elemenone	Sesquiter pene	1590	1589	0.82

Globulol	Sesquiter pene	1591	1590	3.05
Viridiflorol	Sesquiter pene	1594	1592	1.62
Fokienol	Sesquiter pene	1598	1596	0.47
Guaiol	Sesquiter pene	1603	1600	2.25
allo-Aromadendrene epoxide	Sesquiter pene	1644	1639	2.64
elin-11-en-4-α-ol	Sesquiter pene	1661	1658	0.92
epi-Zizanone	Sesquiter pene	1671	1668	1.25
Ishwarone	Sesquiter pene	1684	1680	0.93
Germacrone	Sesquiter pene	1695	1693	0.69
Eudesm-7(11)-en-4-ol	Sesquiter pene	1706	1700	1.17
Guaiol acetate	Sesquiter pene	1727	1725	0.83
Vetiselinenol	Sesquiter pene	1733	1730	3.10
Khusimol	Sesquiter pene	1744	1741	7.42
(E)-Isovalencenol	Sesquiter pene	1796	1793	5.56
Amorpha-4,7(11)-diene- 2-α-acetoxy	Sesquiter pene	1809	1805	1.72
Vetivenic acid	Sesquiter pene	1816	1811	22.90

β-Vetivone	Sesquiterpene	1825	1822	5.63
Khusinol acetate	Sesquiterpene	1828	1823	0.66
α-Vetivone	Sesquiterpene	1845	1842	7.50
α-Chenopodiol	Sesquiterpene	1859	1855	0.27
cis-Thujopsenic acid	Sesquiterpene	1867	1863	0.88
Flourensadiol	Sesquiterpene	1872	1869	0.93
Total of sesquiterpenes (%)				96.30

The chemical profile of the *C. zizanioides* essential oil obtained in this study is similar to the results reported by Burger et al. [14], who analyzed three commercial vetiver essential oils purchased from the agricultural cooperative for essential oils on Reunion Island and the main compounds identified were α -vetivone (8.4–13.3%), khusimol (0.6–8.9%), and β -vetivone (2.2–3.7%). Lunz and Stappen [9] conducted a comparative analysis of commercial essential oils obtained from *C. zizanioides* root samples from nine different countries (Brazil, China, Haiti, India, Java, Madagascar, Mexico, Reunion, and Salvador), with the main constituents being khusimol (3.4–13.7%), β -vetivone (2.2–7.1%), vetiselinol (1.3–7.8%), and α -vetivone (2.5–6.3%).

Table 2 presents the chemical composition of *S. terebinthifolius* essential oil. A total of 19 compounds were identified, including 5 sesquiterpenes (6.24%) and 14 monoterpenes (90.54%), accounting for 96.78% of the total essential oil composition.

The major compounds identified were the monoterpenes α -phellandrene (35.96%), α -pinene (15.41%), limonene (14.39%), and δ -3-carene (10.70%).

TABLE 2 Chemical composition of the essential oil from aroeira leaves (*Schinus terebinthifolius*)

Compounds	Class	Calculated RI	Literature RI	%
α -Thujene	Monoterpene	920	924	0.51
α -pinene	Monoterpene	930	932	15.41
α -Fenchene	Monoterpene	941	945	0.15
Sabinene	Monoterpene	965	969	0.56
β -Pinene	Monoterpene	970	972	0.65
Myrcene	Monoterpene	982	988	2.01
α -Phellandrene	Monoterpene	999	1002	35.96
δ -3-Carene	Monoterpene	1002	1008	10.70
α -Terpinene	Monoterpene	1011	1014	0.14
<i>o</i> -cymene	Monoterpene	1019	1020	7.21
Limonene	Monoterpene	1020	1024	14.39
γ -Terpinene	Monoterpene	1049	1054	0.09
Terpinolene	Monoterpene	1082	1086	1.70
trans-Sabinol	Sesquiterpene	1138	1137	0.49
δ -Elemene	Sesquiterpene	1337	1335	0.57
β -caryophyllene	Sesquiterpene	1413	1417	3.09
α -trans-Bergamotene	Sesquiterpene	1435	1432	0.23
γ -Cadinene	Sesquiterpene	1516	1513	2.69
trans-Cadinene ether	Sesquiterpene	1557	1557	0.23
Monoterpene				90.54
Sesquiterpene				6.24
Total (%)				96.78

Other studies in literature have reported similar results regarding the major compounds identified in the essential oil of *S. terebinthifolius* leaves and fruits. Marangoni et al. [15] conducted chemical analyses of essential oils extracted from the leaves of *S. terebinthifolius* collected in five Brazilian states and found that α -pinene and limonene were the predominant constituents, ranging from 11.66–19.45% and 8.52–22.34%, respectively. Ennigrou et al. [8] reported that the essential oil from *S. terebinthifolius* leaves collected in the Al Ghazala region, Ariana, northern Tunisia, contained α -phellandrene (33.10%), α -pinene (15.20%), limonene (6.60%), and β -phellandrene (4.80%) as the main compounds. Belhoussaine et al. [4] reported that the essential oil from *S. terebinthifolius* leaves collected in the Rabat region, Morocco, were rich in limonene (23.22%), β -ocimene (13.32%), and α -phellandrene (9.45%). Ribeiro et al. [7] analyzed the essential oil from *S. terebinthifolius* fruits collected in the southeastern region of Brazil (São Mateus, Espírito Santo State) and identified δ -3-carene (42.49%), limonene (15.37%), α -phellandrene (14.68%), and α -pinene (10.29%) as the major constituents.

Although quantitative variations are observed in the chemical profile of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* essential oils, the same compounds appear recurrently across different studies. These differences may be related to factors such as the extraction method, geographical origin, plant part used, and alterations in secondary metabolism, as well as to biosynthetic and accumulation processes influenced by abiotic factors such as temperature, circadian cycle, and soil nutrient availability [16].

The *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* nanoemulsions exhibited average droplet sizes of 304.7 nm and 105.7 nm, respectively (Table 3). For a formulation to be

classified as nanoscale, its droplet size should range between 20 and 500 nm. Therefore, the formulations developed in the present study possess droplet sizes appropriate to be considered nanoemulsions. Droplet size is one of the most critical properties of emulsions, as it directly influences system stability. Smaller droplets tend to exhibit greater resistance to coalescence, thereby contributing to the maintenance of nanoemulsion stability [17-19].

TABLE 3 Characterization of vetiver and aroeira nanoemulsions

Analysis	Nanoemulsions	
	Vetiver	Aroeira
Droplet size (nm)	304.7 ± 11.6 ^a	105.7 ± 0.95 ^b
Zeta potential (mV)	-0.83 ± 0.77 ^b	0.34 ± 0.21 ^a
PDI	0.32 ± 0.05 ^a	0.20 ± 0.02 ^b
pH	5.70 ± 0.08 ^a	6.24 ± 0.14 ^b

PDI, polydispersity index. Values represent mean ± standard deviation from triplicate analyses. Different letters within the same row indicate significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's test, with a 95% confidence level.

The droplet size results obtained in the present study are similar to those reported for nanoemulsions prepared with other essential oils. Sharma et al. [20] reported that a nanoemulsion containing *Eugenia caryophyllata* essential oil exhibited a droplet size of 279.0 nm. Yang et al. [21] developed a nanoemulsion with cinnamon essential oil, which presented a droplet size of 195.2 nm. Araújo et al. [22] formulated a nanoemulsion composed of quercetin, carrageenan, and tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*), obtaining a droplet size of 150 nm.

The *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* nanoemulsions exhibited zeta potentials of -0.83 and 0.34 mV, respectively, which are considered neutral values. This behavior is characteristic of nanoemulsions formulated with nonionic surfactants, as in the present study. These surfactants promote droplet stability mainly through steric hindrance, that is, by physically preventing the droplets from approaching and coalescing due to the presence of polymeric chains or hydrophilic groups that create a hydrated layer around the droplets. In contrast, ionic surfactants stabilize the system through electrostatic repulsion, imparting positive or negative charges to the droplets that repel each other. Therefore, while ionic surfactants rely on maintaining high zeta potential to prevent aggregation, nonionic surfactants can ensure stability even at zeta potential close to zero, owing to the predominance of steric effects [17, 23].

Neutral zeta potential results have been reported in nanoemulsions prepared with other essential oils. Morteza Semnani et al. [24] developed a nanogel containing cumin essential oil (*Cuminum cyminum*), which exhibited a zeta potential of -6.90 mV. Seibert et al. [25] obtained a nanoemulsion containing lemongrass essential oil (*Cymbopogon densiflorus*), which showed a zeta potential of -8.98 mV; despite being neutral, the system remained stable under accelerated stability testing. Similarly, Prakash et al. [26] formulated nanoemulsions with lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) and its major compound (citral), which exhibited neutral zeta potentials of -12.33 mV and -8.42 mV, respectively.

The polydispersity index (PDI) is parameter that also directly influences the formulation's stability and drug release behavior. The PDI is related to the homogeneity of droplet size distribution in nanoemulsions, indicating the degree of variation among

them. Its numerical value ranges from 0 to 1.00; values between 0 and 0.30 indicate that the nanoemulsion system exhibits a uniform size distribution [17, 27]. In the present study, the PDI values obtained were 0.20 for *S. terebinthifolius* nanoemulsion and 0.32 for *C. zizanioides* nanoemulsion, both indicating systems with a uniform droplet size distribution.

The PDI results obtained in this study are similar to those reported for nanoemulsions prepared with other essential oils. Yang et al. [28] observed PDI values ranging from 0.19 to 0.28 in nanoemulsions containing thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), which also exhibited antimicrobial activity. Seugling et al. [29] reported a PDI value of 0.23 for nanoemulsions containing *Baccharis dracunculifolia* essential oil, while Yazgan et al. [30] reported a lower PDI value of 0.12 for nanoemulsions formulated with sage essential oil (*Salvia officinalis*).

The *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* nanoemulsions showed pH values of 5.70 and 6.24, respectively. In general, essential oil nanoemulsions reported in the literature exhibit pH values ranging from 5.40 to 7.20 [31, 32], a range considered suitable for both pharmaceutical and cosmetic applications, as it minimizes the risk of skin irritation and helps maintain physicochemical characteristics such as particle size and zeta potential.

Table 4 presents the evaluation of the antimicrobial activity of the essential oils and nanoemulsions of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* against the different tested bacteria. In general, the *C. zizanioides* essential oil demonstrated higher antimicrobial activity compared to the *S. terebinthifolius* essential oil. The *C. zizanioides* essential

oil showed MIC values ranging from 0.10 to 6.30 $\mu\text{L/mL}$, with notable sensitivity observed for the Gram-positive bacteria *B. cereus* (MIC of 0.10 $\mu\text{L/mL}$ and MBC of 0.20 $\mu\text{L/mL}$) and *S. aureus* (MIC of 0.40 $\mu\text{L/mL}$ and MBC of 1.60 $\mu\text{L/mL}$). *S. terebinthifolius* essential oil exhibited higher MIC values, from 1.60 to 12.50 $\mu\text{L/mL}$, indicating lower antimicrobial activity.

TABLE 4 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of vetiver and aroeira essential oils and their nanoemulsions against the tested bacteria

Bacteria	Essential oils (EO) and nanoemulsions (NE)							
	Vetiver EO		Vetiver NE		Aroeira EO		Aroeira NE	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	($\mu\text{L/mL}$)							
<i>S. aureus</i>	0.40 ^c	1.60 ^b	1.60 ^b	3.10 ^a	3.10 ^a	>100	3.10 ^a	>100
<i>B. cereus</i>	0.10 ^e	0.20 ^d	0.05 ^f	3.10 ^b	1.60 ^c	12.50 ^a	0.04 ^f	0.08 ^e

<i>E. coli</i>	0.80 ^d	50.0 ^a	12.50 ^b	50.0 ^a	12.50 ^b	>100	3.10 ^c	>10 0
<i>S. enterica</i>	6.30 ^b	>100	0.80 ^d	>100	1.60 ^c	>100	6.30 ^b	50.0 ^a
<i>K. pneumoniae</i>	1.60 ^d	>100	0.80 ^e	>100	6.25 ^b	50.0 ^a	3.10 ^c	>10 0

Different letters in the same row indicate significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's test (95% confidence level).

These results suggest that the major compounds of *C. zizanioides* essential oil (composed of 96.63% sesquiterpene compounds, such as oxygenated sesquiterpenes and sesquiterpene hydrocarbons) possess higher antimicrobial activity than the predominant components of *S. terebinthifolius* essential oil (composed of 90.54% monoterpene compounds). Previous studies have indicated that oxygenated terpenes exhibit greater antimicrobial activity than hydrocarbon monoterpenes, such as limonene, terpinene, camphene, and pinene. Thus, the presence of oxygenated functional groups in terpenic molecules has been associated with enhanced antimicrobial efficacy. Therefore, the key determinants of the biological activity of essential oils include their chemical composition, the functional groups present in their active constituents, and the possible synergistic interactions among these compounds [33].

Studies in the literature have shown that the essential oils of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* exhibit greater antimicrobial activity against Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria. Vázquez-Sánchez, Cabo, and Rodríguez-Herrera [34] evaluated 19 different commercial essential oils against foodborne *S.*

aureus strains and found that the *C. zizanioides* essential oil produced in Spain showed high antimicrobial activity, with an MIC value of 0.70 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Jeddi et al. [35] reported that the *C. zizanioides* essential oil from the Taounate region of Morocco exhibited MIC values of 5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *S. aureus* and 10.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against the Gram-negative bacterium *S. enterica*. David et al. [1] found that *C. zizanioides* essential oil from Lanxi, Zhejiang, China, extracted by hydrodistillation, showed higher antimicrobial efficacy against *S. aureus* (MIC of 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and lower antimicrobial activity against *E. coli* (MIC of 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Salem et al. [36] reported that the essential oil of *S. terebinthifolius* from Antoniades Gardens, Alexandria, Egypt, had a chemical composition (α -phellandrene 32.80%) comparable to that of the present study (α -phellandrene 35.96%), with MIC values of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *S. aureus* and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *E. coli*. Dannenberg et al. [37] reported that the essential oil of *S. terebinthifolius* from Capão do Leão, Rio Grande do Sul State, Brazil, required less than 12 hours of contact time for the minimum bactericidal concentration (MBC) to act effectively against the Gram-positive bacterium *S. aureus*, while the Gram-negative bacteria *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium were not inhibited but showed significantly reduced growth. In addition, changes in membrane permeability and integrity were observed in all bacteria tested, indicating that cell wall damage is one of its mechanisms of action.

After nanoemulsification, an increase in antimicrobial efficacy was observed for both essential oils (*C. zizanioides* and *S. terebinthifolius*) against some of the tested bacteria. In the case of Gram-negative bacteria, the *C. zizanioides* nanoemulsion showed a reduction in MIC values for *S. enterica* (from 6.30 to 0.80 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and *K.*

pneumoniae (from 1.60 to 0.80 $\mu\text{L/mL}$), indicating improved antimicrobial activity against these species. Similarly, the *S. terebinthifolius* nanoemulsion also reduced MIC values against *E. coli* and *K. pneumoniae*, decreasing from 12.50 to 3.10 $\mu\text{L/mL}$ and from 6.25 to 3.10 $\mu\text{L/mL}$, respectively.

For the Gram-positive bacterium *B. cereus*, the *C. zizanioides* nanoemulsion exhibited a lower MIC (0.05 $\mu\text{L/mL}$) compared to the essential oil (0.10 $\mu\text{L/mL}$), indicating a stronger inhibitory effect. Similarly, the *S. terebinthifolius* nanoemulsion demonstrated a marked improvement in activity against *B. cereus*, with MIC decreasing from 1.60 to 0.04 $\mu\text{L/mL}$ and MBC from 12.50 to 0.08 $\mu\text{L/mL}$. In the case of *S. aureus*, nanoemulsification of *S. terebinthifolius* essential oil did not significantly affect antimicrobial activity, with MIC remaining at 3.10 $\mu\text{L/mL}$ for both forms. The *C. zizanioides* nanoemulsion showed reduced antimicrobial activity against *S. aureus* compared to its essential oil.

Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*) were more susceptible to both the essential oils and the nanoemulsions of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius*, exhibiting lower MIC values (0.04 to 3.10 $\mu\text{L/mL}$), whereas Gram-negative bacteria (*E. coli*, *S. enterica*, and *K. pneumoniae*) showed higher MIC values (0.80 to 12.50 $\mu\text{L/mL}$). These findings are consistent with the literature, which reports greater sensitivity of Gram-positive bacteria to natural compounds in essential oils due to the absence of the lipopolysaccharide outer membrane characteristic of Gram-negative bacteria. This outer membrane acts as a barrier to the entry of lipophilic compounds into the cells, reducing the antimicrobial efficacy of these compounds [38].

Overall, the results indicated that nanoemulsification of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* essential oils led to a significant increase in antimicrobial activity, particularly against Gram-negative bacterial strains. This effect can be attributed to the reduced particle size, which enhances the dispersion of the essential oil in the aqueous medium, increases the surface area of contact, and consequently facilitates the penetration of hydrophobic compounds through bacterial membranes, thereby potentiating their antimicrobial action [39, 40].

Other studies reported in the literature have also documented an increase in antimicrobial activity of nanoemulsions formulated with different essential oils. He et al. [41] demonstrated that nanoemulsification of thyme essential oil (*Thymus daenensis*) significantly increased its antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7, reducing the MIC from 4.0 mg/mL to 0.4 mg/mL. Tinh et al. [42] compared the antimicrobial activity of nanoemulsions and essential oils of *Elsholtzia kachinensis* and *Elsholtzia ciliata*. Both nanoemulsions showed higher antibacterial efficacy than their corresponding essential oils, with *E. ciliata* standing out, exhibiting MIC values for *S. aureus* (0.39 and 0.15 mg/mL), *E. coli* (0.93 and 0.46 mg/mL), and *Klebsiella pneumoniae* (0.46 and 0.31 mg/mL), corresponding to the pure essential oil and the nanoemulsion, respectively. Khani et al. [43] developed cumin essential oil (*Cuminum cyminum*) nanoemulsion and observed that the Gram-negative bacterium *K. pneumoniae* exhibited a low MIC value of 0.05 mg/mL.

Figure 1 shows the time–kill curves for different concentrations of *C. zizanioides* essential oil and its nanoemulsion (4.00×MIC, 2.00×MIC, 1.00×MIC, 0.50×MIC, and 0.25×MIC) against *S. aureus*.

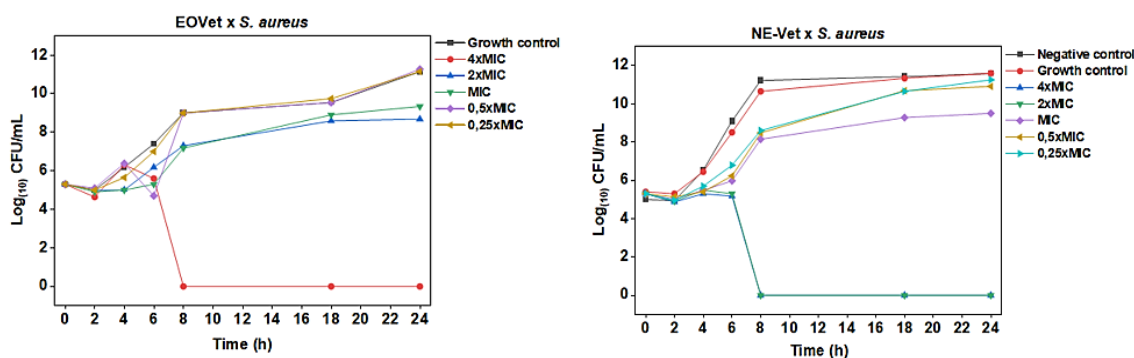


FIGURE 1 Time–kill curves of different concentrations of vetiver essential oil and its nanoemulsion against *S. aureus*. Growth results of *S. aureus* were expressed as the logarithm of colony-forming units per milliliter (Log_{10} CFU/mL) over 24 hours. EOVet, Vetiver essential oil; NE-Vet, Vetiver nanoemulsion. The tested concentrations included: positive bacterial growth control (bacterial inoculum and culture medium), negative control for antimicrobial activity (nanoemulsion with inert oil), and concentrations corresponding to $4.00\times\text{MIC}$, $2.00\times\text{MIC}$, $1.00\times\text{MIC}$, $0.50\times\text{MIC}$, and $0.25\times\text{MIC}$

It was observed that *C. zizanioides* essential oil at a concentration of $4.00\times\text{MIC}$ exhibited a bactericidal effect against *S. aureus* after 8 hours of incubation. Concentrations of $2.00\times\text{MIC}$ and $1.00\times\text{MIC}$ induced a partial reduction in bacterial viability, limiting microbial growth to levels lower than those observed in the positive growth control. In contrast, concentrations of $0.50\times\text{MIC}$ and $0.25\times\text{MIC}$ were not effective in preventing bacterial growth after 6 hours, highlighting the dose-dependent nature of *C. zizanioides* essential oil's antimicrobial activity against *S. aureus*.

Sreepian and Sreepian [44] reported similar results in a time–kill assay using lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*), showing a bactericidal effect against

S. aureus at 2.00×MIC within 8 hours. This rapid bactericidal effect is particularly relevant in a clinical context, as *S. aureus* can form biofilms and exhibit resistance to conventional treatments [45].

It was observed that *C. zizanioides* nanoemulsion at concentrations of 4.00×MIC and 2.00×MIC exhibited a bactericidal effect against *S. aureus* after 8 hours of incubation. The 1.00×MIC concentration caused a partial reduction in bacterial viability, limiting microbial growth to levels lower than those observed in the positive growth control. In contrast, concentrations of 0.50×MIC and 0.25×MIC were not effective in preventing bacterial growth after 8 hours. Thus, the nanoformulation of *C. zizanioides* essential oil enhanced its antibacterial activity, likely due to improved dispersion and increased contact area with the bacterial membrane. Consequently, this improves the solubility of lipophilic compounds and intensifies interactions with the lipid bilayer, resulting in structural disorganization, increased membrane permeability, and cell lysis [46].

Liu et al. [47] reported that nanoemulsions formulated with carvacrol exhibited greater antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* compared to pure carvacrol and commercial aqueous solutions, all tested at the same concentrations. Similarly, Jawaid et al. [48] observed significant inhibition of *S. aureus* growth, with treatment using a citronella essential oil nanoemulsion showing higher antimicrobial efficacy (reduction from 6.00 to 1.69 log CFU/mL) compared to the pure essential oil (reduction from 6.00 to 2.30 log CFU/mL) after 20 hours of incubation. Cecchini et al. [49] developed a nanoemulsion containing *Minthostachys verticillata* essential oil, which demonstrated enhanced antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 29213. In this study, nanoemulsion reduced the microbial load from 8.20 to 4.12 log CFU/mL, whereas the

pure essential oil caused a reduction from 8.17 to 5.35 log CFU/mL after 24 hours of incubation.

Figure 2 shows the time–kill curves for different concentrations of *C. zizanioides* essential oil and its nanoemulsion (4.00×MIC, 2.00×MIC, 1.00×MIC, 0.50×MIC, and 0.25×MIC) against *E. coli*.

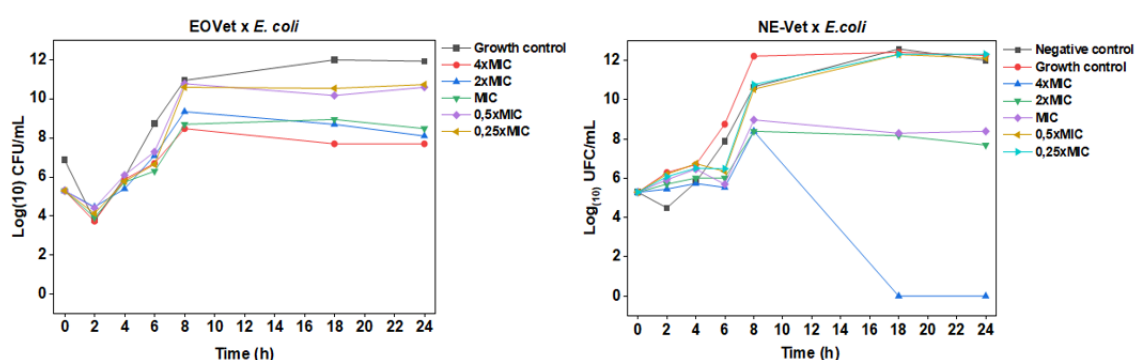


FIGURE 2 Time–kill curves of different concentrations of vetiver essential oil and its nanoemulsion against *E. coli*. Growth results of *E. coli* were expressed as the logarithm of colony-forming units per milliliter (Log_{10} CFU/mL) over 24 hours. EOVet, Vetiver essential oil; NE-Vet, Vetiver nanoemulsion. The tested concentrations included: positive bacterial growth control (bacterial inoculum and culture medium), negative control for antimicrobial activity (nanoemulsion with inert oil), and concentrations corresponding to 4.00×MIC, 2.00×MIC, 1.00×MIC, 0.50×MIC, and 0.25×MIC

Even at a concentration of 4.00×MIC, *C. zizanioides* essential oil did not exhibit a bactericidal effect against *E. coli* after 8 hours of incubation, with bacterial counts remaining above 7 log CFU/mL after 24 hours. Only a bacteriostatic effect was observed at concentrations of 4.00×MIC, 2.00×MIC, and 1.00×MIC. Thus, the Gram-negative bacterium *E. coli* showed lower sensitivity to *C. zizanioides* essential oil

compared to *S. aureus*, which aligns with the literature attributing this resistance to the presence of the lipopolysaccharide outer membrane characteristic of Gram-negative bacteria, acting as a barrier to the permeability of hydrophobic compounds such as those present in *C. zizanioides* essential oil [38].

In contrast, *C. zizanioides* nanoemulsion demonstrated superior antimicrobial activity against *E. coli* compared to *C. zizanioides* essential oil, exhibiting a bactericidal effect at 4.00×MIC after 18 hours of incubation, further reinforcing that nanoemulsified essential oil systems enhance antimicrobial efficacy. These findings are consistent with recent studies showing that essential oil-based nanoemulsions can overcome the penetration barriers imposed by the outer membrane of *E. coli*, resulting in a significant increase in bactericidal activity. Al-Asmari et al. [10] reported that a thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) nanoemulsion reduced *E. coli* by 5 log CFU/mL in just 2 hours in a time-kill assay. Similarly, Moghimi et al. [50] observed the bactericidal activity of a thyme nanoemulsion (*Thymus daenensis*), eliminating *E. coli* within 5 minutes, whereas the pure essential oil caused only a 1 log CFU/mL reduction in the same period.

Nirmal et al. [51] evaluated the antimicrobial activity of cinnamon essential oil nanoemulsion. It was observed that *E. coli*, a Gram-negative bacterium, was more susceptible to the nanoemulsion than *S. aureus*, and that the nanoemulsified formulation exhibited superior antimicrobial activity compared to the pure essential oil against all tested microorganisms. Porin-type proteins form channels in the outer membrane of Gram-negative bacteria, allowing the passage of hydrophilic molecules; however, these structures act as a selective barrier to lipophilic compounds, limiting

their penetration based on molecular size. In this context, incorporating the essential oil into a nanoemulsion system may enhance its interaction with membrane proteins, increasing antimicrobial efficacy, which could explain the greater susceptibility observed for *E. coli*.

Therefore, the results indicate that *C. zizanioides* nanoemulsion represents a promising formulation capable of enhancing the antimicrobial activity of essential oils, particularly against Gram-positive pathogens. The observed dose- and time-dependent profile underscores the need for further studies to explore new nanoemulsion system models, different excipients, intermediate concentrations, more detailed mechanisms of action, and efficacy in more complex biological models, including biofilms and organic matrices. Furthermore, considering the clinical relevance of *S. aureus* and *E. coli* to public health, the development of natural and technologically advanced alternatives represents a significant contribution to addressing antimicrobial resistance.

Conclusions

The present study demonstrated the potential of *Cymbopogon zizanioides* and *Schinus terebinthifolius* essential oils as natural antimicrobial agents, with *C. zizanioides* essential oil exhibiting the greatest efficacy, particularly against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Comparative analysis of the free essential oils and their respective nanoemulsions revealed that nanoemulsification enhanced antimicrobial activity, especially against Gram-negative bacterial strains. These findings indicate that nanoemulsions represent a viable and effective strategy to potentiate the antimicrobial properties of essential oils. Furthermore, the results highlight the importance of optimizing essential oil-based formulations, including adjustments in composition and

surfactant selection, as well as evaluation in more complex biological systems, to overcome cellular permeability barriers and broaden the antimicrobial spectrum.

Experimental

Essential Oils of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius*

The essential oils of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* were purchased from a commercial brand belonging to a company located in Santa Catarina, southern Brazil, with local production of the plants. The essential oils were extracted by steam distillation, from the roots for *C. zizanioides* and from the leaves for *S. terebinthifolius*, according to the manufacturer's protocols.

Chemical Composition Analysis of *C. zizanioides* and *Schinus terebinthifolius* Essential Oils.

Quantitative analysis by gas chromatography (GC-FID) was performed using a PerkinElmer Clarus 500 GC system (Waltham, MA, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and a non-polar fused silica capillary column DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). The oven temperature was programmed from 60 to 240 °C at a heating rate of 3 °C min⁻¹. The injector and detector temperatures were set at 260 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ in split mode (1:30). The injection volume was 1.0 μL of a diluted solution (1/100) of the oil in n-hexane. The amount of each compound was calculated from the peak areas obtained by GC-FID, in the order of elution on the DB-5 column and expressed as the relative percentage of the total chromatogram area.

Qualitative analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was performed using a Shimadzu GC-MS QP2010 SE Plus system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a selective mass detector, employing electron impact (EI) ionization at 70 eV, with a scan interval of 0.5 s and fragments ranging from 40 to 550 Da. The system used the same column and temperature program as employed in the GC-FID analysis, with the following parameters: carrier gas = helium; flow rate = 1 mL min⁻¹; split mode (1:30); and injection volume = 1 µL of a diluted solution (1/100) of the oil in n-hexane, automatically injected using the AOC-20i autosampler.

The identification of the components was based on the retention indices obtained by GC-MS, using a homologous series of n-alkanes C₈–C₄₀, calculated according to the Van den Dool and Kratz equation [52]. Identification was further confirmed by comparison with the mass spectral libraries of the GC-MS system (NIST 14 and WILEY 14th edition), co-injection with authentic standards, and comparison with published mass spectra [53]. The percentage areas were obtained from the GC-FID responses, without the use of an internal standard or correction factors.

Development of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* Nanoemulsions

The preparation of the nanoemulsions was carried out based on the method described by Ferreira-Nunes et al. [54], with adaptations. Essential oils of *S. terebinthifolius* and *C. zizanioides* were used as the oil phase at a concentration of 15% (v/v). The 15% concentration of both essential oils was above the MIC for all tested bacteria. The surfactants Labrasol (Merck, Darmstadt, Germany) and Plurol Oleique (Gattefossé, Saint-Priest, France) were mixed at a ratio of 4:1 under vigorous stirring, acting as

surfactant and co-surfactant, respectively, and the total surfactant concentration was maintained at 20% (v/v). The aqueous phase was prepared with 65% ultrapure water. A control formulation containing ethyl oleate (Merck, Darmstadt, Germany) was prepared under the same conditions.

The essential oil nanoemulsion was obtained in two steps. First, an emulsion was prepared using a vortex mixer for 10 minutes at 1000 rpm. Then, the surfactant mixture was added to the oil phase dropwise under vigorous stirring. Subsequently, the essential oil and surfactant mixture was continuously added dropwise to the ultrapure water under vigorous stirring. Next, a nanoemulsion was produced using an ultrasonic processor Vibra-Cell VC 750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, USA). The formulations were sonicated for 10 minutes, with each cycle consisting of 30-second pulses on and 30 seconds off [26]. To control the heat generated during sonication, a container with ice was placed under the sample vial. After preparation, the nanoemulsions were stored under refrigeration for subsequent analyses.

Characterization of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius* Nanoemulsions

Particle size (diameter), polydispersity index (PDI), and zeta potential were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Analyses were performed with 1 mL of each nanoemulsion immediately after preparation. Droplet size was determined using dynamic light scattering (DLS) techniques, and zeta potential was measured by electrophoretic mobility. The pH was measured using a digital pH meter, previously calibrated with a calibration solution, by immersing the electrode tip into the nanoemulsion samples at room temperature (27 °C).

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Essential Oils and Nanoemulsions of *C. zizanioides* and *S. terebinthifolius*

The following bacterial strains were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Gram-positive), and *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, and *Salmonella enterica* INCQS 00236 (Gram-negative). Bacteria were cultured in a bacteriological incubator at 37 °C on Mueller-Hinton agar for 24 hours prior to the assays. The bacterial inoculum was prepared to a turbidity equivalent to 0.5 on the McFarland scale ($\sim 10^8$ CFU/mL), adjusted to an optical density of 0.08–0.10 at 625 nm using a spectrophotometer with sterile 0.85% (w/v) saline solution. The bacterial inoculum was then diluted 1:100 in Mueller-Hinton broth to obtain a final concentration of 10^6 CFU/mL.

Essential oils and nanoemulsions were diluted in Mueller-Hinton broth to obtain a stock solution at a concentration of 10% (100 μ L/mL). For the essential oils, 2% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany) was added to improve solubility. A control nanoemulsion containing ethyl oleate (without essential oil) was tested under the same conditions as a negative control to verify potential antimicrobial activity of the formulation excipients.

MIC and MBC assays of the essential oils and nanoemulsions were performed using the broth microdilution method, following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [55], with adaptations. The stock solution of each essential oil and nanoemulsion was diluted to different concentrations in Mueller-Hinton broth by serial dilution (100 μ L/mL to 0.4 μ L/mL). A volume of 0.1 mL of bacterial

suspension at 1×10^6 CFU/mL was distributed into 96-well microtiter plates containing 0.1 mL of the different sample concentrations, resulting in a final bacterial concentration of 10^5 CFU/mL.

To determine MIC, bacterial growth was evaluated by adding 20 μ L of resazurin dye (0.01% w/v) to each well. Resazurin is a redox indicator used to assess cell growth. It is blue and non-fluorescent, turning pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases in viable cells [56]. The MIC was defined as the lowest concentration of essential oil that did not cause a color change, i.e., the lowest concentration that inhibited bacterial growth. To determine MBC, aliquots of 10 μ L of each incubated sample were plated on Mueller-Hinton agar and incubated for 24 hours at 37 °C. MBC was defined as the lowest concentration of essential oil that prevented visible bacterial growth on the agar.

Time-Kill Curve of the Nanoemulsion and Essential Oil of *C. zizanioides* against *S. aureus* and *E. coli*

Time-kill assays were performed using the essential oil with the highest antimicrobial activity (*C. zizanioides*) and its nanoemulsion against *S. aureus* and *E. coli*. Essential oils and nanoemulsions were tested at concentrations of 4.00×MIC, 2.00×MIC, 1.00×MIC, 0.50×MIC, and 0.25×MIC. The assays were conducted in flat-bottom 96-well microplates, with each well receiving 100 μ L of the diluted sample and 100 μ L of the bacterial inoculum, resulting in a final inoculum concentration of 10^5 CFU/mL and a total volume of 200 μ L per well.

For microbial growth control, each well received 100 μL of broth and 100 μL of bacterial inoculum. A control nanoemulsion containing ethyl oleate (without essential oil) was used as a negative control to verify whether the formulation components interfered with antimicrobial activity. Samples were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 18, and 24 h and plated on Mueller-Hinton agar, which was then incubated for 24 h at 37 °C. For data analysis, the number of colony-forming units (CFU) was expressed as \log_{10} (\log_{10} CFU/mL) and plotted against time [57].

Statistical Analysis

All assays were performed in triplicate, and results were expressed as the means of the analyses. Data was analyzed using STATISTICA® software, version 10.0. Analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences among means, and when differences were statistically significant, Tukey's test was applied for mean comparisons.

Acknowledgements

We thank Capes and FAPDF for their financial support.

Author Contribution Statement

Bruno Alcântara do Prado: methodology, investigation, writing - original draft preparation. **Daniel Oliveira Freire:** supervision, methodology, investigation. **Breno Noronha Matos:** supervision, methodology, investigation. **Rebeca Dias dos Santos:** methodology, investigation. **Carla Azevedo Bilac:** methodology, investigation. **Claudio Augusto Gomes da Camara:** supervision, methodology, investigation. **Marcilio Martins de Moraes:** supervision, methodology, investigation. **Livia Cristina Lira de Sá Barreto:** validation, formal analysis, resources, funding acquisition. **Izabel Cristina Rodrigues da Silva:** validation, formal analysis, resources, funding acquisition. **Guilherme Martins Gelfuso:** conceptualization, writing – review and editing, supervision. **Daniela Castilho Orsi:** conceptualization, formal analysis, writing – original draft preparation, writing – review and editing, supervision, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. A. David, F. Wang, X. Sun, H. Li, J. Lin, P. Li, and G. Deng, "Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash Essential Oil

Extracted by Carbon Dioxide Expanded Ethanol," *Molecules* 24 (2019): 1897.

2. A. Kannappan, S. Gowrishankar, R. Srinivasan, S. K. Pandian, and A. V. Ravi, "Antibiofilm Activity of *Vetiveria zizanioides* Root Extract against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *Microbial Pathogenesis* 110 (2017): 313–324.
3. Didier Fontanel, "In Vitro Antimicrobial Activity of Vetiver Root Essential Oil (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty), and Relationships with Their Major Chemical Compounds: A Review," *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 13 (2025): 45–55.
4. O. Belhoussaine, C. El Kourchi, H. Harhar, A. Bouyahya, A. El Yadini, F. Fozia, A. Alotaibi, R. Ullah, and M. Tabyaoui, "Chemical Composition, Antioxidant, Insecticidal Activity, and Comparative Analysis of Essential Oils of Leaves and Fruits of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2022): 4288890.
5. M. M. Costa da Silva, J. Bezerra de Araújo Neto, A. T. Lucas dos Santos, C. D. de Moraes Oliveira-Tintino, A. C. J. de Araújo, P. R. Freitas, L. E. da Silva, W. do Amaral, C. Deschamps, F. R. de Azevedo, *et al.*, "Antibiotic-Potentiating Activity of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Essential Oil against MDR Bacterial Strains," *Plants* 12 (2023): 1587.
6. S. Chouhan, K. Sharma, and S. Guleria, "Antimicrobial Activity of Some Essential Oils - Present Status and Future Perspectives," *Medicines* 4 (2017): 58.
7. A. C. Ribeiro, J. de Almeida Carminati, A. de Sousa Freitas, L. R. Ferreira, P. C. Bernardes, P. I. Silva, A. V. da Costa, and M. G. Bosi. "Pink Pepper Essential Oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical Composition, Antimicrobial Activity against Foodborne Pathogens, Microencapsulation, Biopreservation and Sensorial Acceptance in Minas Frescal Cheese." *Journal of Food Science and Technology* 62 (2025): 2155–2164.
8. A. Ennigrou, H. Casabianca, E. Vulliet, B. Hanchi, and K. Hosni, "Assessing the Fatty

- Acid, Essential Oil Composition, Their Radical Scavenging and Antibacterial Activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi Leaves and Twigs,” *Journal of Food Science and Technology* 55 (2018): 1582–1590.
9. K. Lunz and I. Stappen. “Back to the Roots: An Overview of the Chemical Composition and Bioactivity of Selected Root-Essential Oils.” *Molecules* 26 (2021): 3155.
 10. F. Al-Asmari, P. Koirala, N. B. Rathod, T. M. Alnemr, S. A. Asiri, M. Y. Babeker, L. Li, and N. P. Nirmal, “Antimicrobial Activity of Formulated *Origanum* and Thyme Essential Oil Nanoemulsions: A Comparative Study,” *Current Nutrition & Food Science* 20 (2024): 757–766.
 11. R. Krishnamoorthy, J. Athinarayanan, V. S. Periasamy, A. R. Adisa, M. A. Al-Shuniaber, M. A. Gassem, and A. A. Alshatwi. “Antimicrobial Activity of Nanoemulsion on Drug-Resistant Bacterial Pathogens.” *Microbial Pathogenesis* 120 (2018): 85–96.
 12. J. Lan, J. Zou, H. Xin, J. Sun, T. Han, M. Sun, and M. Niu, “Nanomedicines as Disruptors or Inhibitors of Biofilms: Opportunities in Addressing Antimicrobial Resistance,” *Journal of Controlled Release* 381 (2025): 113589.
 13. G. Muteeb, “Nanotechnology: A Light of Hope for Combating Antibiotic Resistance,” *Microorganisms* 11 (2023): 1489.
 14. P. Burger, A. Landreau, M. Watson, L. Janci, V. Cassisa, M. Kempf, S. Azoulay, and X. Fernandez, “Vetiver Essential Oil in Cosmetics: What Is New?” *Medicines* 4 (2017): 41.
 15. J. A. Marangoni, J. V. da Costa Pinto, C. A. L. Kassuya, P. C. de Oliveira Junior, S. M. Dos Santos, C. A. L. Cardoso, R. M. M. F. Silva, M. Espíndola da Silva, C. D. Machado, J. Manfron, and A. S. N. Formagio, “Geographical Variation in the Chemical Composition, Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil, Micromorphology and Histochemistry of *Schinus terebinthifolia* Raddi,” *Journal of Ethnopharmacology* 301 (2023): 115786.

16. T. Zhang, Y. Zheng, C. Fu, H. Yang, X. Liu, F. Qiu, X. Wang, and Z. Wang, "Chemical Variation and Environmental Influence on Essential Oil of *Cinnamomum camphora*," *Molecules* 28 (2023): 973.
17. E. Hanan, A. H. Dar, R. Shams, and G. Goksen, "New Insights into Essential Oil Nanoemulsions Loaded with Natural Biopolymers: Recent Development, Formulation, Characterization and Packaging Applications - A Comprehensive Review," *International Journal of Biological Macromolecules* 280 (2024): 135751.
18. X. Hou and J. J. Sheng. "Properties, Preparation, Stability of Nanoemulsions, Their Improving Oil Recovery Mechanisms, and Challenges for Oil Field Applications: A Critical Review." *Geoenergy Science and Engineering* 221 (2023): 211360.
19. A. Kumar, R. Kanwar, and S. K. Mehta. "Nanoemulsion as an Effective Delivery Vehicle for Essential Oils: Properties, Formulation Methods, Destabilizing Mechanisms and Applications in Agri-Food Sector." *Next Nanotechnology* 7 (2024): 100096–100096.
20. M. Sharma, B. Mann, R. Pothuraju, R. Sharma, and R. Kumar, "Physico-Chemical Characterization of Ultrasound-Assisted Clove Oil-Loaded Nanoemulsion: An Enhanced Antimicrobial Potential," *Biotechnology Reports* 34 (2022): e00720.
21. K. Yang, A. Liu, A. Hu, J. Li, Z. Zen, Y. Liu, S. Tang, and C. Li, "Preparation and Characterization of Cinnamon Essential Oil Nanocapsules and Comparison of Volatile Components and Antibacterial Ability of Cinnamon Essential Oil before and after Encapsulation," *Food Control* 123 (2021).
22. M. C. Araujo, D. D. C. Souza, A. Dos Santos Rosa, V. N. Dos Santos Ferreira, L. Mazzarino, B. Veleirinho, M. D. Miranda, and Maraschin. "Green Antiseptic for Hand Hygiene with High Activity against SARS-CoV-2: Iota-Carrageenan, Quercetin, and Melaleuca Alternifolia Essential Oil Based Nanoemulsion." *International Journal of Biological Macromolecules* 305 (2025): 140920.
23. Preeti, S. Sambhakar, R. Malik, S. Bhatia, A. Al Harrasi, C. Rani, R. Saharan, S. Kumar,

- Geeta, and R. Sehrawat, "Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs," *Scientifica* (2023): 6640103.
24. K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, J. Akbari, M. Eghbali, A. Babaei, S. M. H. Hashemi, and A. Nokhodchi, "Development of a Novel Nanoemulgel Formulation Containing Cumin Essential Oil as Skin Permeation Enhancer," *Drug Delivery and Translational Research* 12 (2022): 1455–1465.
25. J. B. Seibert, I. V. Rodrigues, S. P. Carneiro, et al., "Seasonality Study of Essential Oil from Leaves of *Cymbopogon densiflorus* and Nanoemulsion Development with Antioxidant Activity," *Flavour and Fragrance Journal* 34 (2019): 5–14.
26. A. Prakash, R. Baskaran, P. Nithyanand, et al., "Effect of Nanoemulsification on the Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Selected Spice Essential Oils and Their Major Constituents against *Salmonella enterica* Typhimurium," *Journal of Cluster Science* 31 (2020): 1123–1135.
27. M. J. Nirmala, L. Durai, V. Gopakumar, and R. Nagarajan, "Preparation of Celery Essential Oil-Based Nanoemulsion by Ultrasonication and Evaluation of Its Potential Anticancer and Antibacterial Activity," *International Journal of Nanomedicine* 15 (2020): 7651
28. Z. Yang, Q. He, B. B. Ismail, Y. Hu, and M. Guo. "Ultrasonication Induced Nano-Emulsification of Thyme Essential Oil: Optimization and Antibacterial Mechanism against *Escherichia coli*." *Food Control* 133, (2022): 108609.
29. J. Seugling, S. Kuhnen, G. P. de Barros, M. B. Velerinho, L. Mazzarino, and P. A. Bricarello. "Development of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) Essential Oil Nanoemulsion and Its Biological Activity on Pre-Pupae of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7, (2019): 293–308.
30. H. Yazgan. "Investigation of Antimicrobial Properties of Sage Essential Oil and Its Nanoemulsion as Antimicrobial Agent." *LWT* 130 (2020): 109669.

31. A. Prakash, R. Baskaran, N. Paramasivam, and V. Vadivel. "Essential Oil Based Nanoemulsions to Improve the Microbial Quality of Minimally Processed Fruits and Vegetables: A Review." *Food Research International* 111 (2018): 509–523.
32. Yakoubi, I. Kobayashi, K. Uemura, M. Nakajima, H. Isoda, R. Ksouri, M. Saidani-Tounsi, and M. A. Neves. "Essential-Oil-Loaded Nanoemulsion Lipidic-Phase Optimization and Modeling by Response Surface Methodology (RSM): Enhancement of Their Antimicrobial Potential and Bioavailability in Nanoscale Food Delivery System." *Foods* 10, (2021): 3149.
33. A. C. Guimarães, L. M. Meireles, M. F. Lemos, M. C. C. Guimarães, D. C. Endringer, M. Fronza, and R. Scherer. "Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils." *Molecules* 24, (2019): 2471.
34. D. Vázquez-Sánchez, M. L. Cabo, and J. J. Rodríguez-Herrera. "Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Staphylococcus aureus* Biofilms." *Food Science and Technology International* 21, (2014): 559–570.
35. M. Jeddi, K. Fikri-Benbrahim, N. El Hachlafi, N. Benkhaira, A. Aboussemdai, and Z. B. Ouaritini. "Chemical Composition of *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum* and *Vetiveria zizanoides* Essential Oils and Their Antibacterial and Antioxidant Activities." *Tropical Journal of Natural Product Research* 7, (2023): 2244–2250.
36. M. Z. M. Salem, M. El-Hefny, H. M. Ali, H. O. Elansary, R. A. Nasser, A. A. A. El-Settawy, N. El Shanhorey, N. A. Ashmawy, and A. Z. M. Salem. "Antibacterial Activity of Extracted Bioactive Molecules of *Schinus terebinthifolius* Ripened Fruits against Some Pathogenic Bacteria." *Microbial Pathogenesis* 120 (2018): 119–127.
37. G. D. Dannenberg, G. D. Funck, W. P. da Silva, and Â. M. Fiorentini. "Essential Oil from Pink Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical Composition, Antibacterial Activity and Mechanism of Action." *Food Control* 95 (2019): 115–120.
38. J. Zhou, Y. Cai, Y. Liu, H. An, K. Deng, M. A. Ashraf, L. Zou, and J. Wang. "Breaking Down the Cell Wall: Still an Attractive Antibacterial Strategy." *Frontiers in Microbiology*

13 (2022): 952633.

39. U. M. G. Bolgen, S. D. Kayiran, Y. Ozogul, and F. Ozogul. "Essential Oil-Based Nanoemulsions with Current Knowledge: Formulation, Characterization, and Applications in Food and Pharmaceuticals." *Industrial Crops and Products* 233 (2025): 121411.
40. S. D. Kayiran, U. M. G. Bolgen, T. Cevikelli, S. Kızılyıldırım, B. Yıldır, E. Ferahoglu, S. Kırıcı, and F. Ozogul. "Chemical Composition and Antibacterial Properties of Microemulsion and Microemulgel Formulations Containing *Lavandula angustifolia* Mill. Essential Oils." *Industrial Crops and Products* 226 (2025): 120654.
41. Q. He, M. Guo, T. Z. Jin, S. A. Arabi, and D. Liu. "Ultrasound Improves the Decontamination Effect of Thyme Essential Oil Nanoemulsions against *Escherichia coli* O157:H7 on Cherry Tomatoes." *International Journal of Food Microbiology* 337 (2021): 108936.
42. N. Q. Tinh, D. Van Thanh, N. Van Thu, B. T. Quynh Nhung, P. Ngoc Huyen, N. Phu Hung, N. Thi Thuy, P. Dieu Thuy, N. Hoa Mi, and K. Thi Tam. "Preparation of Nanoemulsions from *Elsholtzia kachinensis* and *Elsholtzia ciliata* Essential Oils via Ultrasonic Homogenization and Their Antibacterial and Anticancer Activities." *RSC Advances* 15, (2025): 11243–11256.
43. F. Hosseinali Khani, A. Yazdinezhad, S. Sadighian, and M. Mohseni. "Development and Characterization of Cumin Oil-Nanoemulsions and Its Enhanced Antibacterial Activity against Some Bacteria." *Journal of Advanced Medical and Biomedical Research* 32 (2024): 427–437.
44. A. Sreepian and P. M. Sreepian. "Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Essential Oil and Its Bioactives against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of King Saud University–Science* 37 (2025): 1582025.
45. M. Michalik, A. Podbielska-Kubera, and A. Dmowska-Koroblewska. "Antibiotic

Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains: Searching for New Antimicrobial Agents – Review.” *Pharmaceuticals* 18, no. 1 (2025): 81.

46. H. Zheng, S. Chen, Z. Liu, G. Zhou, X. Zhang, S. Kang, Q. Hua, Y. Wu, and Z. Liu. “Utilization of Nanoemulsion to Enhance Antibacterial Capacity of *Zanthoxylum bungeanum* Pericarp Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria.” *LWT* 207 (2024): 116657.
47. Q. Liu, Z. Wang, A. Mukhamadiev, J. Feng, Y. Gao, X. Zhuansun, R. Han, Y. Chong, and S. M. Jafari. “Formulation Optimization and Characterization of Carvacrol-Loaded Nanoemulsions: In Vitro Antibacterial Activity/Mechanism and Safety Evaluation.” *Industrial Crops and Products* 181 (2022): 114816.
48. T. Jawaid, A. M. Alaseem, M. M. Khan, B. Mukhtar, M. Kamal, R. Anwer, S. Ahmed, and A. Alam. “Preparation and Evaluation of Nanoemulsion of Citronella Essential Oil with Improved Antimicrobial and Anti-Cancer Properties.” *Antibiotics* 12, (2023): 478.
49. M. E. Cecchini, C. Paoloni, N. Campra, N. Picco, M. C. Grosso, M. L. Soriano Perez, F. Alustiza, N. Cariddi, and R. Bellingeri. “Nanoemulsion of *Minthostachys verticillata* Essential Oil: In-Vitro Evaluation of Its Antibacterial Activity.” *Heliyon* 7, (2021): e05896.
50. R. Moghimi, L. Ghaderi, H. Rafati, A. Aliahmadi, and D. J. McClements. “Superior Antibacterial Activity of Nanoemulsion of *Thymus daenensis* Essential Oil against *E. coli*.” *Food Chemistry* 194 (2016): 410–415.
51. N. P. Nirmal, P. Chunhavacharatorn, A. C. Khanashyam, L. Li, and F. Al-Asmari. “Cinnamon Bark Oil in Water Nanoemulsion: Formulation, Characterization, and Antimicrobial Activities.” *LWT* 179 (2023): 114671.
52. H. Van Den Dool and P. D. Kratz. “A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 11 (1963): 463–471.
53. R. P. Adams. *Identification of Essential Oil Components by Gas*

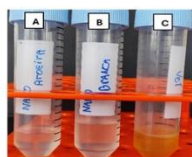
Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4.1th ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2017.

54. R. Ferreira-Nunes, S. M. M. da Silva, P. E. N. de Souza, P. de O. Magalhães, M. Cunha-Filho, T. Gratieri, and G. M. Gelfuso. "Incorporation of *Eugenia dysenterica* Extract in Microemulsions Preserves Stability, Antioxidant Effect and Provides Enhanced Cutaneous Permeation." *Journal of Molecular Liquids* 265 (2018): 408–415.
55. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017, 2018.
56. S. D. Sarker, L. N. Nahar, and Y. Kumarasamy. "Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and Its Application in the In Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals." *Methods* 42 (2007): 321–324.
57. A. L. Leber. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM Press, 2016.

Entry for the Graphical Illustration



Vetiver (*C. zizanioides*) Aroeira (*S. terebinthifolius*)



A) Aroeira nanoemulsion; B) Ethyl oleate nanoemulsion; and C) Vetiver nanoemulsion

