

GIOVANNA MOURA SILVA

**Desenvolvimento de Nanoformulações contendo Óleos Essenciais para
uso em Agricultura para Controle de *Pratylenchus brachyurus***

Sorocaba
2025

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

**ciências
ambientais**

GIOVANNA MOURA SILVA

**Desenvolvimento de Nanoformulações contendo Óleos Essenciais para
uso em Agricultura para Controle de *Pratylenchus brachyurus***

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestra em Ciências
Ambientais da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" na Área de
Concentração de Diagnóstico, Tratamento e
Recuperação ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes
Fraceto

Sorocaba
2025

S586d

Silva, Giovanna Moura

Desenvolvimento de nanoformulações contendo óleos essenciais para uso em agricultura para controle de *Pratylenchus brachyurus* / Giovanna Moura Silva. -- Sorocaba, 2025

109 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto

1. Agricultura. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Nanotecnologia. 4. Pragas agrícolas - Controle. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de Nanoformulações contendo Óleos Essenciais para uso em Agricultura para Controle de *Pratylenchus brachyurus*

AUTORA: GIOVANNA MOURA SILVA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia / UNESP - Sorocaba

Prof. Dr. ADRIANO ARRUE MELO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Santa Maria / Santa Maria/RS

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Sorocaba, 10 de fevereiro de 2025

Aos meus pais, Roseli e Ricardo, ao meu
namorado Pietro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a espiritualidade amiga que me permitiram estar aqui.

Aos meus pais e as minhas irmãs por todo o apoio, incentivo e ajuda incondicional nessa jornada desde o início.

Ao meu namorado Pietro, por toda a compreensão, carinho, apoio, ajuda e amor nessa caminhada.

Ao Professor Dr. Leonardo pela oportunidade concedida, por acreditar e incentivar o projeto, pela orientação e por todo o conhecimento transmitido.

A professora Dra. Sílvia, pelo incentivo e por me fazer acreditar.

As minhas amigas Estefânia e Patrícia, por todos os conhecimentos passados, ajuda, paciência e conselhos nessa caminhada.

Aos meus amigos de laboratório Jéssica, Maria Vitória, Anderson e Jhones por proporcionarem um ambiente descontraído e acolhedor.

As minhas amigas de longa data Hanna e Vanessa por todo o apoio, suporte e auxílio.

Aos meus amigos da pós-graduação que sempre estavam disposto a acolher, ajudar e apoiar.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, por proporcionarem uma estrutura de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio do subsídio com processo nº 2023/05321-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A Prof. Dra. Daiana Ávila, Dra. Natália Jardim da Silva, Me. Matteus Teixeira Guerra por todo o auxílio na pesquisa, ensaios e análise com o *Caenorhabditis elegans*.

Ao Prof. Dr. Mario Massayuki Inomoto, Ma. Eduarda Kalena Kirch de Ramos, Engº Miqueias Santos de Assis, e Me. Bruno Scentinela Jacintho Paes por todo o auxílio na pesquisa, ensaios e análise com o *Pratylenchus brachyurus*.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender
mais para temer menos”

(Marie Skłodowska Curie)

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) representam um grande desafio para as culturas agrícolas, causando perdas anuais de US\$215 bilhões, o que representa 12,6% das perdas de colheitas. Os nematicidas químicos têm sido uma estratégia comum de controle dentro do manejo integrado, mas, métodos mais sustentáveis têm sido buscados, incluindo óleos essenciais (OEs) de plantas. Apesar do potencial, os OEs possuem limitações, como alta volatilidade, baixa solubilidade aquosa e degradação por fatores ambientais. Uma forma de mitigar essas limitações é a associação desses OEs com nanotecnologia. Sob essa perspectiva, este projeto visou o desenvolvimento de nanoformulações de caseína-pectina para o encapsulamento de duas misturas de óleos essenciais: tomilho-branco (*Thymus vulgaris*) e manjerona (*Origanum majorana*); capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) e orégano (*Origanum vulgare*), com o objetivo de controlar nematoides de importância agrônômica. Foram realizadas análises de caracterização físico-química, estabilidade, eficiência de encapsulação, citotoxicidade, fitotoxicidade e efetividade do controle de nematoides. As nanopartículas preparadas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio variando de 422 a 650 nm, índice de polidispersão de 0,3 a 0,4, potencial zeta de -32 a -29 mV e com eficiência de encapsulação acima de 90%. Estudos de citotoxicidade com fibroblastos (3T3), mostraram uma diminuição da viabilidade celular, de forma concentração-dependente para os óleos essenciais. Nos testes de fitotoxicidade, a nanoformulação contendo a mistura de OEs de capim-limão e orégano demonstrou não ter efeitos fitotóxicos nas concentrações testadas em soja (*Glycine max* L.). A nanoformulação contendo a mistura de OEs de capim-limão e orégano também demonstrou atividade nematicida significativa, reduzindo 50,7% da população de nematoides *Caenorhabditis elegans* nos ensaios de sobrevivência. Além disso, apresentou redução significativa da motilidade em $63,83 \pm 29,6\%$, aumento no estresse oxidativo de $223,7 \pm 16,7\%$, além de demonstrar diminuição significativa no tamanho da ninhada com $120,5 \pm 22,1$ n° de juvenis em relação ao controle de $160,8 \pm 12,8$ n° de juvenis. Nos ensaios com *Pratylenchus brachyurus* a nanoformulação contendo a mistura de OEs de capim-limão e orégano demonstrou toxicidade para o nematoide, diminuindo significativamente sua população final para 4594,9 indivíduos em relação a testemunha que apresentou 9834,5 indivíduos. No Ensaio 2, a nanoformulação aumentou significativamente a produção média de vagens para $13,5 \pm 2,17$, enquanto testemunha foram observados $8,2 \pm 4,7$ vagens. Além disso, houve um aumento significativo na média da massa de grãos, obtendo-se $1,65 \pm 0,6$ g, em comparação com a testemunha, que apresentou $0,9 \pm 0,6$ g. Deste modo, as nanopartículas demonstraram efetividade no organismo alvo, o que demonstra o potencial dos óleos essenciais, possibilitando estudos futuros com o aumento das concentrações dos óleos essenciais para uma efetividade maior no *Pratylenchus brachyurus*.

Palavras-chave: Agricultura, nematoides parasitas de planta, nanopartícula.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes (PPNs) pose a significant challenge to agricultural crops, causing annual losses of \$215 billion (12.3% of total crop losses). Chemical nematicides have been a common control strategy within integrated management, however, more sustainable methods have been sought, including essential oils (EOs) derived from plants. Despite their potential, EOs have limitations such as high volatility, low solubility, and degradation by environmental factors. An approach to mitigate the limitations is to combine essential oils and nanotechnology. From this perspective, this study aimed to develop casein-pectin-based nanoformulations loaded with two essential oils mixtures, white thyme (*Thymus vulgaris*) and marjoram (*Origanum marjorana*); lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and oregano (*Origanum vulgare*), with the goal of controlling nematodes of agronomic importance. Physicochemical characterization, stability, encapsulation efficiency, cytotoxicity and effectiveness in nematode control analysis were performed. The prepared nanoparticles presented an average hydrodynamic diameter of 415 to 650 nm, a polydispersity index of 0.3 to 0.4, a zeta potential of -32 to -29 mV, and encapsulation efficiency above 90%. Cytotoxicity studies using fibroblasts (3T3) revealed a concentration-dependent decrease in cell viability due to the essential oils. In phytotoxicity tests, the nanoformulation containing the EO mixture of lemongrass and oregano didn't show phytotoxic effects at the concentrations tested in soybean (*Glycine max* L.). These same nanoformulations also exhibited significant nematicidal activity, reducing the *Caernohabditis elegans* population by 50.7% in survival assays. Additionally, it significantly reduced motility by $63.83 \pm 29.6\%$, induced oxidative stress by $223.7 \pm 16.7\%$, and led to a significant reduction in brood size, with 120.5 ± 22.1 juveniles compared to the control group with 160.8 ± 12.8 juveniles. In trials with *Pratylenchus brachyurus*, the nanoformulation containing the EO mixture of lemongrass and oregano showed toxicity to the nematode in Trial 2, significantly reducing its final population to 4,594.9 individuals compared to the control, which had 9,834.5 individuals. In Trial 2, the nanoformulations significantly increased average pod production to 13.5 ± 2.17 , while the control showed 8.2 ± 4.7 pods. Furthermore, there was a significant increase in average grain mass, reaching 1.65 ± 0.6 g compared to the control, which had 0.9 ± 0.6 g. Thus, the nanoparticles proved to be effective against target organisms, demonstrating the potential of essential oils and enabling future studies with higher essential oils concentration for greater effectiveness against *Pratylenchus brachyurus*.

Keywords: Agriculture, plant parasitic nematodes, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de um nematoide parasita de plantas, mostrando todos os estádios do ciclo: ovos, quatro estádios de juvenis (J1, J2, J3, J4), e a fase adulta. Criado com o BioRender.com.	23
Figura 2. Esquemática do manejo integrado de nematoides, com os métodos de cultura, controle biológico, controle químico, modificação genética e manejo integrado. Criado com Biorender.com	27
Figura 3. Estruturas químicas dos principais componentes dos óleos essenciais de: tomilho-branco e orégano em (A) Timol e em (B) Carvacrol; manjerona em (C) terpinen-4-ol; e capim-limão em (D) Geranial e (E) Neral.	32
Figura 4. Esquemática da estrutura da pectina, com a cadeia de polissacarídeos: homogalacturonana, ramnogalacturonana I, ramnogalacturonana II, e xylogaracturonana. Criado com o Biorender.com.....	34
Figura 5. Estrutura química da caseína.....	36
Figura 6. Esquemática da metodologia de preparação das nanopartículas utilizando a metodologia de Hua et al (2021), com alterações. Criado com Biorender.com.....	42
Figura 7. Esquemática de metodologia de atividade biológica in vivo com <i>Pratylenchus brachyurus</i> . Criada com Biorender.com	52
Figura 8. Curva analítica obtida para (A) óleo essencial de tomilho-branco; (B) óleo essencial de manjerona (C) óleo essencial de orégano (D) óleo essencial de Capim-limão.	55
Figura 9. Caracterização da estabilidade das partículas: (A) diâmetro hidrodinâmico e (B) índice de polidispersão, em função do tempo para as nanopartículas controle (C5P e C2P), e partículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1, C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias, d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA com post-test Tukey).....	60
Figura 10. Caracterização da estabilidade das partículas: (A) potencial zeta e (B) potencial hidrogeniônico (pH), em função do tempo para as nanopartículas controle (C5P e C2P), e partículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1, C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias,	

d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA com post-test Tukey).	62
Figura 11. Caracterização das nanopartículas pela técnica de NTA. Diâmetro médio (A) e concentração (B) das nanopartículas controle (C5P e C2P), nanopartículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1; C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias, d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (two-way ANOVA com post-test Tukey).	65
Figura 12. Caracterização da eficiência de encapsulação das nanopartículas: (A) C5P-M1 e C2P-M1. (B) C5P-M2 e C2P-M2. Variação significativa entre os grupos em função do tempo é indicada pelo símbolo *. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (two-way ANOVA com post-test Tukey).	66
Figura 13. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier. (A) OE de tomilho-branco (OETM); OE de manjerona (OEM); caseína pura; pectina pura; C5P M1; C2P M1. (B) OE de capim-limão (OEC); OE de orégano (OEO); caseína pura; pectina pura; C5P M2; C2P M2.	68
Figura 14. Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: pectina pura, caseína pura, óleo essencial de tomilho-branco (OETM), óleo essencial de manjerona (OEM), C5P-M1, C2P-M1.	70
Figura 15. Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: pectina pura, caseína pura, óleo essencial de orégano (OEO), óleo essencial de capim-limão (OEC), C5P-M2, C2P-M2.	71
Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura. Em ordem as nanoformulações: (A) C2P, (B) C2P-M1, (C) C2P-M2, (D) C5P, (E) C5P-M1, (F) C5P-M2 com as medições em cor verde.	72
Figura 17. Micrografias das nanopartículas C5P-M2 em (A) e 3D em (B), e a nanopartícula C2P-M2 (C) e 3D em (D).	73
Figura 18. Liberação cumulativa em camada de solo das nanoformulações NE-M2 (verde-escuro) e C5P-M2 (verde claro). Os testes foram realizados em triplicata. Foi considerado significância de $p < 0,05$	74
Figura 19. Citotoxicidade das nanopartículas controle e carregadas, e das nanoemulsões contendo OEs usando células 3T3, em (A) C2P, C5P, C5P-M1, C2P M1 e NE-M1. Em (B)	

C2P, C5P, C5P-M2, C2P M2 e NE-M2. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA)..... 75

Figura 20. Imagens das plântulas de soja após os oito dias de tratamento e crescimento na estufa a 25°C. Em (A) Testemunha, (B) C5P (10 mg/mL), (C) C5P (5mg/mL), (D) C5P-M2 (10 mg/mL), (E) C5P-M2 (5 mg/mL), (F) NE-M2 (10 mg/mL), (G) NE-M2 (5mg/mL). 77

Figura 21. Em (A) gráficos de fitotoxicidade, em (B) tabela com dados de porcentagem de germinação e de sementes anormais. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (one-way ANOVA). 78

Figura 22. Em (A) gráficos de comprimento da parte aérea, em (B) gráficos de comprimento da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA). * indica significância. 79

Figura 23. Em (A) gráficos de massa fresca da parte aérea, em (B) gráficos de massa fresca da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA). * indica significância..... 80

Figura 24. Imagens dos tratamentos após o término do período de avaliação: (A) testemunha, (B) C5P, (C) C5P-M2, (D) NE-M2. 81

Figura 25. Imagem dos tratamentos: (A) testemunha, (B) C5P, (C) C5P-M2, (D) NE-M2 com sintomas de mancha-parda nas folhas..... 82

Figura 26. Em (A) gráficos de massa fresca da parte aérea, em (B) gráficos de massa fresca da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA). * indica significância..... 82

Figura 27. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P e C2P), e carregadas (C5P-M1 e C2P-M1) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C2P, (C) C5P-M1, (D) C2P-M1. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$ 84

Figura 28. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P e C2P), e contendo os OEs (C5P-M2 e C2P-M2) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C2P, (C) C5P-M2, (D) C2P-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$ 85

Figura 29. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P) e carregada (C5P-M2) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C5P-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$ 86

Figura 30. Gráficos de motilidade das nanoformulações (A) C5P, (B) C5P-M2, (C) NE-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$	88
Figura 31. Gráfico das espécies reativas de oxigênio (ROS) com os tratamentos: controle, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), C5P (5 mg/mL), C5P-M2 (5 mg/mL), NE-M2 (5 mg/mL). O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$	89
Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência em <i>C. elegans</i> de cada tratamento: (A) controle, (B) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (C) C5P, (D) C5P-M2, (E) NE-M2, quanto maior fluorescência, maior o estresse oxidativo gerado no organismo do nematoide.	90
Figura 33. Gráficos de Brood size, das nanoformulações (A) C5P, (B) C5P-M2, (C) NE-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$	91
Figura 34. Gráficos de produção de vagens, em (A) Ensaio 1 em (B) Ensaio B. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$	93
Figura 35. Gráfico de produção de grãos, em (A) Ensaio 1 em (B) Ensaio 2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Metodologia para quatro óleos essenciais, indicando temperatura do cromatógrafo, rampa de temperatura, tempo que permaneceu naquela temperatura, o solvente orgânico utilizado, temperatura da fonte de ionização.....	40
Quadro 2. Escala para análise de impactos de fitotoxicidade pós-emergente, adaptada de Barbaś et al. (2024).....	48
Quadro 3. Caracterização química do OE de Tomilho e manjerona por GC-EM. As siglas significam: IR_{tab} - Índice de Retenção Tabelado de acordo com o NIST, e IR_{EA} - Índice de Retenção de Escala de Alcanos	53
Quadro 4. Caracterização química do OE de Capim-limão e Orégano por GC-EM. as siglas significam: IR_{tab} - Índice de Retenção Tabelado de acordo com o NIST, e IR_{EA} - Índice de Retenção de Escala de Alcanos.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento fatorial com as 27 combinações, e os resultados das variáveis dependentes diâmetro médio (DM), desvio padrão (SD), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP), eficiência de encapsulação (EE%). 57

Tabela 2. Multiplicação populacional de *Pratylenchus brachyurus* nos diferentes tratamentos em soja, nos ensaios 1 e 2. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o pós-teste de Tukey 5%. Os dados foram transformados antes das análises estatísticas usando o logaritmo do valor de (X+1). Pi – População inoculada, PF – população final. 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APROSOJA: Associação dos Produtores de Soja e Milho
CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento
CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
DLS: Dynamic Light Scattering
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium Nutricell
DPIRD: Department of Primary Industries and Regional Development
DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA: United States Environmental Protection Agency
FAO: Food and Agriculture Organization
FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
LRI: Índice de Retenção Linear
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
NGM: Nematode Growth Media
NJDOH: New Jersey Department of Health and Senior Services
NIST: National Institute of Standards and Technology
NPP: Nematoides Parasitas de Plantas
NTA: Nanoparticle Tracking Analysis
ODS: Objetivo de Desenvolvimento Sustentável
OE: Óleo Essencial
ONU: Organização das Nações Unidas
PDI: Índice de Polidispersão
pH: Potencial Hidrogeniônico
PZ: Potencial Zeta
SECEX: Secretaria de Comércio Exterior

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
	1.1 A IMPORTÂNCIA DO TRABALHO NA SOCIEDADE	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
	2.1 NEMATÓIDES E OS DANOS NA AGRICULTURA	22
	2.1.1 <i>Pratylenchus brachyurus</i>	24
	2.1.2 <i>Manejo do Pratylenchus brachyurus</i>	26
	2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)	27
	2.2.1 <i>Óleo essencial de Tomilho-branco</i>	29
	2.2.2 <i>Óleo essencial de Orégano</i>	30
	2.2.3 <i>Óleo essencial de Manjerona</i>	30
	2.2.4 <i>Óleo essencial de capim-limão</i>	31
	2.3 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS CARREADORES APLICADOS A AGRICULTURA	32
	2.3.1 <i>Sistemas nanocarreadores a base de pectina</i>	34
	2.3.2 <i>Sistemas nanocarreadores a base de caseína</i>	35
	2.4 CAENORHABDITIS ELEGANS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE TOXICIDADE E PROSPECÇÃO DE NEMATICIDAS	37
3	OBJETIVOS.....	38
	3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
	4.1 METODOLOGIA DA QUALIFICAÇÃO DO OEs	39
	4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	42
	4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	42
	4.3.1 <i>Espectroscopia Dinâmica por Dispersão de Luz (DLS)</i>	43
	4.3.2 <i>Técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)</i>	43
	4.3.3 <i>Eficiência de Encapsulação</i>	43
	4.3.4 <i>Análise de estabilidade química dos componentes</i>	44
	4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	44
	4.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	45
	4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	45
	4.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	45
	4.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO EM CAMADA DE SOLO	45
	4.9 BIOENSAIO DE CITOTOXICIDADE – VIABILIDADE CELULAR	46

4.10	ENSAIO DE FITOTOXICIDADE EM SOJA	46
4.10.1	Ensaio de fitotoxicidade pós-emergente	47
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM <i>C. ELEGANS</i>	48
4.11.1	Ensaio de sobrevivência e determinação da concentração letal 50% (CL_{50}).....	49
4.11.2	Swimming Assay	49
4.11.3	Ensaio de Estresse Oxidativo.....	49
4.11.4	Ensaio de Brood Size	50
4.12	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA COM <i>P. BRACHYURUS</i>	51
4.12.1	Ensaio in vivo	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	QUALIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CGEM	52
5.1.1	Óleo essencial de tomilho-branco e manjerona	53
5.1.2	Óleo essencial de Capim-limão e Orégano	54
5.2	ANÁLISE QUANTITATIVA POR GC-EM	54
5.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	56
5.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	58
5.4.1	Diâmetro médio, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e Potencial hidrogeniônico	58
5.4.2	Concentração e tamanho das partículas	63
5.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	65
5.6	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	
	67	
5.7	CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA	68
5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	71
5.9	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	72
5.10	ENSAIO DE LIBERAÇÃO EM CAMADA DE SOLO	73
5.11	BIOENSAIO DE CITOTOXICIDADE	74
5.12	ENSAIO DE FITOTOXICIDADE EM SOJA	76
5.12.1	Ensaio de fitotoxicidade pós-emergente	80
5.13	ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA COM <i>C. ELEGANS</i>	83
5.13.1	Ensaio de sobrevivência e determinação da concentração letal 50% (CL_{50}).....	83
5.13.2	Swimming Assay	87
5.13.3	Ensaio de Estresse Oxidativo.....	88
5.13.4	Ensaio de Brood size.....	90
5.14	ATIVIDADE BIOLÓGICA EM <i>PRATYLENCHUS BRACHYURUS</i>	91
5.14.1	Ensaio in vivo	91
6	CONCLUSÕES	95

REFERÊNCIAS	96
-------------------	----

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis extraídos de plantas, com composição química complexa e diversos mecanismos de ação. Seu potencial como pesticidas naturais tem sido estudado, demonstrando eficácia contra diferentes tipos de pragas como, insetos, fungos, e bactérias (Hao *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2024). Na agricultura, os OEs são utilizados amplamente em fumigações foliares ou aplicações na rizosfera para o controle de pragas agrícolas (Hao *et al.*, 2024), dentre essas incluem as bactérias, fungos, vírus e nematoides, os principais responsáveis pela perda de produtividade agrícola (Henning *et al.*, 2014).

Os nematoides estão entre os patógenos que mais afetam culturas de importância econômica, como a soja, trigo, milho, arroz, algodão, feijão, cana-de-açúcar e café (Agrolink, 2024; Dias-Arieira *et al.*, 2018; Nomura *et al.*, 2024). Entre os nematoides de maior relevância econômica estão o *Meloidogyne* spp. (nematóide-das-galhas), *Heterodera glycines* (nematóide de cistos da soja), *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões radiculares) e o *Rotylenchulus reniformis* (nematóide reniforme) (Dias-Arieira *et al.*, 2021).

Entre esses, o principal agente de perdas de colheitas é o *P. brachyurus* (Dias-Arieira *et al.*, 2018). Sua relevância econômica deve-se diversos fatores, como seu comportamento migratório, a falta de cultivares resistentes, a ampla gama de plantas hospedeiras, a alta densidade de inóculo em monoculturas ou rotações curtas, e a formação de complexos de doenças com outros patógenos já presentes no solo, como os fungos do gênero *Fusarium* (Henning *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2021).

Atualmente, os métodos de controle de *P. brachyurus* são através do manejo integrado utilizando práticas como a rotação de culturas, aplicação de nematicidas químicos, e o uso de cultivares com baixo fator de reprodução (Oliveira *et al.*, 2021). No entanto, a busca por métodos mais eficientes e com menores impactos negativos ao meio ambiente tem crescido. Recentemente, o controle biológico, que utiliza fungos e bactérias no combate aos nematoides, tem sido recebido incentivo do mercado, enquanto compostos derivados de plantas surgem como alternativas promissoras para o controle dessas pragas (Oliveira *et al.*, 2021; Catani *et al.*, 2023).

Neste contexto, os OEs representam uma alternativa viável para o manejo de nematoides. No entanto, sua aplicação direta enfrenta desafios, como baixa solubilidade, fotossensibilidade, instabilidade e rápida volatilização, que limitam sua eficácia. Para superar essas limitações, estratégias baseadas na nanotecnologia têm sido estudadas, incluindo a utilização de nanocarreadores, nanopartículas, e nanoemulsões, viabilizando sua

aplicação sem uma degradação prematura e aumente sua solubilidade, além de potencializar sua eficiência nos organismos-alvo. (Kumar *et al*, 2020; Swain *et al*, 2023)

Além disso, o uso de matrizes naturais têm ganhado a destaque na produção de sistemas nanocarreadores, por suas características como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, abundância e de baixo custo (De Oliveira; Campos; Fraceto, 2018). A pectina e a caseína, ambos polímeros naturais, foram as matrizes selecionadas para o encapsulamento dos OEs de orégano, manjerona, capim-limão e tomilho-branco, que apresentam potencial atividade nematicida.

1.1 A importância do trabalho na sociedade

O presente estudo visa promover uma agricultura sustentável, por meio da aplicação da nanotecnologia associada aos óleos essenciais, contribuindo para o manejo integrado do *P. brachyurus* e, conseqüentemente o aumento da produtividade agrícola.

Deste modo, a abordagem está alinhada com as Metas de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), ODS nº 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), pois busca reduzir a incidência do nematoide no solo, garantido uma maior produção de alimentos para suprir a demanda de uma população em constante crescimento (Organização das Nações Unidas, 2025a).

Ademais, ao incorporar inovações tecnológicas no controle de NPPs, o estudo também se alinha com a ODS nº 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), promovendo o desenvolvimento de soluções avançadas e sustentáveis para o setor agrícola (Organização das Nações Unidas, 2025b). Por fim, a aplicação da nanotecnologia aliada aos óleos essenciais também favorece as práticas de produção mais responsáveis e sustentáveis, reduzindo a dependência de produtos químicos convencionais, o que está em conformidade com a ODS nº12 (Consumo e Produção Sustentáveis) (Organização das Nações Unidas, 2025c).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo e possui diversas culturas de importância econômica para o país (Embrapa, 2022). As perspectivas para a safra brasileira de grãos para 2024/2025 indicam crescimento de 8,2% da produção em comparação com a safra de 2023/2024, com uma estimativa de colheita de 322,3 milhões de

toneladas (Embrapa, 2024). Os destaques foram para a soja com um aumento de 18,6 milhões de toneladas (ou 12,6%), milho crescendo com a produção em cerca de 3,9 milhões de toneladas (ou 3,3%), e o arroz com um crescimento de 1,4 milhões de toneladas (ou 13,2%), em relação à última safra (Conab, 2025).

A cultura da soja é essencial para o Brasil, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Segundo dados da Conab, a soja é a principal cultura agrícola do país, representando cerca de 48% da produção de grãos e contribuindo significativamente para a balança comercial do país. Além disso, a cultura da soja tem impacto na geração de empregos e no desenvolvimento tecnológico do setor agrícola brasileiro (Valdes, 2022).

A soja é utilizada para a alimentação humana e animal, em produtos alimentícios e na indústria química, na produção de biodiesel e devido ao seu consumo mundial está *commodity* é negociada por produtores de diversos países (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). De acordo com a Conab, no mercado internacional da cultura da soja existem três grandes produtores, sendo eles: Brasil, Estados Unidos e Argentina (Conab, 2023). Somente em agosto de 2024 o valor exportado do complexo da soja (grãos, farelo, óleo) foi de 4,47 bilhões de reais (Brasil, 2024).

Diante do exposto, fica evidente que o Brasil desempenha um papel crucial para a agricultura mundial e para a sojicultura, sendo importante adequar o manejo, para manter a produção de grandes safras e assegurar sua competitividade no mercado, sobretudo considerando os impactos e os danos causados por nematoides parasitas de plantas.

2.1 *Nematoides e os danos na agricultura*

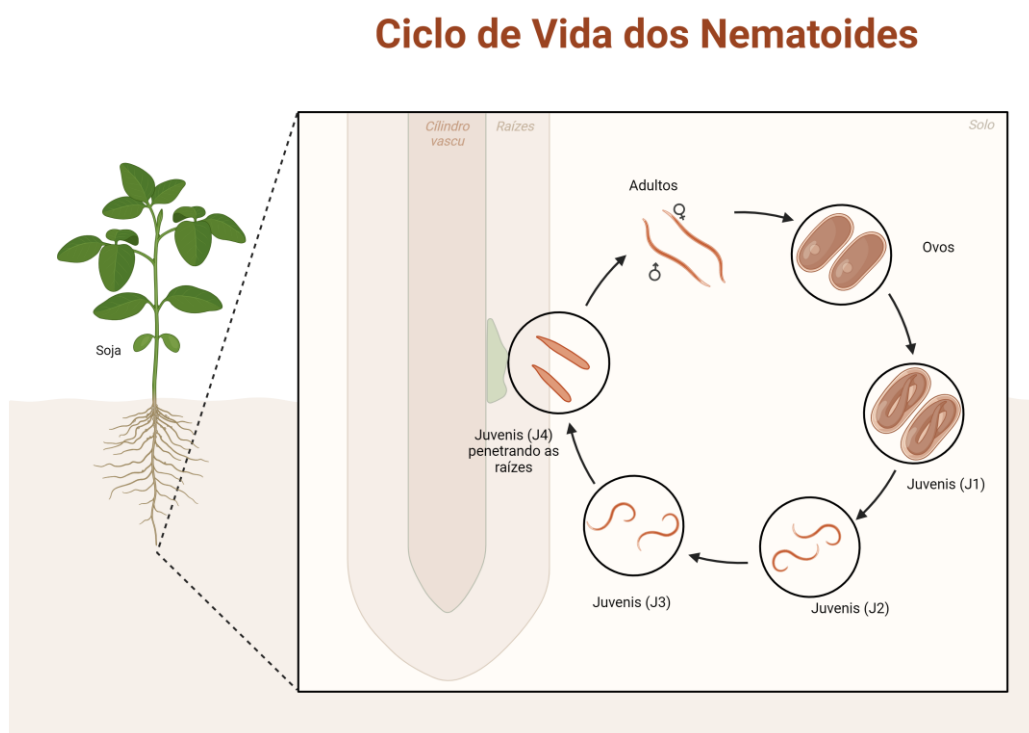
Estima-se que há cerca de 4100 espécies de fitonematoídeos que são pragas destrutivas para a agricultura e horticultura. Estes nematoides causam perdas econômicas significativas (Abd-Elgawad, 2022; Seong *et al.*, 2021). As perdas mundiais causadas pelos nematoides no rendimento das culturas é de aproximadamente 12,6% (US\$215 bilhões) (Abd-Elgawad, 2022).

O ciclo de infecção por nematoides começa quando o animal insere o estilete bucal (órgão canaliculado que serve para a injeção de toxinas e ingestão de alimentos) na planta, o que ocasiona em danos para a planta infectada, que podem ser de natureza direta ou indireta, e podem variar dependendo da espécie do nematoides, bem como o tipo de planta

e o estágio de desenvolvimento. Os danos diretos são resultantes do ataque dos nematoides às raízes das plantas, comprometendo o sistema radicular das plantas, reduzindo a massa radicular e causando má formação radicular. Uma esquemática do ciclo de vida de um nematoide pode ser observada na Figura 1.

Os danos indiretos estão relacionados à menor absorção de água e nutrientes, à transmissão de doenças causadas por vírus, fungos e bactérias. Segundo o *Department of Primary Industries and Regional Development* (DPIRD), os sintomas da infestação podem incluir raízes marrons e necróticas, raízes emaranhadas, crescimento retardado da planta, folhas amareladas e morte prematura da planta (DPIRD, 2014; Ebone; Kovaleski; Deuner, 2019).

Figura 1. Ciclo de vida de um nematoide parasita de plantas, mostrando todos os estádios do ciclo: ovos, quatro estádios de juvenis (J1, J2, J3, J4), e a fase adulta. Criado com o BioRender.com.



Os nematoides têm causado prejuízos significativos na cultura de soja, resultando em redução de produtividade, má qualidade dos grãos, perda de área cultivável, além dos custos com controle e despesas com os tratamentos e o manejo (Agrivalle, 2024).

Segundo a Embrapa, a perda média da produtividade de soja no Brasil devido aos nematoides é estimada em cerca de 10% (Dias-Arieira *et al*, 2021). No Brasil, a cultura de soja é atacada principalmente pelo nematoide de cisto (*Heterodera glycines*), o nematoide

das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*), os nematoides das galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*) (Machado; Amaro; Silva, 2019, Agribrasilis, 2022). Portanto, o controle dos nematoides é fundamental para a manutenção da produtividade e qualidade da soja, garantindo a rentabilidade da cultura e contribuindo para a segurança alimentar do país.

Diversos nematicidas, os quais são empregados atualmente para o controle dos nematoides parasitas de plantas (NPP), estão em decadência devido a sua eficiência ou estão sendo banidos devido a efeitos adversos em organismos não-alvo e ao meio ambiente (Palomares-Rius *et al.*, 2021). Alguns dos nematicidas banidos, são o Oxamil e o Fensulfotion, pois segundo a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e o *New Jersey Department Of Health And Senior Services* (NJDOH) ambos apresentam graves riscos ao sistema nervoso como a inibição de colinesterase e a perda de coordenação, alguns outros efeitos também podem levar a óbito. Estes foram proibidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na RDC nº 347 de dezembro de 2002, (NJDOH; 1998; EPA, 2000; ANVISA, 2002).

Nesse sentido, pesquisas na área de desenvolvimento de alternativas que possam ser integradas a diferentes formas de manejo podem contribuir para um melhor controle de NPPs. Segundo um relatório publicado pela Farmtrak Bioinsumos da empresa inglesa Kynetec, o mercado de bioinsumos cresceu 52% na safra 2022-23 em relação à safra anterior, totalizando seus rendimentos em US\$ 547 milhões. Entre os bioinsumos no mercado os bionematicidas tem a maior porcentagem de participação (35%), enquanto suas vendas totalizaram US\$ 291 milhões (Agrolink, 2023).

Neste contexto, uma classe de compostos que vem sendo muito pesquisada como alternativa para o controle de pragas é o uso de óleos essenciais (OEs), os quais podem ser associados a redução de impactos ambientais aos organismos não-alvos. Tal alternativa, juntamente com outras técnicas de manejo como a rotação ou sucessão de culturas, variedades resistentes, entre outros, podem promover um controle mais efetivo dos NPPs (Catani *et al.*, 2023; Hussain; Mukhtar; Kayani, 2016)

2.1.1 *Pratylenchus brachyurus*

O *Pratylenchus brachyurus* ou nematoide das lesões radiculares, é um NPP migrador que causa danos mecânicos nas raízes durante a sua movimentação no interior dos tecidos em direção ao cilindro central, este movimento afeta as células e forma cavidades em

consequência a estas lesões, é gerado uma incidência de bactérias e fungos (presentes no solo) nas raízes, podendo gerar a destruição completa do sistema radicular (Favoreto *et al.*, 2019; Silveira, 2021). O seu parasitismo em estádios iniciais da cultura pode levar a perdas de 50% (Oliveira; Inomoto, 2023)

Este nematoide é considerado o terceiro NPP mais importante devido aos impactos econômicos mundiais em culturas agrícolas (Jones *et al.*, 2013). O estado do Mato Grosso, principal região produtora de soja no Brasil, apresenta o NPP *P. brachyurus* como o mais comum (Silva; Oliveira, 2019). A Associação dos Produtores de Soja e Milho do estado do Mato Grosso (Aprosoja-MT), mostrou que 80% das áreas de soja do estado estão infestadas por fitonematoides, sendo o encontrado em maior frequência o *P. brachyurus*. A região Centro Oeste do país é marcada pela presença do *P. brachyurus* (Fernandes *et al.*, 2020).

A reprodução do *P. brachyurus* ocorre por partenogênese mitótica, a fêmea é capaz de colocar ovos diariamente em solo ou dentro das raízes, podendo variar de 70 a 120 ovos por fêmea. O parasitismo pode acontecer em quaisquer estágios e formas adultas da espécie. A duração do seu ciclo de vida em condições favoráveis é de 3 a 6 semanas, mas, pode ser alterada de acordo com fatores ambientais (Silveira, 2021).

Esses fitonematoides podem sobreviver em solos úmidos por mais de oito meses, o seu ciclo de vida envolve as fases de ovos, juvenis (J1, J2, J3 e J4), e adultos. As fêmeas depositam os ovos no interior das raízes parasitadas, mas, podem depositá-los no solo próximo das raízes (Ferraz; Brown, 2016). Os ovos e os juvenis ainda apresentam mecanismos de sobrevivência como a criobiose (dormência em baixas temperaturas), anidrobiose (dormência em baixas condições de umidade), sendo este fator importante devido ao período seco na entressafra do Cerrado brasileiro (Goulart, 2008).

Os ataques do *P. brachyurus* em soja ocorrem quando há a injeção de toxinas nas células parenquimáticas corticais que causam lesões irregulares nas raízes, o que progridem e se tornam necróticas, devido a organismos oportunistas como bactérias e fungos, causando infecção secundária, e acelerando a necrose e a redução do porte da planta, o que reflete diretamente na produção (Kimati, 2016). O *P. brachyurus* pode parasitar uma vasta gama de culturas agrícolas de relevância econômica como: soja, milho, algodão, feijão, cana-de-açúcar, amendoim, e o café (Nomura *et al.*, 2024).

Em estudos (Mainardi; Asmus, 2015), mostraram que a soja e o milho propiciam uma maior multiplicação do *P. brachyurus*, especialmente em regiões produtoras de soja caracterizadas pela sucessão do milho, após a colheita da soja. Sendo a soja uma das grandes

culturas no Brasil é necessário pensar em novas formas para o manejo e o controle destes NPPs.

2.1.2 Manejo do *Pratylenchus brachyurus*

O manejo integrado dos fitonematoides é dividido em quatro princípios, compreendendo: exclusão, erradicação, imunização e proteção. A exclusão é a prevenção da entrada do NPP no solo, sendo a etapa de menor custo para o agricultor pois consiste em medidas fitossanitárias simples como limpeza de maquinário agrícola e redução da movimentação dos veículos agrícolas nas áreas infestadas (Fernandes *et al.*, 2020).

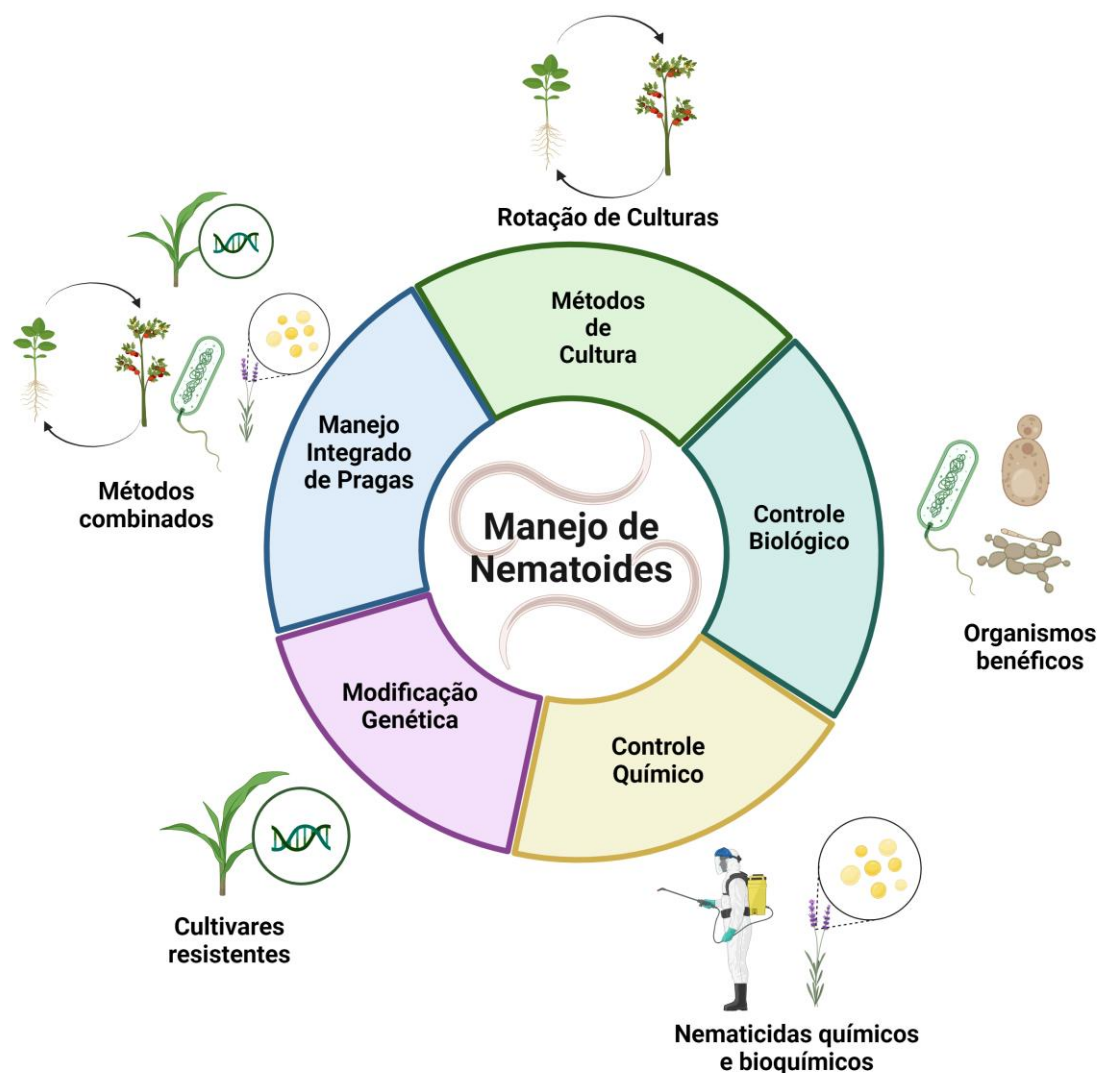
A direção do preparo do solo e o plantio da cultura de soja influenciam a distribuição espacial do *P. brachyurus* na cultura de soja (Freitas *et al.*, 2019). Sendo as medidas mais conservadoras como plantio e preparo do solo devem ser adotadas, o solo infestado pelo *P. brachyurus* que pode ser arrastado para o plantio pode carregar os ovos e os juvenis dos NPPs (Ferreira *et al.*, 2019).

A erradicação tem como objetivo eliminar ou inativar o fitoparasita, e para o *P. brachyurus* isso se dá por rotação ou sucessão de culturas não hospedeiras, solarização ou fumigação do solo. O aumento da população dos NPPs é devido a resistência ou suscetibilidade da planta que é utilizada na prática da rotação ou sucessão de culturas (Fernandes *et al.*, 2020).

O plantio de espécies antagonistas pode auxiliar a reduzir a população dos NPPs no solo, devido à falta de hospedeiro e pela liberação de moléculas tóxicas. Uma variedade de plantas produz moléculas com propriedades nematicidas como terpenoides, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, entre outros, dos quais tem atividade nematicida comprovada (Campos *et al.*, 2016; Jardim *et al.*, 2018). A utilização de extratos de plantas, adubação verde e a biofumegação tornaram-se técnicas importantes para o manejo integrado de fitonematoides (Ferraz; de Freitas, 2008).

O terceiro princípio do manejo, a imunização, utiliza do biocontrole para induzir a resistência nas plantas, ativando os mecanismos latentes de resistência da soja, e permitindo a defesa contra o ataque do NPP (Souza *et al.*, 2015). A proteção visa criar um tratamento para as sementes, utilizando de nematicidas químicos como barreira de proteção, impedindo que o nematoide se estabeleça nas raízes e comece seu ciclo de alimentação (Silva *et al.*, 2019). Uma esquemática das técnicas do manejo entregando pode ser observada na Figura 2.

Figura 2. Esquemática do manejo integrado de nematoides, com os métodos de cultura, controle biológico, controle químico, modificação genética e manejo integrado. Criado com Biorender.com



2.2 Óleos essenciais (OEs)

Os óleos essenciais (OEs) são abundantemente encontrados em plantas aromáticas, conferindo-lhes odor e sabor característico. Os OEs são constituídos por diferentes metabólitos secundários, os quais não estão diretamente ligados ao processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (Sharifi-Rad *et al.*, 2018), mas sim, a proteção; os metabólitos secundários são produzidos pelas plantas como uma forma de sobrevivência das espécies, capaz de afetar positivamente ou negativamente o desenvolvimento e crescimento de outras espécies como bactérias, fungos, insetos, entre outros (Verdeguer; Sánchez-Moreiras; Araniti, 2020).

Esses óleos são produzidos e armazenados em estruturas secretoras especializadas, como por exemplo, as células e bolsas secretoras, canais oleíferos e tricomas glandulares.

Essas estruturas podem ser encontradas em diferentes órgãos vegetais, tais como folhas, flores, caules, frutos, sementes e raízes de acordo com a espécie vegetal (Sadgrove; Padilla-González; Phumthum, 2022). Os OEs desempenham diversas funções essenciais para sobrevivência, tais como alelopatia, inibição de germinação de sementes, atração de agentes de polinização, proteção contra calor, frio, predadores e repelência de insetos (Shafiri-Rad *et al.*, 2018).

Os OEs demonstram uma vasta gama de atividades biológicas como, inseticida e repelente (Sarri *et al.*, 2024), nematocida (Catani *et al.*, 2023), fungicida (Raveau; Fontaine; Lounès-Hadj Sahraoui, 2020), e antimicrobiana (Alonso-Gato *et al.*, 2021), sendo amplamente estudados atualmente no combate de pestes (Catani *et al.*, 2023).

Os impactos dos óleos essenciais nos nematoides, incluem ruptura do sistema nervoso, indução de efeitos prejudiciais na permeabilidade da membrana plasmática, penetrando a matriz gelatinosa dos ovos, e causando estresse oxidativo intracelular (Goyal *et al.*, 2021; Kalaiselvi *et al.*, 2019; Pompy Dutta; Lal, 2021). Devido a sua composição complexa, os OEs podem ter efeito em múltiplos alvos, o que reduz a probabilidade de os organismos alvos desenvolverem resistência ou se adaptarem ao tratamento (Sarri *et al.*, 2024).

No estudo apresentado por Albuquerque (2019), o OE de tomilho-branco nas concentrações de 2%, 3% e 4% nos períodos de 6h, 24, e 48h ($p < 0,05$), reduziram de forma significativa os nematoides adultos, quando comparados com o controle (Levamisol). A concentração de 2% nas primeiras 6h foi letal para 60% dos nematoides, aumentando para 80% ao completar 48h, e nos nematoides adultos sobreviventes há diminuição da motilidade. O OE foi letal para as larvas nas concentrações de 3% e 4%.

Outro OE que tem sido explorado para atividades nematocidas é o de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), segundo (Chavan; Somasekhar; Rani, 2019), o OE de *C. citratus* foi efetivo para matar os nematoides *M. graminicola* em seu estágio larval juvenil (J2) com mortalidade de 100% após 96h de incubação com 1% de concentração. Este ainda demonstrou que nas concentrações de 2000 ppm, 1000 ppm, e 500 ppm por um período de 16 dias de tratamento, houve a inibição da eclosão de ovos em 62%, 70% e 71%, respectivamente.

Misturas de óleos essenciais também podem ser uma estratégia para o uso na agricultura, pois os metabólitos bioativos dos óleos essenciais, principalmente os terpenos são capazes de interagirem sinergicamente para aumentar a ação pesticida (Dassanayake *et al.*, 2021; Isman, 2020).

Em estudos realizados por Tak; Jovel e Isman (2017) os quais estudaram os efeitos da sinergia dos óleos essenciais de alecrim, tomilho e capim-limão e seus componentes nas atividades enzimáticas e na atividade inseticida na lagarta plusia (*Trichoplusia ni*). Foi descoberto que apesar da sinergia para a atividade larvicida, não houve alterações significativas na inibição das enzimas, sugerindo ser outra causa os mecanismos de toxicidade.

No entanto, a atividade biológica dos OEs pode ser perdida por volatilização ou degradação, e aplicações repetidas são necessárias para atingir a atividade nematocida efetiva (D'Addabbo; Avato, 2021). Para contornar os problemas citados acima, a combinação de OEs com sistemas carreadores é fundamental para o desenvolvimento de formulações de biopesticidas mais eficientes. Formulações a base de nanopartículas podem aumentar a estabilidade desses compostos bioativos e promover liberação sustentada evitando a degradação prematura.

2.2.1 Óleo essencial de Tomilho-branco

O tomilho-branco (*Thymus vulgaris* L.) é uma erva aromática da família Lamiaceae e é originária da Europa e Ásia (Darrag; Alhajhoj; Khalil, 2021). O óleo essencial de tomilho-branco tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades antimicrobiológicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, nematocida, larvicida e inseticida (Jain; Choudhary, 2022).

Em análises fitoquímicas foi mostrado que dentre seus componentes, o OE de tomilho-branco exibe o monoterpene timol e o isômero carvacrol em grande abundância, dois componentes do grupo dos terpenos, as quais a estrutura pode ser vista na Figura 3 – A e B. Os terpenoides são compostos tóxicos para nematoides, que geralmente afetam o sistema nervoso ou matam por estresse oxidativo (Sarri *et al.*, 2024). Os terpenos são componentes do metabolismo secundário das plantas e podem apresentar efeito letal ou subletal, como infertilidade, fotoinibição e repelência (Brügger *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2016).

O timol (2-isopropil-5-metil-fenol) apresenta diversas propriedades bioativas, dentre elas estão, atividade antifúngica (Chillet *et al.*, 2018; Mongiano *et al.*, 2021), antibacteriana (Kachur; Suntres, 2020), anti-helmíntica (Katiki *et al.*, 2017) e nematocida (Stavropoulou *et al.*, 2021).

Liu; Li e Song (2022) mostraram que o mecanismo de ação deste monoterpreno, juntamente com o isômero carvacrol em nematoides se dá pela ação nos receptores de traços de amina (TA-1) interrompendo a cascata de receptores das células dos nematoides.

2.2.2 Óleo essencial de Orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma erva aromática da família Lamiaceae e é originária de regiões do mediterrâneo. O OE de orégano é utilizado como artifício natural no acondicionamento de longo tempo de grãos contra diversos microrganismos, com baixa toxicidade animal e rápida degradação ambiental (Plata-Rueda *et al.*, 2022). Diversos estudos publicados apontam propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, acaricida, inseticida e nematicida (Jbilou *et al.*, 2024).

Em análises fitoquímicas foi mostrado que dentre seus componentes, o OE de orégano exibe o monoterpreno carvacrol e o timol em abundância (Hou *et al.*, 2020) (Figura 3 – A e B). O carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol) apresenta propriedades antimicrobiana, antifúngica (Qu; Li; Wang, 2021; Wang *et al.*, 2019), nematicida (Nasiou; Giannakou, 2017).

Em estudos, (Sosa *et al.*, 2020) o óleo essencial de orégano e anis (*Pimpinella anisum*) demonstraram um efeito de mortalidade de 100% no estágio larval J2 do nematoide *Nacobbus aberrans* na dose de 600 µL L⁻¹ após um período de 24h.

Liu, Li e Song (2022), mostra que o mecanismo de ação em nematoides deste monoterpreno, juntamente com o timol é nos receptores de traços de amina (TA-1) e interrompem a cascata de receptores das células dos nematoides.

2.2.3 Óleo essencial de Manjerona

A manjerona (*Origanum majorana*) é uma erva aromática originária do mediterrâneo e norte da África pertencente à família Lamiaceae, e seu óleo essencial demonstra diversos tipos de atividade biológica como inseticida e anticolinérgica (Prabu *et al.*, 2020), larvicida, e repelente (Kakouri *et al.*, 2022).

Em análises fitoquímicas um dos componentes majoritários encontrados no OE de manjerona é o terpinen-4-ol (3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)-, (R)-) é um álcool monoterpênóide (Nóbrega, 2012) o qual tem sua estrutura ilustrada na Figura 3 – C.

Algumas de suas propriedades bioativas do terpinen-4-ol incluem: atividade inseticida (incluindo efeitos em ovos e pupas), repelente, fungicida (Liu; Li; Song, 2022).

O mecanismo de ação do óleo essencial de manjerona segundo estudos de Prabu *et al* (2020), se dá pela indução da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) intracelular, causando estresse oxidativo em insetos como traças (*Corcynera cephalonica*), além de causar a inibição de acetilcolinesterase, chamado efeito anticolinérgico, inibindo a propagação de impulsos nervosos ligados ao movimento, deste modo causa paralisia e possível morte do alvo (Rants'o *et al.*, 2022).

2.2.4 Óleo essencial de Capim-limão

O capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) é uma planta herbácea da família Poaceae advinda de regiões subtropicais da Ásia, África e América do Sul (Mota Filho *et al.*, 2022). O óleo essencial de capim-limão tem em sua composição majoritariamente o neral e o citral, que são compostos do grupo dos terpenoides. E este possui atividades biológicas como, antibacteriana, antifúngica e nematicida (Oro *et al.*, 2020).

O citral e o neral, constituintes majoritários do OE de capim-limão, pertencem ao grupo dos monoterpenos e são isômeros acíclicos, cis e trans, de dupla ligação. O Geranial (trans-citral), também conhecido como Citral A e o Neral (cis-citral) como Citral B (Sharma *et al.*, 2020) que podem ser vistos na Figura 3 – C e D, exibem propriedades bioativas como a atividade inseticida, nematicida e antifúngica (Liu; Li; Song, 2022).

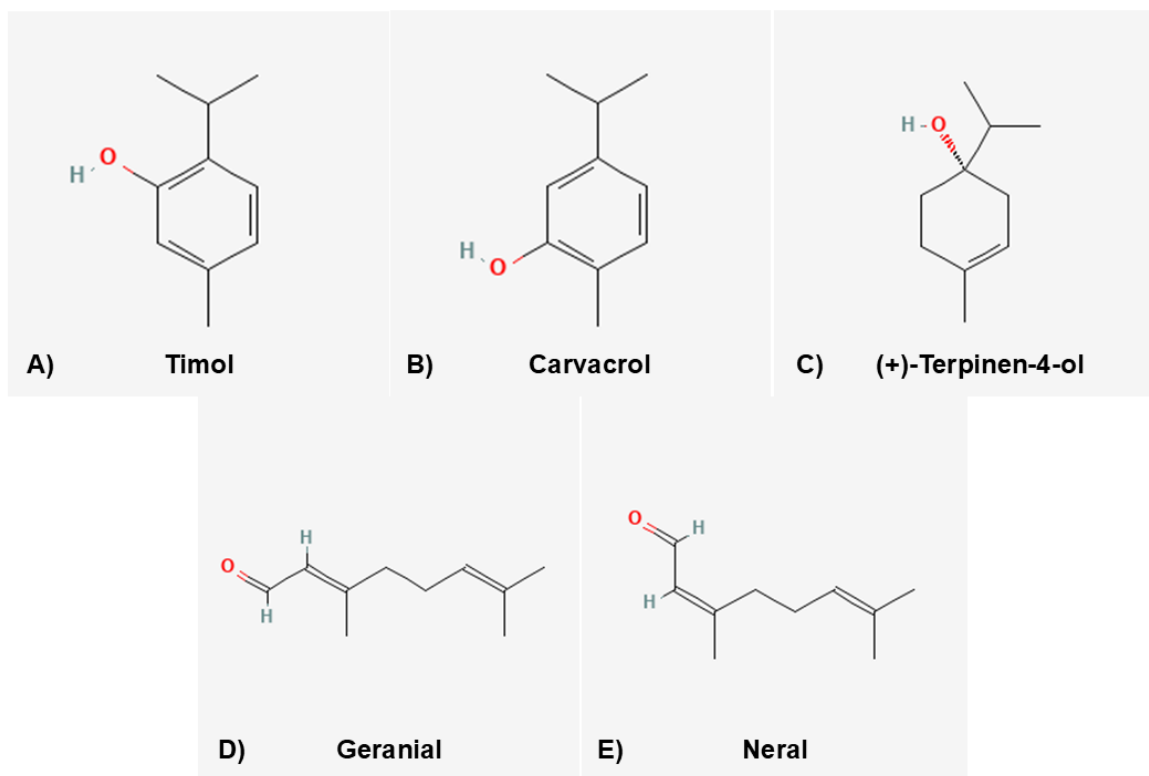
Segundo Chavan *et al.* (2019), o OE de *C. citratus* foi efetivo para matar os nematoides *M. graminicola* em seu estágio larval juvenil (J2) com mortalidade de 100% após 96h de incubação com 1% de concentração. Este ainda demonstrou que nas concentrações de 2000 ppm, 1000 ppm, e 500 ppm por um período de 16 dias de tratamento, houve a inibição da eclosão de ovos em 62%, 70% e 71%, respectivamente.

Segundo (Alves *et al.*, 2019), o mecanismo de ação do óleo essencial de capim-limão se dá pela inibição da acetilcolinesterase e a redução da β -esterase, que é a responsável pela inativação do neurotransmissor de acetilcolina.

A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) aponta que os componentes dos OEs são conhecidos por serem degradados rapidamente no meio ambiente por processos biológicos, físicos e químicos naturais, esperados no local onde o pesticida é aplicado (EPA, 1993). A fim de diminuir a degradação e aumentar o tempo de exposição, consequentemente

aumentando o efeito dos OEs e suas frações podemos utilizar a nanotecnologia, mais especificamente dos sistemas nanocarreadores.

Figura 3. Estruturas químicas dos principais componentes dos óleos essenciais de: tomilho-branco e orégano em (A) Timol e em (B) Carvacrol; manjerona em (C) terpinen-4-ol; e capim-limão em (D) Geranial e (E) Neral.



2.3 Nanotecnologia e sistemas carreadores aplicados a agricultura

A nanotecnologia tem sido explorada para melhorar a agricultura, se mostrando promissora para sistemas mais sustentáveis e promovendo uma segurança alimentar mais eficiente, diminuição do uso de pesticidas e melhorar a qualidade de solo (Pan *et al.*, 2023). A nanotecnologia é ferramenta valiosa em diversas áreas diferentes dentro da agricultura como, nanofertilizantes, nanobiossensores, nanocarreadores para pesticidas, e nanomateriais para remediação de solo. (Pan *et al.*, 2023; Usman *et al.*, 2020).

Os nanocarreadores são produzidos para a condução de diversas substâncias, como pesticidas, herbicidas, repelentes etc. Os nanocarreadores tem a habilidade de promover uma liberação sustentada do ingrediente ativo, fazendo com que este permaneça no ambiente por mais tempo, prolongando o efeito do mesmo e proteger o ativo da degradação prematura em condições ambientais adversas de luminosidade, umidade, temperatura e microorganismos

e podem ser sintetizados em diversas formas como nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, micelas ou nanopartículas (Pan *et al.*, 2023).

Os nanocarreadores podem ser produzidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais. Entretanto, os polímeros naturais têm ganhado a atenção, não só pela habilidade de oferecer uma liberação sustentada, ou seja, uma liberação do ativo até duas vezes mais lenta em comparação com os perfis de liberação convencional ou de liberação-imediata (Boostani; Jafari, 2021); mas também, por sua natureza amigável ao meio ambiente. Nanobiopesticidas podem ser absorvidos, acumulados, e transmitidos pelas raízes e folhas das plantas, o que pode ser ideal para a entrada destes pesticidas de forma efetiva para controlar pragas e doenças nas plantas (De Oliveira; Campos; Fraceto, 2018; Pan *et al.*, 2023)

Os polímeros naturais (celulose, pectina, lignina, entre outros) e as gomas (goma guar e goma acácia), são sustentáveis, biodegradáveis, biocompatíveis, econômicas, não-tóxicas, além de terem alta disponibilidade, pois provém de diversas fontes, como algas, bactérias, fungos, extratos de algas marinhas e plantas entre outros (Campos *et al.*, 2015a; Fincheira *et al.*, 2021). Biopolímeros são degradados facilmente na forma de compostagem, o que ajuda no crescimento e desenvolvimento da planta, além de tornarem o solo mais permeável e aerado, aumentando a atividade de microorganismos, podendo ser estímulo-responsivas, além de não produzirem nenhum subproduto tóxico (Fincheira *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2023; Sathiyabama, 2019; Wang *et al.*, 2022).

Polímeros naturais como a pectina, celulose e goma guar são vantajosos quando se refere à abundância em relação aos de origem animal, e em decorrência de suas funcionalidades, além da fácil extração e manuseio. Estes polímeros, em particular, os polissacarídeos, têm sido particularmente preferidos em aplicações ambientais devido às suas características como, biodegradabilidade e abundância, além de serem renováveis e de baixo custo (Anjum *et al.*, 2021; Paul; Das; Sharma, 2021).

Em estudos Djebbi *et al* (2023) sintetizou nanopartículas de pectina e goma arábica contendo óleo essencial de laranja-azeda (*Citrus aurantium*) para atividade inseticida na broca-pequena-dos-grãos (*Rhyzopertha dominica*). Além de uma alta eficiência de encapsulação de 81,06%, a nanopartícula se mostrou eficaz contra a *R. dominica* nos três períodos de análise (30, 60 e 90 dias) obtendo mortalidade de 100% nos insetos adultos e em seus descendentes.

Entretanto, o uso de proteínas de origem animal, como a caseína, também são bem aceitos para produção de sistemas de liberação sustentada pois a proteína pode aumentar a eficiência de encapsulação do ingrediente ativo através de interações hidrofóbicas, enquanto

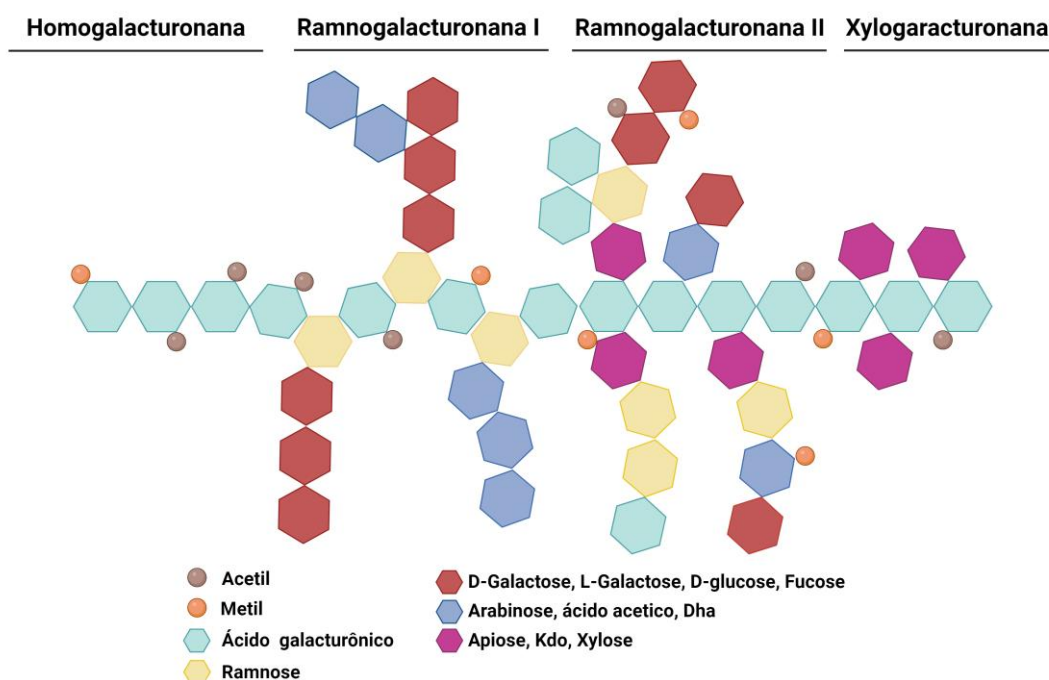
os polissacarídeos podem recobrir a superfície da proteína por interação eletrostática como uma camada protetiva para estabilizar as propriedades da proteína (Hua *et al.*, 2021).

A “síntese verde” de nanoformulações de biopesticidas com prolongada ação biológica é promissora, e a biossíntese de óleos essenciais, enzimas, extratos de plantas pode ser uma alternativa aos pesticidas químicos (Pan *et al.*, 2023)

2.3.1 Sistemas nanocarreadores a base de pectina

A pectina é um polímero natural encontrado nas paredes celulares primárias de plantas terrestres. A estrutura química da pectina consiste de uma cadeia principal linear composta por 17 monossacarídeos organizados em distintos polissacarídeos (Figura 4), sendo formada por homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I), ramnogalacturonana II (RG-II), e xylogalacturonana (XGA) (Canteri *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2020). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) a estrutura da pectina contém $\geq 65\%$ ácido galacturônico (GalA) (Freitas *et al.*, 2021).

Figura 4. Esquemática da estrutura da pectina, com a cadeia de polissacarídeos: homogalacturonana, ramnogalacturonana I, ramnogalacturonana II, e xylogalacturonana. Criado com o Biorender.com



As pectinas podem formar complexos com outros polímeros, devido ao seu balanço que apresenta positivos em pH elevado e negativo em pH baixos. Em virtude a essas

características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina intacta ou modificada e a pectina associada a outros polímeros naturais ou sintéticos têm sido avaliadas como um material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas, sistemas matriciais e como sistemas nanoparticulados devido a sua biocompatibilidade e atoxicidade (Federico *et al.*, 2022; Rashidipour *et al.*, 2019) A pectina ainda possui propriedades antimicrobianas e antivirais (Martău; Mihai; Vodnar, 2019).

Em estudos Rashidipour *et al.* (2019), mostrou que as nanopartículas de pectina associadas a quitosana e ao sódio trifosfato foram eficientes em reduzir a citotoxicidade e a mutagenicidade do herbicida comercial Paraquat, ademais, a suspensão de nanocápsulas tinha um pH neutro o que é vantajoso para o solo, não interferindo em seus nutrientes.

A existência da poligalacturase desesterificada contida nas pectinas as concede a característica de ligar os cátions as paredes celulares das plantas, o uso de hidrogéis poliméricos como a pectina podem melhorar a eficiência de água e fertilização dos solos. (Rashidipour *et al.*, 2019; Sayed *et al.*, 2022).

Em estudos Yang *et al.* (2024) sintetizou nanopartículas de ferro com revestimento de pectina para aumentar a adesão foliar e utilizar o Thifluzamide (fungicida comercial) em arroz para controlar o fungo *Rhizoctonia solani*, a nanopartícula demonstrou bons resultados de controle dos fungos em experimentos em casas de vegetação nos períodos de sete dias (85,88%) e 14 dias (78,59%), além de promover o crescimento das plântulas.

Portanto, as nanopartículas de pectina direcionadas ao combate de pragas são uma alternativa interessante, por serem um produto atóxico de alta disponibilidade com propriedades biocompatíveis. Isso se dá devido ao interesse em encapsular pesticidas ativos aplicados em solo. Desta maneira, no caso do presente trabalho, o encapsulamento dos ativos das misturas dos óleos essenciais de manjerona, tomilho-branco, orégano e capim-limão buscando um efeito de liberação lenta e visando a sustentabilidade. Resultando em uma durabilidade maior dos compostos ativos da formulação e uma redução no impacto dos organismos não-alvo.

2.3.2 Sistemas nanocarreadores a base de caseína

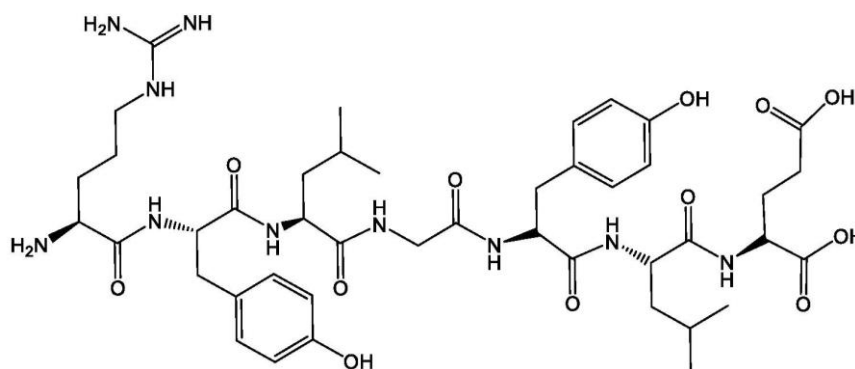
A caseína é a maior fonte de proteína do leite bovino, sendo cerca de 80% de todas as proteínas que compreendem leite. A estrutura da caseína compreende quatro frações de prolinas: α_{s1} - caseína (30 – 40%), α_{s2} - caseína (10 – 15%), β - caseína (30 – 40%), e κ -caseína

(10 – 15%) (Figura 5). Todas as caseínas são fosforiladas em resíduos de serinas específicas contendo os fosfatos 8 (α_{s1} -), 9 – 11 (α_{s2} -), 5 (β -), e 1 (κ -caseína) (Tang, 2021).

As caseínas α_{s1} -, α_{s2} -, β são sensíveis ao cálcio, enquanto a κ -caseína não é sensível ao componente, na presença de fosfatos inorgânicos e cálcio, as caseínas irão se associar ou formar agregação em uma forma supramolecular, denominada “micelas de caseína”, estas costumam ter o diâmetro médio de 50 – 500 nm. A formação das micelas de caseína é principalmente feita pelo fosfato de cálcio coloidal (FCC) e as interações eletrostática com resíduos de fosfoserinas de α -caseína e β -caseína (Duerasch *et al.*, 2020)

A caseína tem propriedades biocompatíveis e biodegradáveis, além de poder ser processada em diferentes formas de biomateriais, como filmes, hidrogéis e nanopartículas. A caseína tem uma alta capacidade de encapsulação para moléculas bioativas, sendo uma ótima opção para sistemas de *drug delivery* (Noruzi *et al.*, 2024).

Figura 5. Estrutura química da caseína



Fonte: Lopez *et al* (2022)

A proteína demonstra uma alta estabilidade em temperaturas acima de 100 °C e pressões acima de 100 Mpa, porém, se desestabiliza com a ação proteolítica da protease aspartato ou por acidificação, resultando na formação da coalhada (Dalglish, 2011; Gebhardt *et al.*, 2006). As micelas de caseína são dependentes do pH, quedas abaixo do ponto isoelétrico (pH 4,6 – 4,8) resultam em agregação das micelas com liberação de cálcio, já em pH alcalino ocorre o aumento das repulsões eletrostáticas entre as moléculas de caseínas, resultando na perda da estrutura micelar, aumentando seu tamanho (Ye; Harte, 2013).

Mebarki *et al.* (2022), prepararam micropartículas de caseína e pectina encapsulando o OE de *Thymus fontanesii* para testar sua viabilidade em armazenamento e como sistema de *oral-delivery* de extratos de plantas para o trato gastrointestinal, conseguindo

porcentagens de eficiência de encapsulação variando de 54,2% a 91,8% nas diferentes concentrações de caseína e pectina testadas. A estabilidade em acondicionamento se mostrou maior para as microcápsulas contendo o óleo essencial e a fração de timol, do que do OE e dos extratos isolados do timol.

Deste modo, pode-se compreender que além de um sistema estável em condições adequadas as micelas de caseína são uma alternativa para usos diversos em sistemas de liberação sustentada, podendo ser uma escolha potencial para nanocarreadores na agricultura.

2.4 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental de toxicidade e prospecção de nematicidas

A maior parte dos NPPs passam seu ciclo de vida confinados no solo ou nas raízes de plantas, tornando-se assim de difícil manutenção do seu ciclo, implicando diretamente em experimentos quantitativos em seu habitat natural, outro desafio que é encontrado é a falta do conhecimento completo do genoma destes parasitos (Chitwood, 2003; Holden-Dye; Walker, 2014). Devido a sua proximidade filogenética e fisiológica aos nematoides parasitos, o *Caenorhabditis elegans* se torna um excelente modelo para a prospecção de novos fármacos e nematicidas (Katiki *et al.*, 2011; Larsch *et al.*, 2013).

C. elegans é um nematoide de vida livre que pode ser comumente encontrado em solos de regiões de clima temperado e alimenta-se de bactérias e fungos encontrados em material vegetal em decomposição. Em sua fase adulta, o nematoide apresenta aproximadamente 1 mm de comprimento e tem um conjunto completo de órgãos e um sistema sensorial complexo (Frézal; Félix, 2015).

O ciclo de vida do deste nematoide compreende quatro estádios (J1 – J4) e um estágio reprodutivo (adulto). Em condições laboratoriais, com alimento abundante e a 20°C, o ciclo de vida, desde a eclosão até a fase de adulta se completa em torno de 3,5 dias. Os indivíduos hermafroditas podem gerar aproximadamente 260 novos organismos por autofecundação e até 500 novos organismos através de acasalamento. Após o período reprodutivo (três dias) esses animais podem viver entre 12 a 30 dias (Carranza-García; Navarro, 2020).

O *Caenorhabditis elegans* é um dos animais-modelos experimentais mais bem estudados e caracterizados a nível celular, embriológico, genômico e neurobiológico. Além disso, existem plataformas online, as quais compartilham informações fundamentais sobre este organismo, o que tem sido fundamental para a ampla utilização desse organismo como

modelo experimental para diferentes áreas da ciência (Carranza-Garcia; Navarro, 2020). Na avaliação de nanopartículas contendo moléculas nematicidas, o *C. elegans* pode ser utilizado para avaliar a toxicidade e eficácia das nanopartículas.

Através da exposição do *C. elegans* a formulações de nanopartículas pode ser avaliado: i) toxicidade das nanopartículas através da avaliação das taxas de sobrevivência, crescimento e reprodução e determinar a concentração segura; ii) avaliar a eficácia das nanopartículas encapsulando moléculas nematicidas avaliando-se a taxa de mortalidade dos nematoides, bem como alteração no comportamento dos mesmos; e iii) estudos do mecanismo de ação das nanoformulações contendo moléculas nematicidas, avaliando a interação das nanopartículas com os nematoides a nível molecular e como elas afetam os mesmos (Burns *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019).

O *C. elegans* demonstrou ser um excelente organismo de teste para a Grammicin, um produto natural do fungo endofítico *Xylaria grammica*, que tem propriedades nematicidas afetando seus estádios juvenis J1, J2, J3, e J4 causando estresse oxidativo, podendo também afetar seu tamanho e largura, sendo efetivo em cepas resistentes ao Aldicarb (nematicida) e Ivermectina (fármaco) (Kim *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento nanoformulações a base de caseína-pectina para o carreamento de misturas de óleos essenciais de Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) com Orégano (*Oreganum vulgare*) e Manjerona (*Origanum majorana*) com Tomilho-branco (*Thymus vulgaris*) que apresentam atividade nematicida e avaliar o efeito destas no organismo modelo *C. elegans* para *screening* inicial das formulações e posterior avaliação sobre o nematoide *Pratylenchus brachyurus* a fim de se entender os possíveis mecanismos para controle de nematoides a partir destes sistemas.

3.1 Objetivos específicos

Este estudo apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de metodologia analítica para os a mistura de óleos essenciais de Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) com Orégano (*Origanum vulgare*) e Manjerona (*Origanum majorana*) com Tomilho-branco (*Thymus vulgaris*) por Cromatografia Gasosa com Detector por Espectroscopia de Massa (CG-EM);

- Otimização das melhores condições de preparo das nanopartículas de pectina (ou outros polímeros) contendo os OEs;
- Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química dos sistemas coloidais como: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação em função do tempo;
- Caracterização da interação OEs/nanopartículas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC);
- Avaliação morfológica das nanopartículas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM).
- Realização de ensaios de cinética de liberação *in vitro* dos OEs não-encapsulados e encapsulados em nanopartículas em camada de solo;
- Avaliação da citotoxicidade utilizando o ensaio em culturas celulares de fibroblastos (3T3) através do ensaio de viabilidade celular dos sistemas carreadores contendo ou não compostos ativos;
- Avaliação de fitotoxicidade em sementes e no tratamento pós-emergente utilizando soja (*Glycine max* L.);
- Avaliação inicial da atividade nematicida dos OEs não-encapsulados e nanoencapsulados utilizando *C. elegans*.
- Avaliação da atividade nematicida dos OEs não-encapsulados e nanoencapsulados utilizando *P. brachyurus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Metodologia da qualificação do OEs

Para assegurar a identidade química dos OEs comerciais (Ferquima – Indústria e Comércio Ltda) de tomilho-branco, manjerona, capim-limão, e orégano foram feitas análises qualitativas através da Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massa (CG-EM) (Agilent Technologies 7890A/5975C inert MSD).

Para todas as metodologias foi utilizado o hélio como gás de arraste, no modo *splitless*, e a coluna capilar HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) (Agilent Technologies). As metodologias utilizadas foram de (Sárosi *et al.*, 2013) para o OE de Tomilho-branco, (Gong *et al.*, 2014) para o OE de Orégano, (Mendes, 2016) para o OE de Manjerona, e Antonioli,

(2019) para o OE de Capim-limão com alterações, o Quadro 1 demonstra através da temperatura do cromatógrafo, rampa de temperatura, tempo que permaneceu naquela temperatura, solvente orgânico, temperatura na fonte de ionização, e o fluxo de injeção as metodologias seguidas.

A espectrometria de massa foi conduzida comparando os espectros com a biblioteca Willey do CG-EM e utilizando o Índice de Retenção Linear (LRI) em comparação com dados da literatura. A correspondência (do inglês, *match*) na biblioteca do CG-EM é uma forma direta de comparar um espectro desconhecido com os picos existentes na biblioteca. O número da correspondência indica a similaridade com o espectro conhecido. O *National Institute of Standards and Technology* (NIST) utiliza uma escala de 0 a 1000 para avaliar a qualidade do match, sendo > 900 excelente, 800-900 bom, 700-800 regular, e < 600 ruim (Jordi Labs, 2017).

Quadro 1. Metodologia para quatro óleos essenciais, indicando temperatura do cromatógrafo, rampa de temperatura, tempo que permaneceu naquela temperatura, o solvente orgânico utilizado, temperatura da fonte de ionização.

	Temperatura do Cromatógrafo	Rampa (°C/min)	Tempo (minutos)	Solvente	Temperatura da Fonte
<i>Óleo essencial de manjerona</i>	60°C	5	2	Diclorometano	250°C
	150°C	15	-		
	280°C		6		
<i>Óleo essencial de Tomilho-branco</i>	50°C	5	-	Hexano	250°C
	150°C	12	-		
	250°C		-		
<i>Óleo essencial de Capim-limão</i>	40°C	3	8	Hexano	250°C
	180°C	20	-		
	230°C		10		
<i>Óleo essencial de Orégano</i>	40°C	5	-	Metanol	250°C
	240°C		-		

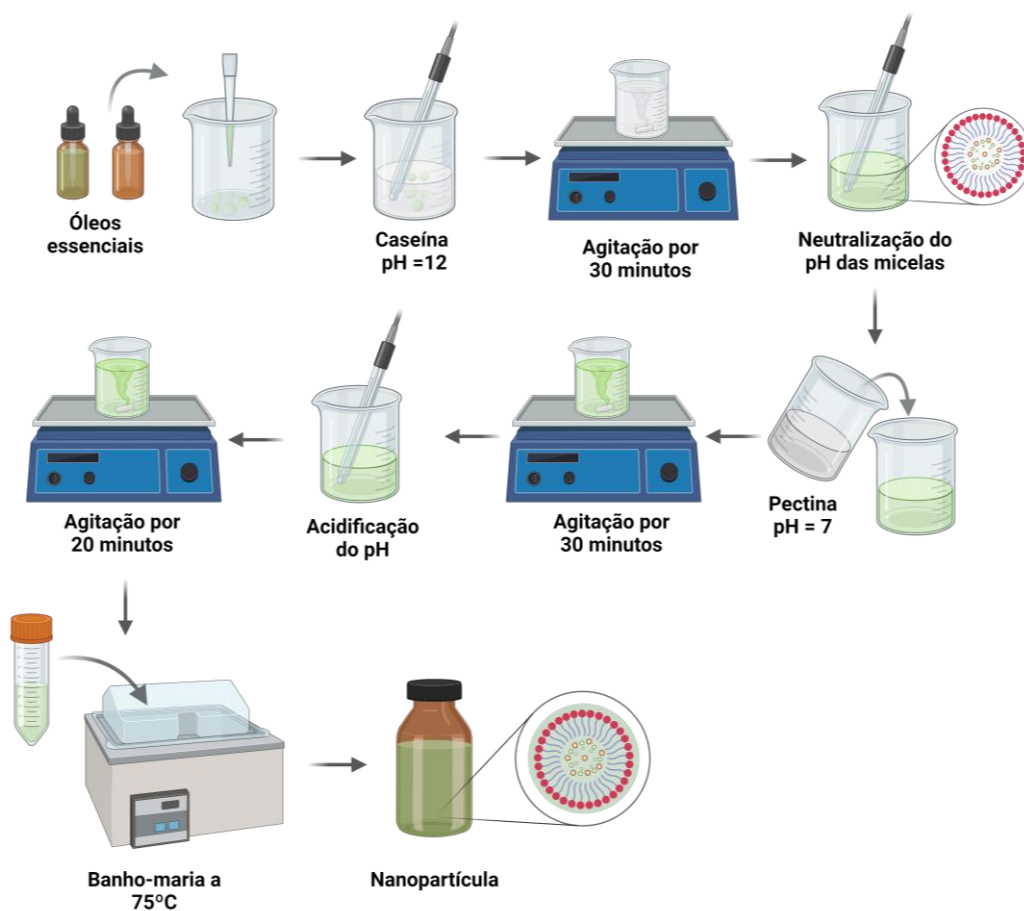
1.1. Preparo das nanopartículas

As formulações foram preparadas de acordo com o método de vinculação reversa descrito por Hua *et al.* (2021) com alterações. Soluções aquosas de caseína sódica (C8654-500G – Sigma Aldrich) e pectina (P9125-500G – Sigma Aldrich) foram preparadas, ambas a 1% (m/v), e permaneceram sob agitação magnética por 2h. Após esse período foram acondicionadas em geladeira (*overnight*) para hidratação. No dia subsequente, as soluções foram centrifugadas (Kasvi, K140-815C) a 4000 rpm por 30 minutos e refrigeradas até o momento do uso.

Para preparar as micelas, 20 mL de uma solução de caseína diluída em água (1:1) teve seu pH ajustado para 12 utilizando uma solução de NaOH 1M. As misturas de OEs escolhidas (Tomilho-branco e Manjerona; Capim-limão e Orégano) foram adicionadas à solução (400 uL, 1:1), a qual permaneceu em agitação magnética por 30 minutos. Após esse período a solução foi neutralizada utilizando uma solução de HCl 1M.

Na sequência, 20 mL de uma solução de pectina diluída em água (1:1) a pH 7 foi adicionada. Após 30 minutos sob agitação magnética, o pH desta solução foi acidificado até pH 4,8, permanecendo sob agitação por mais 20 minutos. Na sequência, as nanopartículas de caseína-pectina foram submetidas a tratamento térmico em banho-maria (75°C/2 minutos), resfriadas e mantidas à temperatura ambiente. A Figura 6 ilustra todos os processos da metodologia.

Figura 6. Esquemática da metodologia de preparação das nanopartículas utilizando a metodologia de Hua *et al* (2021), com alterações. Criado com Biorender.com.



4.2 Otimização das condições experimentais

A fim de obter formulações com maior eficiência de encapsulação dos OEs, bem como formulações com melhores propriedades coloidais e estabilidade em função do tempo foi realizado um planejamento fatorial através do *software Statgraph 19*, utilizando como variáveis independentes, a caseína (nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1% m/v), pectina (nas concentrações de 0,5%, 1%, 1,5% m/v), e o tratamento térmico (nos tempos de 2, 5 e 10 minutos); e como variáveis dependentes que foram analisadas, o diâmetro médio, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação (Campos *et al.*, 2013).

4.3 Caracterização físico-química e estabilidade das formulações

Foram avaliados diferentes parâmetros de caracterização das formulações, propriedades físico-química como: tamanho (diâmetro hidrodinâmico), distribuição de

tamanho das nanopartículas (índice de polidispersão), potencial zeta, potencial hidrogeniônico, e eficiência de encapsulação foram realizadas em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias) a fim de determinar a estabilidade desses sistemas (de Oliveira *et al.*, 2019). As análises estatísticas foram realizadas no software *Graphpad Prism 10*, utilizando *two-way ANOVA*, seguido do teste de Tukey-Kramer, utilizando significância $p < 0,05$.

4.3.1 Espectroscopia Dinâmica por Dispersão de Luz (DLS)

O analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) a um ângulo fixo de 90° foi utilizado para a avaliação do tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas, utilizando a técnica de espectroscopia dinâmica por dispersão de luz (do inglês *Dinamic Light Scattering*, DLS). Para a análise, foi adicionando 1 mL das nanopartículas na cubeta e está introduzida no equipamento. As análises foram realizadas na temperatura de 25°C (ambiente). A média da distribuição do tamanho foi dada pelo índice de polidispersão (PDI), que varia de 0 a 1. O resultado foi expresso como média de três determinações.

O potencial zeta das nanopartículas também foi avaliado no mesmo equipamento, porém, com a técnica de microeletroforese. As análises foram realizadas sem ajuste de pH, sem diluições e a temperatura ambiente (25°C), os resultados foram expressos com as médias de três determinações (de Oliveira *et al.*, 2019).

4.3.2 Técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A técnica de rastreamento de nanopartículas (do inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) foi utilizada para determinar a concentração e distribuição do tamanho das nanopartículas. Para a análise utilizou-se uma célula NanoSight LM10 (laser verde, 532 nm), câmera sCMOS, e o software *NanoSight 3.1*. As suspensões das nanopartículas foram diluídas em água deionizada (H₂O), a diluição foi ajustada para que a contagem de nanopartículas por frame estivesse entre 20 e 100. Foram realizados cinco vídeos de 60 segundos e para cada vídeo feito o conteúdo da célula foi deslocado, utilizando o total de 1 mL da amostra. A análise foi realizada em temperatura de 25°C (ambiente).

4.3.3 Eficiência de Encapsulação

A quantidade de OEs encapsulado nas nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação. Uma amostra de 400 µL de cada suspensão de nanopartículas

foi submetida à filtração em filtros de celulose regenerada com poro de exclusão de 10 kDa (Microcon-Millipore) em centrifuga refrigerada por 10 min a 5000 rpm. As nanopartículas ficam retidas no filtro e somente o ativo não encapsulado atravessa o poro do filtro, o filtrado é então quantificado por Espectroscopia na faixa UV-VIS (50 Conc, Varian) com as faixas de comprimento de onda de 264 nm e 248 nm. Desta forma foi determinada a quantidade de ativo não encapsulado, pela diferença com a quantidade total adicionada ao sistema pode-se estimar a quantidade de ativo associado as nanopartículas (Pereira *et al.*, 2014).

$$EE\% = \frac{W_t}{W_i} \times 100\%$$

W_t é a quantidade total do material incorporado.

W_i é a quantidade total de material incorporado adicionado inicialmente durante o preparo.

4.3.4 Análise de estabilidade química dos componentes

A estabilidade química dos polímeros nas formulações pode ser realizada pelo monitoramento do potencial hidrogeniônico (pH), cujas alterações podem indicar um processo de degradação de componentes da matriz ou do próprio polímero. A avaliação do pH foi realizada por um período de 120 dias, utilizando um potenciômetro (Ohaus, Starter 2100, Cial), calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0. Foram realizadas três medidas para cada formulação, e não foi utilizado controle de temperatura.

4.4 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As possíveis interações entre os inseticidas botânicos e seus carreadores foram investigados por FTIR, empregando-se um espectrofotômetro (Agilent Technologies, Cary 630, com cristal de diamante 2.2 x 3.0 mm) numa faixa de 600 a 4000 cm⁻¹.

As amostras de nanopartículas foram centrifugadas e o sobrenadante removido, os *pellets* de nanopartículas foram levados ao dessecador por um período de aproximadamente sete dias e as análises foram realizadas após a completa secagem das amostras com resolução de 2 cm⁻¹.

4.5 *Calorimetria exploratória diferencial*

As amostras das suspensões contendo ou não pesticida botânico e os *pellets* previamente secos foram colocadas em compartimento de amostras de alumínio e analisados utilizando-se um fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, com uma variação de temperatura de 10°C/min, em uma faixa de 25 a 400°C (Pereira *et al.*, 2017) empregando-se o equipamento *Discovery Thermal Analyzer* (TA Instruments, Waters).

4.6 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As nanoformulações passaram por um processo de diálise previamente, para a retirada de sódio, o qual poderia interferir na visualização das imagens. As nanoformulações foram colocadas em membranas de celulose, e submetidas a diálise por um período de três dias (Pereira *et al.*, 2017), com visualização posterior em DLS para conferir se as propriedades permaneciam as mesmas.

As amostras das nanoformulações (C5P, C2P, C5P-M1, C5P-M2, C2P-M1, C2P-M2) foram metalizadas utilizando o metalizador Leica WM ACE200 com uma camada de 10 nm de ouro. Após o processo de metalização as amostras foram analisadas ultraestruturalmente em diferentes aumentos utilizando o microscópio eletrônico de varredura ThermoFisher prisma em alto vácuo.

4.7 *Microscopia de Força Atômica (AFM)*

A morfologia das nanopartículas foi avaliada pela técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), usando um microscópio Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM (Pattern BT02217, Nanosurf, Suíça) com modo de não-contato. As nanoformulações passaram por um processo de diálise como descrito no item 4.6, após isso as suspensões diluídas das nanoformulações já dialisadas (1 uL de nanoformulação em 10 mL água deionizada) foram colocadas em placas de silício. As imagens foram capturadas no modo de não contato com 256x256 pixels em formato TIFF, e foram analisadas e tratadas no *software* Gwyddion. A contagem das nanopartículas e o seu tamanho foi analisado no *software* ImageJ.

4.8 *Ensaio de Liberação em Camada de Solo*

O lixiviado da mistura dos óleos essenciais das nanoformulações (C5P-M2 e NE-M2) foram avaliados utilizando funis de Buchner. Foi pesado 50g de solo, e colocados no

funil de Buchner contendo um filtro de papel qualitativo com espessura de 0,16 mm (Unifil). Foram borrifados 2 mL das nanoformulações na superfície do solo. Os funis foram irrigados com 30 mL de água deionizada com intervalos de duas horas entre as lavagens, cada tratamento foi irrigado três vezes ao dia, ao total os tratamentos foram irrigados nove vezes em triplicata, por três dias consecutivos. O lixiviado das lavagens foi coletado, e as concentrações foram determinadas por Espectroscopia na faixa do UV-VIS (50 Conc, Varian). O solo utilizado foi obtido da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade Estadual de São Paulo (ESALQ, USP) (-22.717313, -47.617213) caracterizado como argissolo. A análise dos resultados obtidos foi realizada utilizando os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, e Higuchi (Campos *et al.*, 2015a).

4.9 Bioensaio de citotoxicidade – viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em células de fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3 mantidas em cultura em meio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell). As células foram semeadas em placas e incubadas até atingirem a semiconfluência. As células foram expostas às amostras (nanoemulsão, e nanopartículas contendo ou não OEs) por um período de 24h. As concentrações utilizadas foram 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mg/mL baseadas na quantidade de ativo das nanopartículas contendo OEs.

Em seguida, o sobrenadante contendo as amostras foi removido e adicionado um novo sobrenadante contendo o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). As leituras de absorbâncias foram determinadas espectrofotometricamente a 570 nm, determinando a porcentagem de viabilidade celular de cada tratamento. Os ensaios foram realizados em triplicata, a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*One way ANOVA* com a posterior de Turkey-Kramer). Diferenças significativas foram realizadas como $p < 0,05$ (Grillo *et al.*, 2014).

4.10 Ensaio de Fitotoxicidade em soja

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados seguindo as diretrizes para teste de germinação e análise de sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Para o tratamento das sementes foi utilizado o protocolo de Castro *et al* (2008) com alterações.

Realizou-se a mistura de 30g de sementes com duas concentrações (10mg/mL [pura] e 5 mg/mL) para cada tratamento, em sacos plásticos de 1 kg. O conjunto foi agitado vigorosamente durante 30 segundos, visando uniformizar os tratamentos sobre a massa de sementes. Em seguida, as sementes tratadas foram deixadas para secar por 30 minutos.

Após esse período utilizou-se como substrato o papel Germitest umedecido, para germinação de sementes, utilizando 52,02 mL de H₂O_d. Em seguida, utilizando uma placa perfurada, 50 sementes foram distribuídas no papel de germinação, composto por três folhas de papel (sendo duas folhas como base para distribuição das sementes e uma folha como cobertura) (Brasil, 2009). Os rolos de papel foram mantidos em sacos plásticos para preservar a umidade e acondicionados em uma estufa a 25°C (Incubadora/Shaker, Solab) por oito dias. Ao todo, para cada tratamento foram utilizadas 200 sementes (cultivar BRS-546).

A contagem da porcentagem de germinação inicial foi realizada com cinco dias e com oito dias realizou-se a contagem da porcentagem de germinação final e análise dos parâmetros morfológicos: comprimento da raiz, massa fresca da parte aérea, e massa fresca da raiz (Brasil, 2009). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*ordinary one-way ANOVA* com teste de Bartlett). Diferenças significativas foram realizadas com $p < 0,05$ (Campos; Proença; Oliveira *et al*, 2018).

4.10.1 Ensaio de fitotoxicidade pós-emergente

No tratamento pós-emergente, 40 sementes de soja (cultivar BRS-546) foram semeadas em 40 vasos de 1L sendo utilizado como substrato a terra vegetal (Pachamama, Biomix), quando as plantas atingiram o estágio (V1), tendo seu primeiro trifólio totalmente expandido, foi aplicado o tratamento no solo das formulações contendo ou não os OEs, na concentração de 10mg/mL (nanoformulação pura).

As plantas foram acompanhadas por 20 dias para a avaliação da fitotoxicidade utilizando-se a escala adaptada de Badowski *et al*. (2001) (Quadro 2), e os parâmetros morfológicos de massa fresca da parte aérea e raiz foram avaliados. Os ensaios foram feitos em duplicata, a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*One-way ANOVA* com posterior de Turkey-Kramer). Diferenças significativas foram realizadas com $p < 0,05$ (Campos; Proença; Oliveira *et al*, 2018).

Quadro 2. Escala para análise de impactos de fitotoxicidade pós-emergente, adaptada de Badowski *et al.* (2001).

Notas	Danos	Características	Danos na parte aérea
1	Sem danos	Sem sensibilidade	Sem danos
2	Sintomas leves	Baixa sensibilidade (1,1 - 2,0)	Leve embranquecimento das extremidades das folhas
3	Sintomas visíveis - descoloração	Média sensibilidade (2,1 - 4,0)	Embranquecimento das extremidades das folhas e nervuras
4	Sintomas intensos		Embranquecimento e leve necrose da lâmina da folha - até 2%
5	Danos leves	Alta sensibilidade (4,1 - 6,0)	Embranquecimento e necrose da lâmina da folha - até 10%
6	Danos visíveis		Embranquecimento e necrose da lâmina da folha - até 25%
7	Danos intensos	Sensibilidade severa (>6,1)	Embranquecimento e necrose da lâmina da folha - até 50%
8	Danos severos - necrose		Embranquecimento e necrose da lâmina da folha - até 75%
9	Completa morte das plantas		Morte da parte aérea

4.11 Avaliação da atividade biológica em *C. elegans*

As cepas de *C. elegans* utilizadas foram N2 (selvagem). Para a manutenção, os vermes foram mantidos em placas de meio de crescimento de nematoides (NGM do inglês, *nematode growth media*) semeado com *Escherichia coli* (*E.coli*) OP50 como fonte de alimento a 20 °C (Brenner, 1974).

Para obtenção de todos os vermes em seu estágio J1 (juvenil, J1) os nematoides passaram por um processo de sincronização, consistindo em uma solução de lise (NaOH 1M, NaClO 1%, e H₂O destilada), para que a cutícula das fêmeas ovígeras fosse rompida, obtendo-se os ovos. Após a sincronização, os vermes foram mantidos na incubadora ($\pm$ 14 horas) até o momento de eclosão dos ovos. Foram realizados pelo menos cinco testes para cada amostra, com leituras em triplicata. Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Professora Dra. Daiana S. Ávila, do laboratório Bioquímica em Toxicologia em *C. elegans* da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

Diferentes concentrações (1, 2, 3, e 5 mg/mL) das formulações de nanopartículas contendo ou não os OEs foram preparadas. Os vermes em estágio J1 de *C. elegans* foram expostos aos tratamentos durante 30 minutos em meio líquido. Após a exposição, os vermes

foram transferidos para placas com meio NGM/*E.coli* OP50, e então mantidos a 20°C por 48 horas para ensaios posteriores.

4.11.1 Ensaio de sobrevivência e determinação da concentração letal 50% (CL_{50})

Para determinar a letalidade das nanopartículas, (nanopartículas contendo ou não os OEs), os vermes sobreviventes foram analisados; ao total foram expostos 1500 vermes (juvenis, J1) aos diferentes tratamentos. Após 48 horas de exposição, uma grade transparente foi colocada sob a placa NGM e 25 quadrantes foram analisados sob um microscópio de dissecação, onde os vermes vivos foram diferenciados dos vermes mortos (imóvel e sem reação). Um modelo dose-resposta sigmoidal foi usado para desenhar as curvas e obter o CL_{50} com *Graphpad Prism 10* (Jacques *et al.*, 2017). A partir dos resultados obtidos com *C. elegans*, as melhores formulações foram selecionadas para determinação da CL_{50} para o *P. brachyurus*.

4.11.2 Swimming Assay

Para a avaliação da motilidade, aproximadamente 60 vermes foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços após 48 horas do tratamento com as nanoformulações. Após a transferência dos vermes, a placa foi imediatamente submetida à análise utilizando o equipamento WMicrotracker MINI, por um período contínuo de duas horas. Esse procedimento foi repetido em pelo menos seis experimentos independentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Os dados de motilidade foram expressos como índice de motilidade, conforme descrito em estudos anteriores (Liu *et al.*, 2022). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*One-way ANOVA* com posterior de Turkey-Kramer). Diferenças significativas foram realizadas com $p < 0,05$ (Campos; Proença; Oliveira *et al.*, 2018).

4.11.3 Ensaio de Estresse Oxidativo

O 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) é uma sonda molecular fluorescente que adentra a célula, e então é convertida em H₂-DCF, e é rapidamente oxidada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, resultando no corante fluorescente diclorofluoresceína (DCF).

Após a exposição das nanopartículas contendo ou não os óleos essenciais (C5P, C5P-M2, NE-M2) descrito no item 4.10. Cerca de 500 juvenis (J1) foram transferidos para 1 mL da solução controle (solução tampão M9), contendo 50 mM de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH2-DA) por uma hora no escuro. Após isso, os juvenis são lavados para remover o excesso de corante, são transferidos para placas contendo o anestésico levamisol e são analisados em um microscópio de fluorescência (Eclipse Ti2-E, Nikon Corporation, Tokyo, Japão) à 20°C.

As imagens de 10 juvenis de cada tratamento são tiradas e a fluorescência reativa do corpo inteiro é determinada utilizando o *software* ImageJ. Os juvenis com a sonda fluorescente são observados por 24 horas após o tratamento. As medições de fluorescência são expressas pela porcentagem de controle. As medições são repetidas três vezes e os ensaios foram realizados em duplicata. Foi utilizado um controle positivo de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (Teste T não pareado). Diferenças significativas foram realizadas como $p < 0,05$ (Grillo *et al.*, 2014).

4.11.4 Ensaio de Brood Size

A capacidade reprodutiva do *C. elegans* pode ser analisada pelo tamanho da ninhada (do inglês, *brood size*). Após 48 horas da exposição as nanoformulações contendo ou não os OEs (C5P, C5P-M2, NE-M2), nematoides de todos os grupos, incluindo o controle (solução tampão M9), foram transferidos para as placas contendo NGM e *E. coli* OP50. Os nematoides foram individualmente transferidos para novas placas NGM a cada 24h até o final do período reprodutivo.

Utilizando um estereomicroscópio (Leica S8 Apo Steriomicroscope, SP, Brazil), o tamanho dos juvenis foi acompanhado diariamente. O tamanho da ninhada foi normalizado a partir do grupo controle. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em pelo menos três experimentos independentes, para garantir a reprodutibilidade dos resultados (Qu *et al.*, 2019). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*One way* ANOVA com a posterior de Turkey-Kramer). Diferenças significativas foram realizadas como $p < 0,05$ (Grillo *et al.*, 2014).

4.12 Avaliação de atividade biológica com *P. brachyurus*

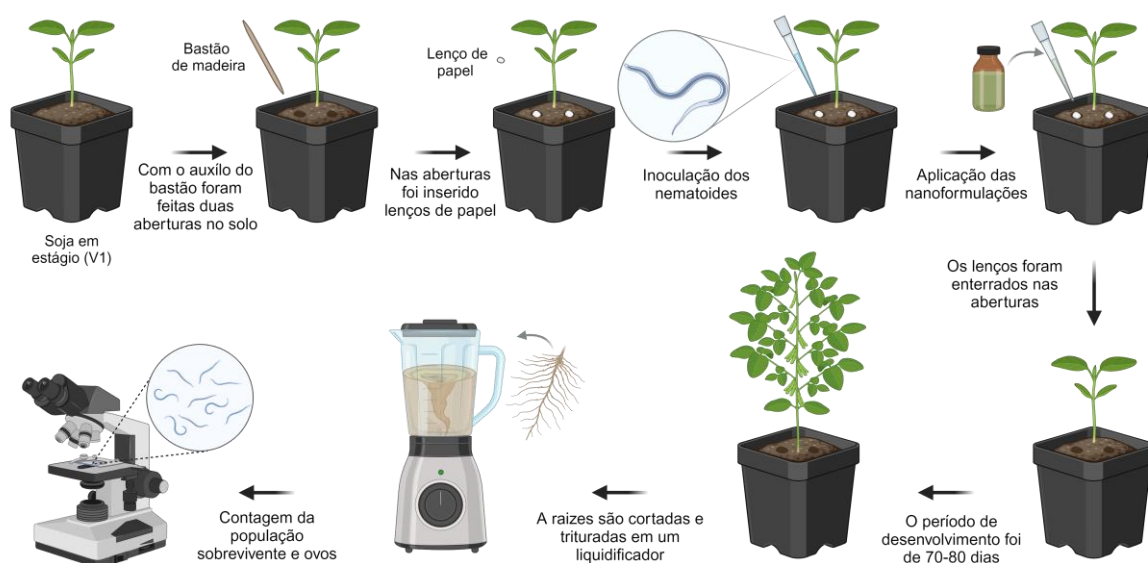
4.12.1 Ensaio *in vivo*

O ensaio foi realizado utilizando soja como planta hospedeira. As sementes foram plantadas em copos de 700 mL de plástico, e então após atingir o estágio (V1) foi feito a inoculação. Para os inóculos, foram feitas duas fendas paralelas de 4 cm de profundidade no solo, com o auxílio de um bastão de madeira.

Para a retenção do inóculo, foram utilizados lenços de papel (Papel *Softly* Elite, folha dupla). Para cada fenda, foi inoculado 1 mL de inóculo de *Pratylenchus brachyurus*, e em cada fenda foi aplicado 2 mL de nanoformulação (o equivalente a 20 mg/mL da concentração de ativo) contendo ou não os óleos essenciais. Ao todo foram inoculados 222 nematoides em dois experimentos independentes, e as plantas foram mantidas em uma casa de vegetação até o término do experimento (80 dias). Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Mario Massayuki Inomoto no Laboratório de Nematologia da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP – Piracicaba).

Para a análise da atividade biológica, as raízes foram coletadas e trituradas em um liquidificador por 20 segundos duas vezes, peneirada (Granutest, *Mesh*: 500, 200, 60) para poder obter-se uma solução para a contagem da população dos nematoides (Figura 7). A produção de vagens foi analisada através da contagem por planta, enquanto produção de grãos foi analisada utilizando uma balança analítica para a pesagem dos grãos (Castanheira *et al.*, 2020). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*one-way* ANOVA com teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e pós-teste de Tukey) no *software* Statisticx 10. Diferenças significativas foram realizadas como $p < 0,05$ (Grillo *et al.*, 2014).

Figura 7. Esquemática de metodologia de atividade biológica *in vivo* com *Pratylenchus brachyurus*. Criada com Biorender.com



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualificação dos óleos essenciais por CGEM

Para assegurar a identidade química dos óleos essenciais (OEs) comerciais (Ferquima – Indústria e Comércio Ltda) de Tomilho-branco (*Thymus vulgaris*), Manjerona (*Origanum manjerona*), Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), e Orégano (*Origanum vulgare*) foram feitas análises qualitativas através da Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massa (CG-EM) (Agilent Technologies 7890A/5975C inert MSD). Para todas as metodologias, utilizamos o Hélio como gás de arraste, no modo *splitless*, e a coluna capilar HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m) (Agilent Technologies).

A espectrometria de massa foi conduzida comparando os espectros com a biblioteca Willey do CG-EM e utilizando o Índice de Retenção Linear (LRI) em comparação com dados da literatura. A correspondência (*match*) na biblioteca do CG-EM é uma forma direta de comparar um espectro desconhecido com os picos existentes na biblioteca. O número do *match* indica a similaridade com o espectro conhecido. O *National Institute of Standards and Technology* (NIST) utiliza uma escala de 0 a 1000 para avaliar a qualidade do *match*, sendo > 900 excelente, 800-900 bom, 700-800 regular, e < 600 ruim (Jordi Labs, 2017).

5.1.1 Óleo essencial de tomilho-branco e manjerona

Um total de oito componentes foram identificados no óleo essencial de tomilho-branco, com exceção do eucaliptol, que obteve uma correspondência considerada regular, e a cânfora, entre 800-900, todos os outros tiveram o que é considerado excelência para a análise (Quadro 3). Foram apontados cinco componentes na análise do óleo essencial de manjerona, os componentes α -terpinol e m-Cimeno foram os únicos dentre os componentes analisados do OE de manjerona que ficaram com o *match* entre 800-900.

As diferenças entre os índices de retenção tabelados (NIST) e os calculados pelo equipamento podem ser atribuídas às diferenças nas composições químicas dos óleos essenciais, influenciadas por fatores como solo, clima, região geográfica e condições climáticas. Estas variações são amplificadas pelas condições experimentais de cromatografia, incluindo referências espectrais, massas moleculares, fases e tamanhos das colunas, fluxo de gás e outras variáveis, como observado em estudos anteriores. Essas discrepâncias são consistentes em todos os óleos essenciais analisados (Idroes *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 2014; Polatoglu, 2013).

Quadro 3. Caracterização química do OE de Tomilho e manjerona por GC-EM. As siglas significam: IR_{tab} - Índice de Retenção Tabelado de acordo com o NIST, e IR_{EA} - Índice de Retenção de Escala de Alcanos

Óleo essencial de Tomilho-branco				
Composição química	Tempo de Retenção (minutos)	Match	IR _{Tab}	IR _{EA}
Timol	21.102	941	1296	1262
o-Cimeno	11.620	947	1023	1042
Carvacrol	21.319	938	1316	1262
Linalol	14.223	947	1103	1082
γ terpineno	12.749	942	1107	998
α -pineno	8.541	928	942	948
Eucaliptol	11.865	711	1046	1059
Cânfora	16.041	891	1161	1121

Óleo essencial de Manjerona				
Composição química	Tempo de Retenção (minutos)	Match	IR _{Tab}	IR _{EA}
(-) - Terpinen-4-ol	15.037	926	1192	1137
α -terpinol	10.102	887	1024	998
Terpinoleno	12.129	923	1097	1052
m-Cimeno	10.369	895	1030	1042
γ terpineno	12.749	952	1107	998

5.1.2 Óleo essencial de Capim-limão e Orégano

Foram identificados quatro componentes no OE de capim-limão. Todos os componentes encontrados têm sua correspondência (*match*) classificado >900. Na análise do OE de orégano foram apontados seis componentes: todos com o *match* >900 (Quadro 4).

Quadro 4. Caracterização química do OE de Capim-limão e Orégano por GC-EM. as siglas significam: IR_{tab} - Índice de Retenção Tabelaado de acordo com o NIST, e IR_{EA} - Índice de Retenção de Escala de Alcanos.

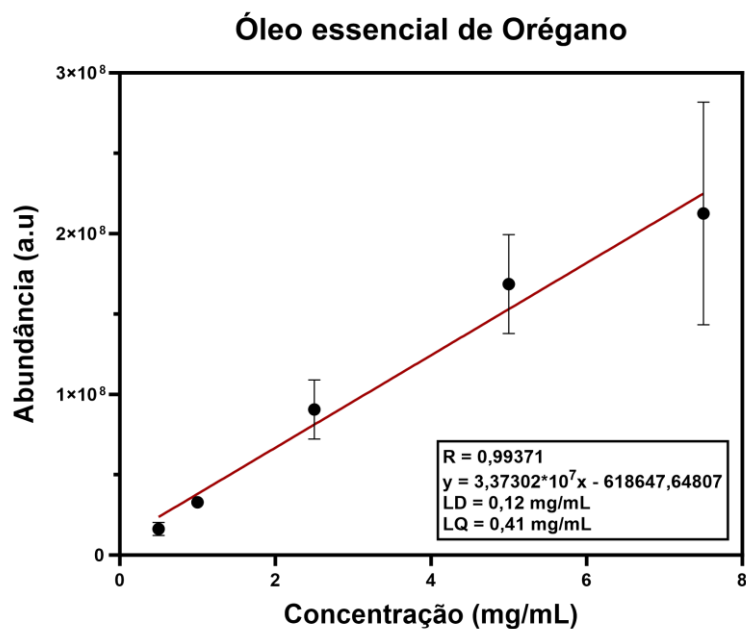
Óleo essencial de Capim-limão				
Composição química	Tempo de Retenção (minutos)	Match	IR _{Tab}	IR _{EA}
α -Citral	27.121	961	1270	1174
β -Citral	26.267	967	1245	1174
Linalol	21.889	918	1103	1082
Acetato de Geranila	30.115	931	1386	1352
Óleo essencial de Orégano				
Composição química	Tempo de Retenção (minutos)	Match	IR _{Tab}	IR _{EA}
Carvacrol	20.249	939	1298	1262
Timol	19.836	936	1296	1262
m-Cimeno	11.931	951	1026	1042
o-Cimeno	11.648	900	1020	1042
Linalol	14.230	911	1103	1082
Cânfora	15.766	966	1161	1121

5.2 Análise quantitativa por GC-EM

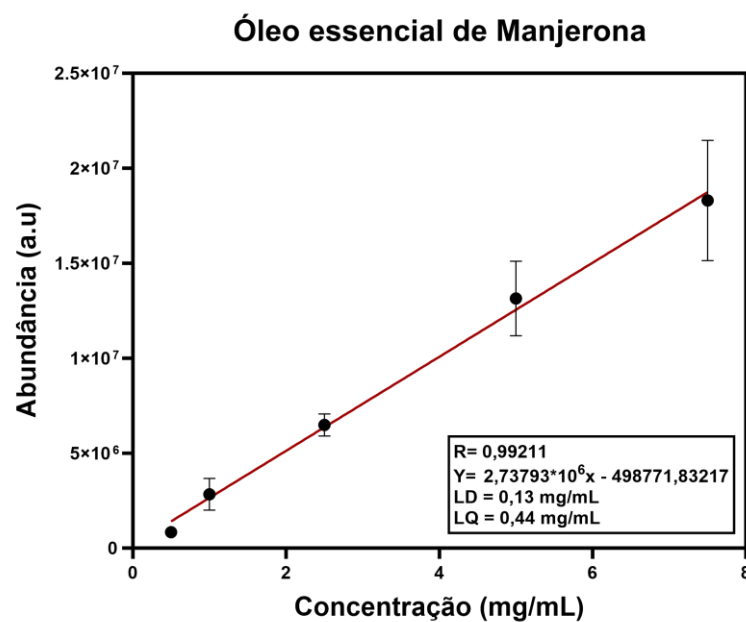
A análise quantitativa dos OEs foi realizada seguindo as metodologias anteriormente citadas, com algumas alterações, a depender do OE analisado. Diferentes concentrações dos OEs foram preparadas (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; e 7,5 mg/mL) e tiveram seu valor de abundância mensurado. A curva analítica final para cada um dos OEs (Figura 8) foi confeccionada com base na abundância obtida a partir de 3 curvas realizadas em três dias consecutivos.

Figura 8. Curva analítica obtida para (A) óleo essencial de tomilho-branco; (B) óleo essencial de manjerona (C) óleo essencial de orégano (D) óleo essencial de Capim-limão.

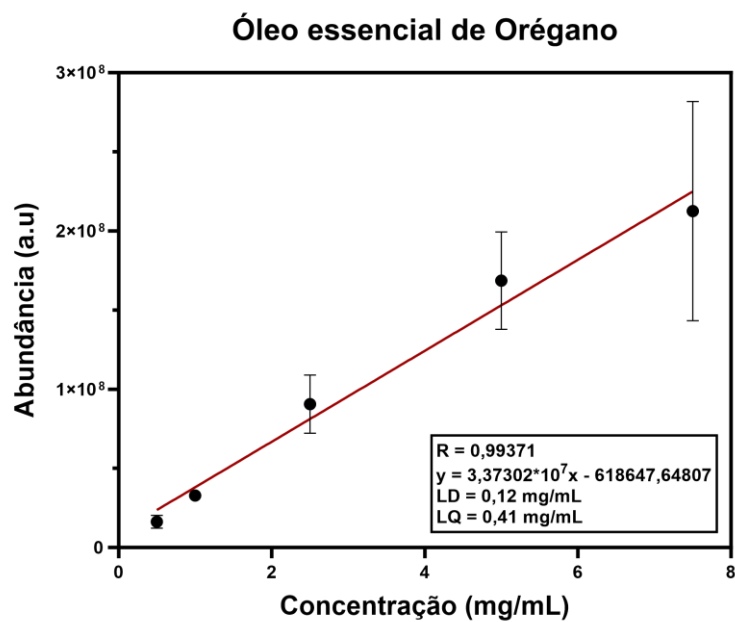
(A) Óleo essencial de tomilho-branco



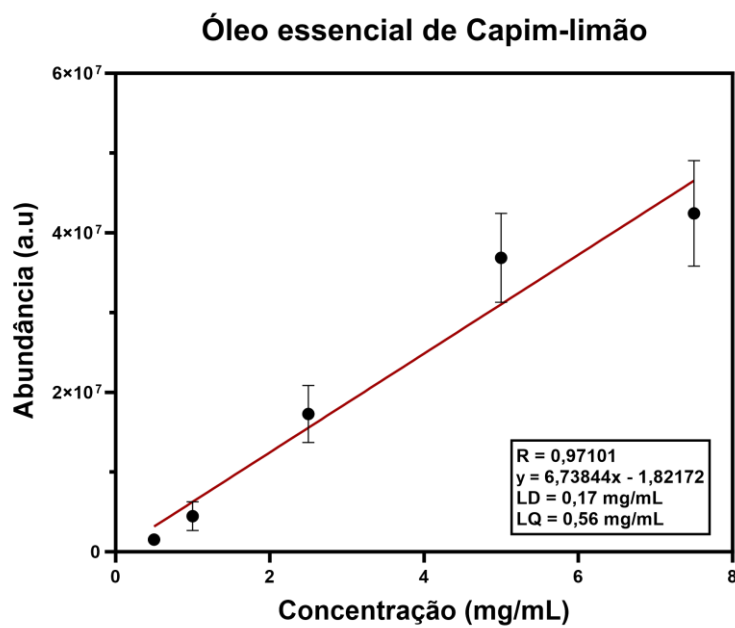
(B) Óleo essencial de manjerona



(C) Óleo essencial de orégano



(D) Óleo essencial de capim-limão



5.3 Otimização das condições experimentais

O planejamento fatorial foi realizado através do *software Statgraph 19*, utilizando como variáveis independentes, a caseína (nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1%), a pectina (nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5%), e o tratamento térmico (nos tempos de 2, 5 e 10

minutos); e como variáveis dependentes, o diâmetro médio, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação. Desta maneira, foram obtidas 27 possíveis combinações de formulações (denominadas F) (Tabela 1).

Tabela 1. Planejamento fatorial com as 27 combinações, e os resultados das variáveis dependentes diâmetro médio (DM), desvio padrão (SD), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP), eficiência de encapsulação (EE%).

Nanopartículas	DM (nm)	PDI	ZP (mV)	EE%
F1	1369±56	0,427±0,081	-20,2±0,379	73,67%
F2	845±88	0,448±0,083	-35,7±7,03	87,65%
F3	872±31	0,359±0,076	-27,5±3,23	72,97%
F4	740±23	0,489±0,037	-27,0±1,08	91,41%
F5	1276±61	0,429±0,071	-31,2±2,94	87,69%
F6	714±10	0,519±0,004	-29,6±3,6	99,51%
F7	1407±78	0,419±0,059	-29,3±2	90,22%
F8	633±12	0,446±0,069	-28,7±2,4	92,19%
F9	1229±27	0,302±0,011	-29,6±2,04	82,43%
F10	1448±11	0,332±0,009	-29,5±2,84	80,97%
F11	1481±55	0,393±0,05	-29,1±1,81	81,41%
F12	372±9	0,389±0,052	-29,4±1,76	92,96%
F13	616±5	0,276±0,003	-32,8±1,76	98,15%
F14	450±19	0,403±0,037	-27,2±1,5	100%
F15	624±71	0,487±0,061	-27,7±2	96,00%
F16	1074±20	0,416±0,026	-31,2±2,91	86,52%
F17	275±29	0,331±0,023	-32,7±2,27	90,99%
F18	711±40	0,438±0,07	-31,1±3,36	87,74%
F19	332±10	0,428±0,028	-28,3±0,751	87,95%
F20	381±4	0,348±0,047	-31,9±2,74	82,83%
F21	995±92	0,398±0,086	-35,3±3,84	85,70%
F22	405±8	0,409±0,037	-33,1±3,18	87,33%
F23	526±62	0,436±0,079	-35,2±2,86	90,48%
F24	309±14	0,232±0,024	-37,5±3,4	88,35%
F25	385±7	0,322±0,055	-27,7±2,72	91,78%
F26	1133±64	0,364±0,084	-34,0±3,43	89,10%
F27	9451±39	0,456±0,076	-33,9±3,2	92,04%

Dessa forma, as formulações selecionadas levando em consideração a relação entre variáveis e variáveis independentes foram as formulações F13 e F14, estas continham 0,25% de caseína e 0,5% de pectina, 0,5% caseína e 0,5% de pectina, respectivamente.

Para facilitar a nomenclatura das nanoformulações foi colocado como prefixo C5P (nanoformulações com 0,5% caseína) e C2P (nanoformulações com 0,25% de caseína). E como sufixo, para as nanoformulações com os óleos essenciais foi colocado M1 (Mistura 1 - óleo essencial de tomilho branco e óleo essencial de manjerona), e M2 (Mistura 2 - óleo essencial de capim-limão e óleo essencial de orégano).

Ao total foram preparadas seis formulações: duas formulações controle sendo estas, C5P e C2P. Foram preparadas quatro formulações carregadas, duas sendo com a Mistura 1, deste modo, C5P-M1 e C2P-M1. E as outras duas formulações foram preparadas com a Mistura 2, deste modo, C5P-M2 e C2P-M2. A concentração final de cada óleo essencial individualmente foi de 0,5% para todas as formulações, totalizando 1% da mistura dos óleos essenciais para cada formulação.

5.4 Caracterização físico-química e estabilidade das formulações

5.4.1 Diâmetro médio, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e Potencial hidrogeniônico

O equipamento ZetaSizer ZS90 (Malvern Instruments), a um ângulo fixo de 90°, foi utilizado para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersão (PDI), utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons. O potencial zeta, foi analisado pelo mesmo equipamento, porém utilizando a técnica de microeletroforese.

As nanopartículas controle, C5P e C2P, apresentaram diâmetro médio inicial de 438 ± 2 nm e 385 ± 4 nm, respectivamente, e observou-se a formação de agregados após 30 e 15 dias, respectivamente (Figura 9 - A).

As formulações contendo OEs, C5P-M1 e C5P-M2 apresentaram diâmetro inicial de 422 ± 19 nm e 432 ± 13 nm, respectivamente. Posteriormente, ambas as nanopartículas aumentaram significativamente com 45 dias de armazenamento, com 60 dias houve um retorno para os valores similares aos iniciais, entretanto, ao final do período de observação de 120 dias, houve novamente um aumento significativo do diâmetro médio, sendo a C5P-M1 com 935 ± 50 nm, e C5P-M2 com 752 ± 10 nm.

As formulações C2P-M1 e C2P-M2 apresentaram um diâmetro inicial de 640 ± 5 nm e 620 ± 30 nm, respectivamente, e no acompanhamento ao longo do tempo apresentaram o

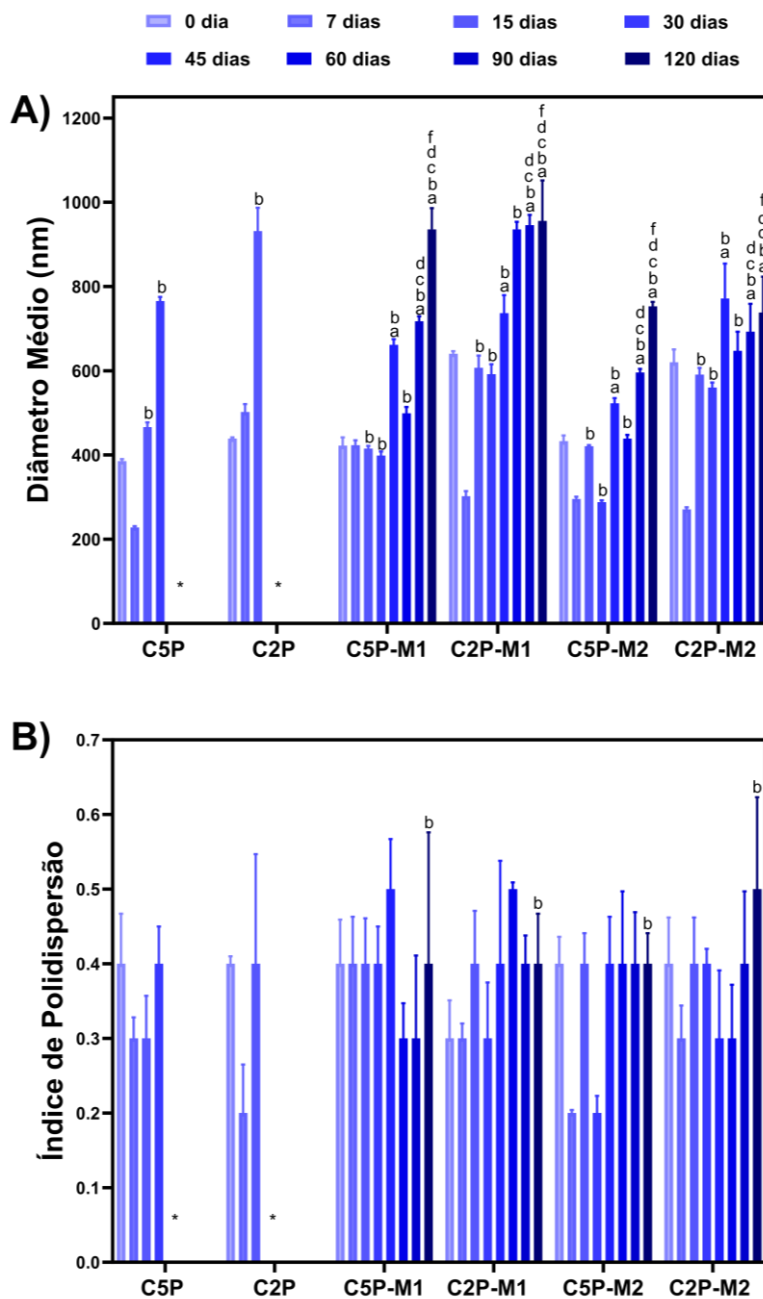
mesmo comportamento das nanopartículas preparadas com uma concentração maior de caseína. Deste modo, ao final do acompanhamento com 120 dias, as partículas C2P-M1 e C2P-M2 tiveram o diâmetro médio de $956,1 \pm 95$ nm e 738 ± 85 nm, respectivamente.

A adição das misturas de OEs nas nanopartículas levou a um aumento do diâmetro hidrodinâmico médio, principalmente para as nanopartículas com menor concentração de caseína, um aumento aproximado de 200 nm. As nanopartículas sem ativos também mostram um tamanho hidrodinâmico maior quando preparadas com uma menor concentração de caseína.

Provavelmente, neste caso, o tamanho menor se deve ao maior número de interações entre os ativos e a matriz, dando uma maior estabilidade a essas partículas. Corroborando com essa observação, possivelmente, a falta dos ingredientes ativos levou à instabilidade das nanopartículas controle, as quais precipitaram após 15 dias de acompanhamento.

O índice de polidispersão (PDI) foi outro parâmetro analisado (Figura 9 - B). As nanopartículas C5P apresentaram o PDI inicial de $0,4 \pm 0,06$, similar ao valor encontrado para as nanopartículas C2P que foi observado o PDI de $0,4 \pm 0,01$. As nanopartículas C5P-M1 e C5P-M2 tiveram um PDI inicial observado de $0,4 \pm 0,05$ e $0,4 \pm 0,03$, respectivamente, e as formulações C2P-M1 e C2P-M2 apresentaram o PDI inicial de $0,3 \pm 0,05$ e $0,4 \pm 0,06$. Todas as formulações não apresentaram alterações significativas deste parâmetro no tempo avaliado.

Figura 9. Caracterização da estabilidade das partículas: (A) diâmetro hidrodinâmico e (B) índice de polidispersão, em função do tempo para as nanopartículas controle (C5P e C2P), e partículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1, C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias, d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA com *post-test* Tukey).



Também foi acompanhado o potencial zeta (PZ) das nanopartículas em função do tempo (Figura 10 - A). As nanopartículas controles C5P e C2P em sua avaliação inicial apresentaram PZ de $-32,1 \pm 1,5$ mV e $-31,1 \pm 1,4$ mV, respectivamente, e tiveram uma diminuição significativa com sete dias de observação, sendo a C5P com $-13,3 \pm 1,2$ mV e

C2P com $-12,4 \pm 1,2$ mV. E nos outros períodos durante sua análise até a precipitação, o potencial zeta teve variações constantes.

As nanopartículas C5P-M1 e C5P-M2 apresentaram em seu PZ inicial $-32,3 \pm 1,2$ mV e $-31,2 \pm 1,6$ mV, respectivamente, e apresentaram variação significativa com 45 e 60 dias de armazenamento, onde houve uma diminuição significativa de PZ. No período final de 120 dias de observação as nanopartículas C5P-M1 e C5P-M2 apresentaram PZ de $-14,0 \pm 0,9$ mV e $-16,6 \pm 1,3$ mV.

As nanopartículas C2P-M1 e C2P-M2 apresentaram em seu período inicial o PZ de $-29,1 \pm 1,5$ mV e $-30,8 \pm 1,6$ mV, respectivamente, e só apresentaram variação significativa com 45 e 60 dias de armazenamento, tendo uma diminuição de PZ, essa variação permaneceu até o último período de observação de 120 dias, onde as nanopartículas C2P-M1 e C2P-M2 apresentaram PZ de $-20,7 \pm 2,1$ mV e $-27,0 \pm 0,8$ mV, respectivamente.

O potencial hidrogeniônico (pH) também foi avaliado (Figura 10 - B), pois alterações no pH podem indicar processos de degradação de componentes da formulação, afetando a estabilidade do sistema. As nanopartículas C5P e C2P apresentaram o pH inicial de $5,1 \pm 0,01$ e $4,78 \pm 0,02$, respectivamente, sendo observadas variações durante sua observação, e após 30 e 15 dias as formulações precipitaram.

Para as nanoformulações com óleos essenciais, C5P-M1 e C5P-M2 no período inicial o seu pH se encontrava em $4,89 \pm 0,02$ e $4,78 \pm 0,01$, respectivamente, com 45 dias e 60 dias de armazenamento foi observado aumentos significativos nas duas formulações. Para as nanopartículas C2P-M1 e C2P-M2 foi observado no período inicial o pH de $4,78 \pm 0,02$ e $4,87 \pm 0,03$, apresentando alterações significativas a partir de 45 dias de armazenamento.

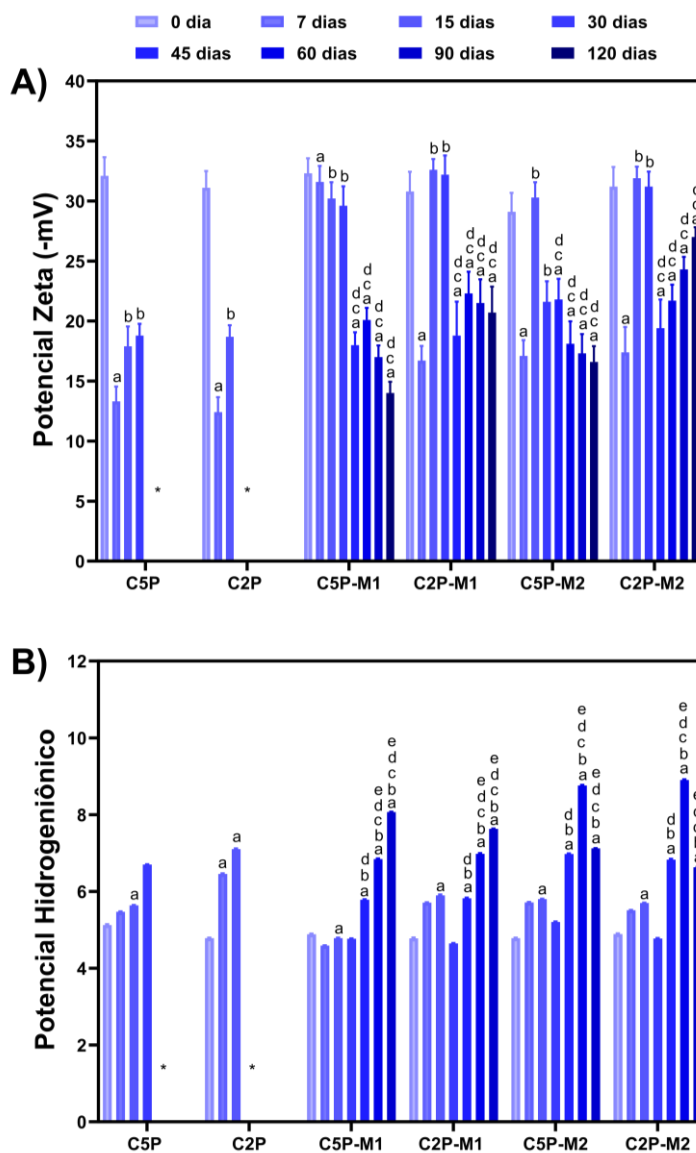
O pH desempenha um papel significativo nas interações entre a caseína e a pectina, afetando a ionização entre as moléculas. Proteínas do leite (caseína) são instáveis em pH 5,5, enquanto a pectina de alto metoxil (derivada de cascas de frutas cítricas) aumenta as chances de agregação das partículas (Peterson; Rankin; Ikeda, 2019; Wusigale; Liang; Luo, 2020).

Hua *et al* (2021) prepararam nanopartículas de caseína-pectina contendo curcumina, e os valores encontrados para o diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão foram mais baixos. Os autores trabalharam com três faixas de pH (2, 3, 4) e para o pH 4, o diâmetro médio foi de 266 ± 2 nm, PDI de $0,193 \pm 0,042$ e PZ de $-13,29 \pm 1,5$ mV. Nas

outras faixas de pH, houve aumento do tamanho hidrodinâmico, queda do potencial zeta e da eficiência de encapsulação.

Valores mais baixos, também foram obtidos por Luo *et al* (2015), nanopartículas de caseína-pectina para rutina foram testadas em duas faixas de pH (7 e 3,7) e com e sem o tratamento térmico (85°C/30 minutos). Os resultados com tratamento térmico e pH 3,7 ficaram com o diâmetro de 198 ± 4 nm, PDI de $0,2 \pm 0,01$ e PZ de $-19,3 \pm 1,1$ mV.

Figura 10. Caracterização da estabilidade das partículas: (A) potencial zeta e (B) potencial hidrogeniônico (pH), em função do tempo para as nanopartículas controle (C5P e C2P), e partículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1, C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias, d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA com *post-test* Tukey).



5.4.2 Concentração e tamanho das partículas

A concentração e o tamanho hidrodinâmico das partículas foram analisados pela técnica de rastreamento de nanopartículas - *nanoparticle tracking analysis* (NTA) (Figura 7). As nanopartículas C5P apresentaram diâmetro médio de 358 ± 14 nm e apresentaram um aumento significativo com 30 dias de armazenamento. As nanopartículas C2P tiveram um diâmetro inicial de 350 ± 10 nm e não apresentaram aumento significativo no tempo analisado, porém, precipitaram após 15 dias de armazenamento (Figura 11 - A)

Para as nanopartículas C5P-M1 e C5P-M2 foi observado os diâmetros médios iniciais de 231 ± 10 nm e 185 ± 13 nm, e com 30 dias de armazenamento foi observado um aumento significativo em ambas as partículas, com posterior diminuição com 60 dias de armazenamento e esse diâmetro se manteve até o final do período de observação com 120 dias. As nanopartículas C2P-M1 e C2P-M2 apresentaram o diâmetro inicial de 165 ± 15 nm e 200 ± 18 nm, respectivamente, e seguiram o mesmo padrão apresentado pelas nanopartículas com uma concentração maior de caseína.

Em relação à concentração de nanopartículas, para as nanopartículas controle C5P e C2P, foi observado no período inicial a concentração de $3,49 \cdot 10^{13}$ partículas/mL e $9,35 \cdot 10^{12}$ partículas/mL, respectivamente, em ambas as partículas houve uma queda significativa com 30 e 15 dias, respectivamente. A nanopartícula C5P com o período de 30 dias foi observado a concentração de $7,34 \cdot 10^{12}$ partículas/mL, e a nanopartícula C2P com 15 dias foi observado uma concentração de $3,77 \cdot 10^{12}$ partículas/mL. A queda nos valores das concentrações das nanopartículas, indica uma agregação no sistema, que logo após esse período foi observada (Campos *et al.*, 2022).

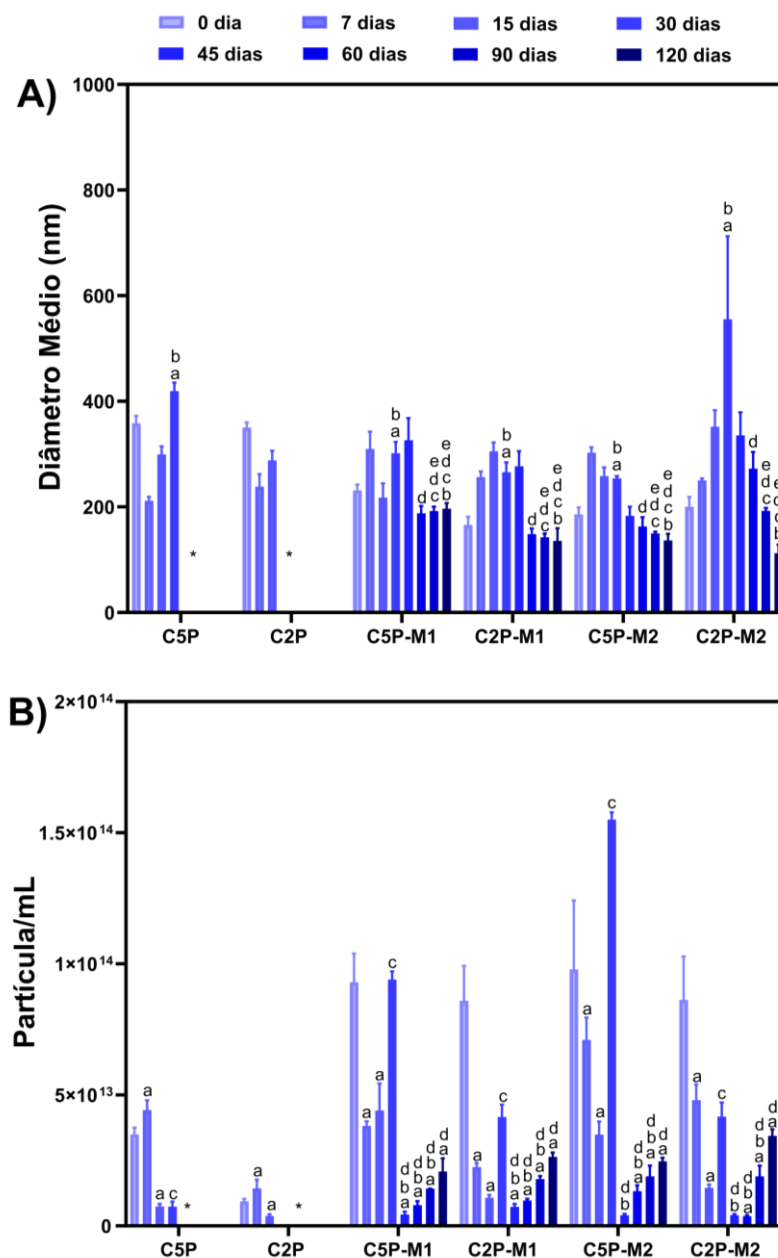
Para a nanopartículas contendo os OEs, a C5P-M1, foi observado no período inicial a concentração de $9,29 \cdot 10^{13}$ partículas/mL, com 45 dias de observação houve uma queda significativa para $4,33 \cdot 10^{12}$ partículas/mL, posteriormente a concentração voltou a aumentar gradualmente e no período final de 120 dias observação a concentração estava em $2,07 \cdot 10^{13}$ partículas/mL. A nanopartícula C5P-M2 foi observado no período inicial a concentração de $9,79 \cdot 10^{13}$ partículas/mL, com 45 dias de observação houve uma queda significativa para $4,00 \cdot 10^{12}$ partículas/mL, posteriormente a concentração voltou a aumentar gradualmente e no período final de 120 dias observação a concentração estava em $3,43 \cdot 10^{13}$ partículas/mL.

Para as nanopartículas C2P-M1, foi observado no período inicial a concentração de $8,59.10^{13}$ partículas/mL, com 45 dias de observação houve uma queda significativa para $7,26.10^{12}$ partículas/mL, posteriormente a concentração voltou a aumentar e no período final de 120 dias observação a concentração estava em $2,63.10^{13}$ partículas/mL. A nanopartícula C2P-M2 foi observado no período inicial a concentração de $8,62.10^{13}$ partículas/mL, com 45 dias de observação houve uma queda significativa para $3,67.10^{12}$ partículas/mL, posteriormente a concentração voltou a aumentar e no período final de 120 dias observação a concentração estava em $3,43.10^{13}$ partículas/mL.

Em estudos Duerasch *et al* (2020), obteve resultados diferentes dos seus sistemas de micelas de caseína, no estudo estudou-se a possibilidade de remoção das β -caseínas para estudo de estabilidade das micelas, e mesmo com a retirada de 45% β -caseínas da estrutura micelar não houve instabilidade, não tendo diminuição da concentração das partículas em análises de NTA.

As diferenças no diâmetro médio das nanopartículas medidas pelas técnicas de DLS e NTA são esperadas devido às particularidades de cada método (de Oliveira *et al.*, 2019; Germano-Costa *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2021). Na técnica de DLS, a dispersão de luz pode ocultar partículas menores, já que as maiores dispersam mais luz. Enquanto, a técnica de NTA realiza um rastreamento individual das partículas (James; Driskell, 2013).

Figura 11. Caracterização das nanopartículas pela técnica de NTA. Diâmetro médio (A) e concentração (B) das nanopartículas controle (C5P e C2P), nanopartículas carregadas (C5P-M1, C2P-M1; C5P-M2, C2P-M2). Variação significativa entre os grupos em função do tempo: a – com o tempo zero, b – com sete dias, c – com 15 dias, d – com 30 dias, e – com 45 dias, f – com 60 dias, g – com 90 dias e h – com 120 dias. O símbolo * indica precipitação. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (two-way ANOVA com *post-test* Tukey).

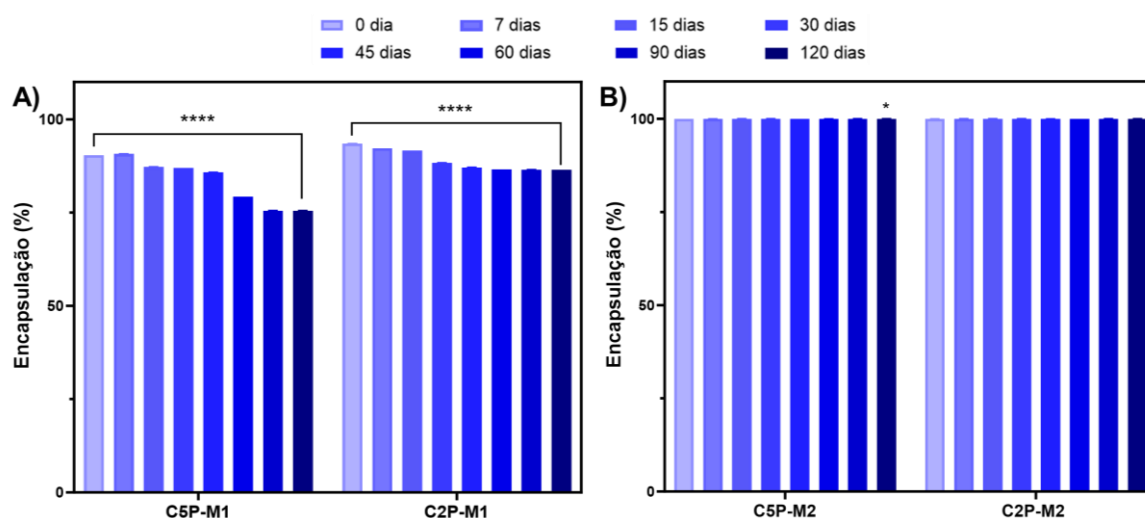


5.5 Eficiência de Encapsulação

O último parâmetro a ser analisado foi a eficiência de encapsulação em função do tempo (Figura 12). Para as nanopartículas C5P-M1 e C2P-M1 no tempo inicial as porcentagens de ativos encapsulados foi de $90,3 \pm 0,02\%$ e $93,4 \pm 0,01\%$, respectivamente

(Figura 12 - A). Após 60 dias de armazenamento houve uma redução de 11,1% e 6,86%, respectivamente. Para as nanopartículas C5P-M2 e C2P-M2 no tempo inicial as porcentagens de ativos presentes foi de $99,9 \pm 0,01\%$ e $99,9 \pm 0,01\%$, respectivamente (Figura 12 - B). Após 45 dias de armazenamento houve uma redução de 0,02% para a C5P-M2, mas não teve alterações posteriores com 60 dias de armazenamento, para a C2P-M2 não houve redução no período de observação.

Figura 12. Caracterização da eficiência de encapsulação das nanopartículas: (A) C5P-M1 e C2P-M1. (B) C5P-M2 e C2P-M2. Variação significativa entre os grupos em função do tempo é indicada pelo símbolo *. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (two-way ANOVA com *post-test Tukey*)



Estudos utilizando nanopartículas de caseína-pectina realizados por Hua *et al* (2021) mostraram resultados semelhantes. Avaliaram a eficiência das nanopartículas contendo curcumina de acordo com diferentes faixas de pH, as nanopartículas com maior eficiência de encapsulação (93%) foram as com o pH 4 devido à proximidade com o ponto isoelétrico (pH= 4,6) da caseína. Enquanto as outras faixas (pH 2 e 3), obtiveram eficiência de encapsulação de 37% e 89%, respectivamente. Luo; Pan e Zhong, (2015), estudando nanopartículas de caseína-pectina contendo rutina, demonstraram que o tratamento térmico influencia positivamente na eficiência de encapsulação. As nanopartículas sem tratamento térmico obtiveram $33,4 \pm 4,4\%$ de eficiência de encapsulação, enquanto as nanopartículas com tratamento térmico obtiveram $54,8 \pm 1,1\%$ de eficiência de encapsulação.

5.6 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Agilent Technologies - Cary 630) foram feitas a fim de verificar as possíveis interações das nanopartículas com os óleos essenciais. Os espectros foram analisados em um equipamento de Refletância Total Atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 640 a 4000 cm^{-1} .

As principais bandas de absorção estão indicadas por setas nas Figura 13. As bandas encontradas nos espectros de FTIR, foram comparadas com as bandas características encontradas na literatura, para a pectina (Elmizadeh *et al.*, 2024), caseína (Chen *et al.*, 2020), e os OEs de manjerona (Rasti *et al.*, 2023), tomilho-branco (Catauro *et al.*, 2017), orégano (Fraj *et al.*, 2019) e capim-limão (Soltanzadeh *et al.*, 2021).

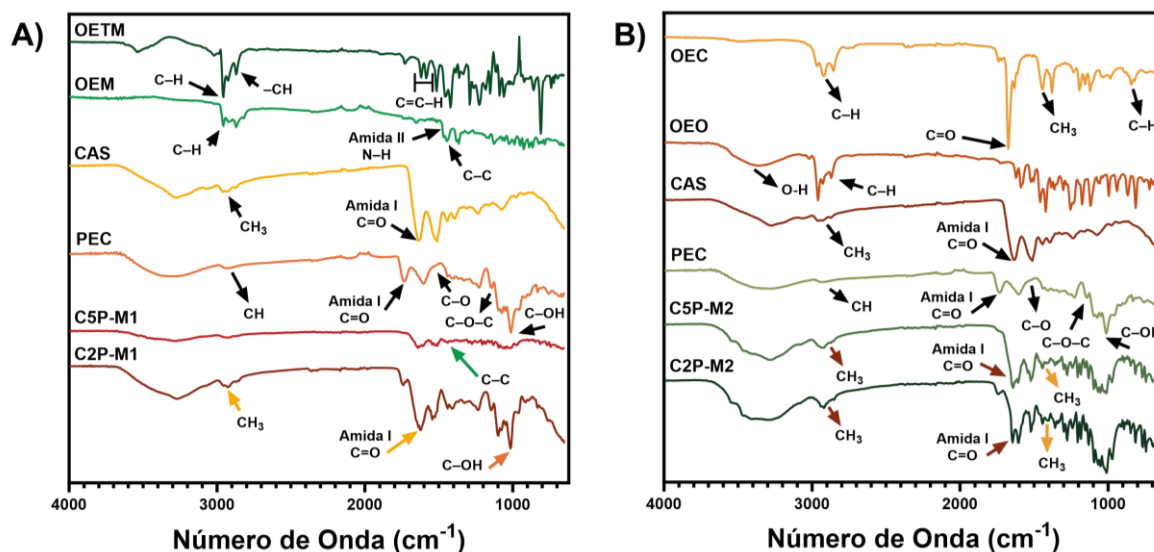
No espectro da pectina (Figura 13, PEC), destacam-se bandas em 2929,7 cm^{-1} (estiramento do grupo CH), 1733,2 cm^{-1} (grupo esterificado C=O), 1602,8 cm^{-1} (grupo não esterificado C–O), 1225,56 cm^{-1} (estiramento de C–OH das cadeias ramificadas) e 1010,05 cm^{-1} (grupo C–O–C). Na caseína (Figura 9, CAS), os picos foram em 2959,5 cm^{-1} (CH₃) e 1636,3 cm^{-1} (C=O).

Na manjerona (Figura 13A, OEM), observa-se a banda em 2959,5 cm^{-1} (estiramento do aromático C–H), um pico em 1513,3 cm^{-1} (vibração de flexão da amida secundária N–H) e a banda em 1446,2 cm^{-1} (estiramento do anel aromático C–C). O tomilho-branco (Figura 13A, OETM) tem duas bandas fortes em 2959,5 cm^{-1} e 2870,1 cm^{-1} (associado ao simétrico e assimétrico C–H estirado em –CH alifático), as outras duas bandas entre 1617 e 1588,1 cm^{-1} são sinais de estiramentos C=C–C.

Nos espectros dos óleos essenciais, o orégano (Figura 13B, OEO) apresenta um amplo pico de estiramento do grupo OH em 3358,3 cm^{-1} (carvacrol), picos estirados do grupo CH— em 2926 cm^{-1} e 2870,1 cm^{-1} . No capim-limão (Figura 13B, OEC), destacam-se picos em 2922,2 cm^{-1} e 1673,6 cm^{-1} (C–H e C=O, respectivamente), além de picos em 1442,5 cm^{-1} (parte de uma banda de metil CH₃) e 842,4 cm^{-1} (vibração do anel de benzeno C–H).

Em relação às nanopartículas, é possível observar que seus espectros seguem o mesmo perfil apresentado pelos espectros da caseína e pectina, já as bandas características dos óleos essenciais não se encontram evidentes, podendo ser um indicativo que estão encapsuladas (Hua *et al.*, 2021) (Figura 13).

Figura 13. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier. (A) OE de tomilho-branco (OETM); OE de manjerona (OEM); caseína pura; pectina pura; C5P M1; C2P M1. (B) OE de capim-limão (OEC); OE de orégano (OEO); caseína pura; pectina pura; C5P M2; C2P M2.



Já em relação às nanopartículas C5P-M1 (Figura 13A) o único pico é o estiramento do anel aromático do óleo de manjerona em uma menor intensidade (C-C). A formulação C2P-M1 (Figura 13A) apresentou um deslocamento das bandas de pectina nas cadeias ramificadas, que pode ser atribuído a encapsulação dos ativos (a banda C-OH com deslocamento de $1733,2\text{ cm}^{-1}$ para $1625,1\text{ cm}^{-1}$, e a banda C=O com deslocamento de $1010,1\text{ cm}^{-1}$ para $1025,0\text{ cm}^{-1}$).

Em relação às nanopartículas C5P-M2 e C2P-M2 (Figura 13B) foi possível notar somente uma banda do OE de capim-limão presente em uma menor intensidade, sendo a banda de metil (CH_3).

Espectros de infravermelho também foram utilizados em outros trabalhos para caracterizar nanopartículas de pectina com o mesmo resultado. Mebarki *et al* (2021) mostrou que micropartículas de caseína-pectina carregadas com extratos de *Thymus fontanesii* apresentam deslocamentos relacionados à adição do ativo, e/ou componentes isolados como o timol e carvacrol.

5.7 Calorimetria diferencial exploratória

As análises de calorimetria diferencial exploratória foram realizadas para caracterizar e observar a interação entre os compostos ativos e os constituintes das nanopartículas. Os termogramas apresentados utilizam o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Foram realizadas análises dos ativos separadamente e dos componentes das nanopartículas, assim como as nanopartículas carregadas (a uma faixa de 0°C a 400°C/10°C min).

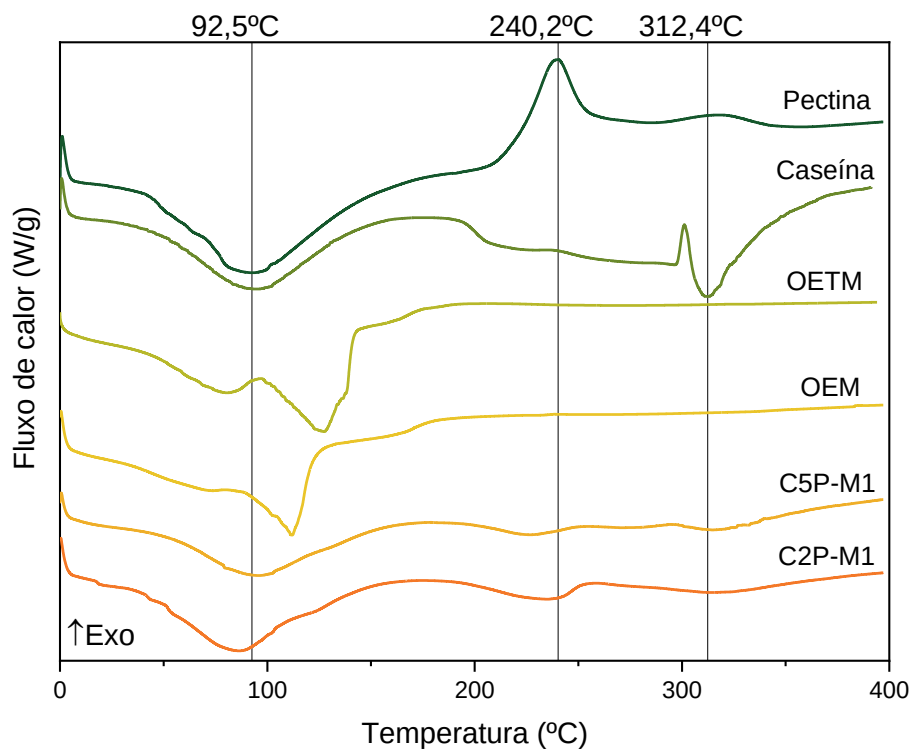
No termograma da pectina (Figura 14) observou-se um pico endotérmico em 92,5°C que se deve a temperatura de transição vítrea, e pode ser atribuída à evaporação de água do polímero (Gholam-Jamshidi *et al.*, 2024). E um pico exotérmico em 240,2°C que é indicado como degradação da pectina por despolimerização térmica (Elmizadeh *et al.*, 2024).

No termograma da caseína (Figura 14) se observa dois picos, um endotérmico em 92,5°C provavelmente causado por sua fusão, e o outro exotérmico a 312,4°C (abaixo do que encontrado na literatura, próximo de 340°C) que se dá devido a liberação do gás em decorrência da decomposição da proteína (Chen *et al.*, 2020).

Enquanto o óleo essencial de tomilho-branco (Figura 14, OETM) tem dois picos endotérmicos, um em 81°C, que pode ser devido a temperatura de transição, e posteriormente outro pico endotérmico entre 128°C (abaixo do encontrado na literatura, acima de 190°C) que indica sua evaporação (Radünz *et al.*, 2020). Para a manjerona (Figura 11, OEM) este pico endotérmico de evaporação ficou em 111°C.

As nanopartículas C5P-M1 e C2P-M1 (Figura 14) apresentaram dois picos endotérmicos, onde o primeiro pode ser associado a transição vítrea da pectina em 92,5°C, e o segundo associado a decomposição da pectina em 240,2°C.

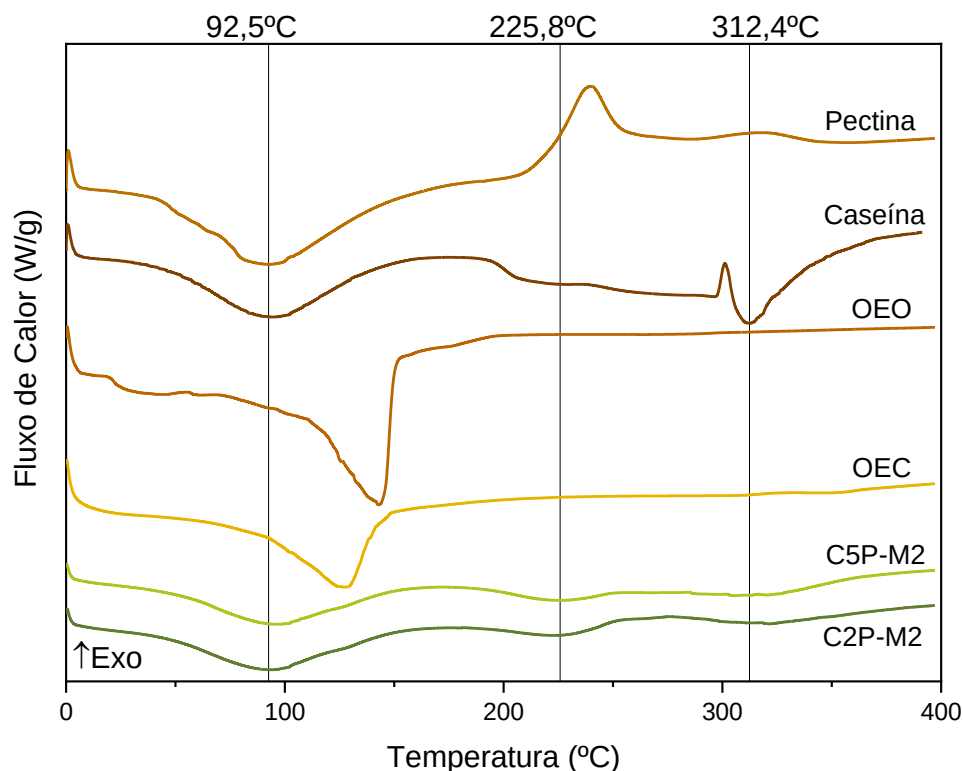
Figura 14. Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: pectina pura, caseína pura, óleo essencial de tomilho-branco (OETM), óleo essencial de manjerona (OEM), C5P-M1, C2P-M1.



Já para o óleo essencial de orégano (Figura 15, OEO) existe um único pico endotérmico em 143°C, que pode indicar a sua evaporação. Já o óleo essencial de capim limão (Figura 15, OEC) apresentou um único pico endotérmico em 126,8°C que indica a sua evaporação (Radünz *et al.*, 2020).

Já as nanopartículas C5P-M2 e C2P-M2 (Figura 15) apresentaram dois picos endotérmicos, o primeiro é associado a transição vítrea da pectina, e o segundo é associado a decomposição da pectina, enquanto as linhas irregulares podem ser associadas a decomposição da amostra.

Figura 15. Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: pectina pura, caseína pura, óleo essencial de orégano (OEO), óleo essencial de capim-limão (OEC), C5P-M2, C2P-M2.



5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

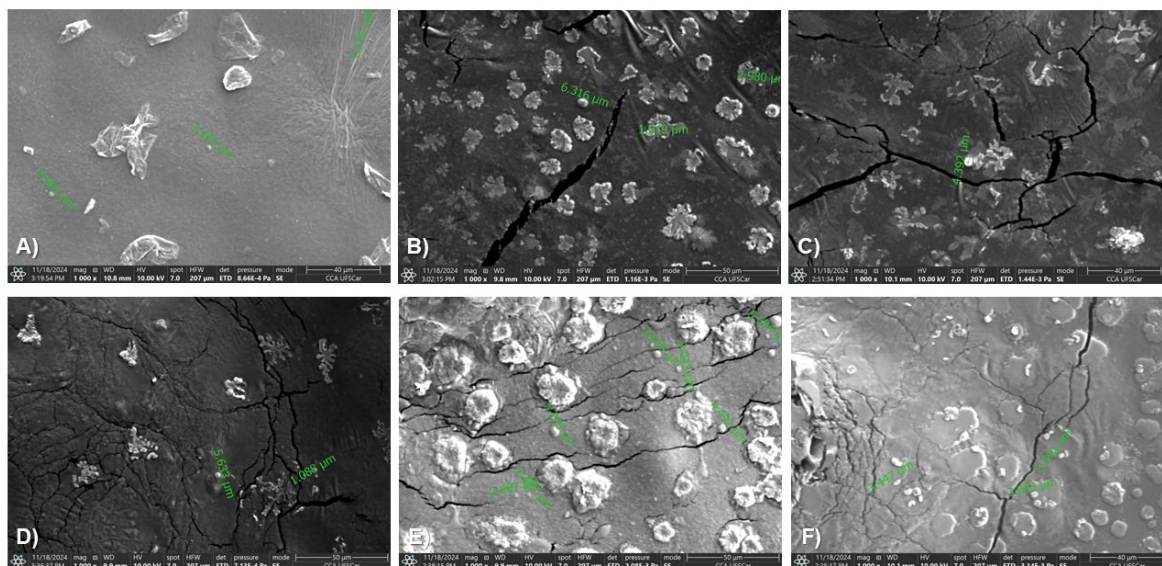
As imagens de MEV das nanopartículas contendo ou não os óleos essenciais (Figura 16) demonstraram que as nanopartículas apresentam formato esférico, com tamanhos variados e distribuição irregular. A maioria das nanopartículas tem diâmetro de 1000 a 3000 nm, o que pode ter sido resultado do procedimento de diálise utilizado para retirar o sódio de sua composição para melhorar a visualização das nanopartículas na microscopia. Essa alteração de tamanho também foi observada após a diálise em leituras de DLS das nanopartículas.

Segundo Fan *et al.* (2021), as diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) podem alterar os complexos de caseína sódica e pectina. Quanto maior o índice de NaCl, mais uniformes ficam os complexos, enquanto em concentrações mais baixas o mesmo não ocorre, tendo formas mais irregulares.

De acordo com Thankappan *et al.* (2020), em estudos com MEV as nanopartículas de pectina tinham formato esférico, irregulares em tamanho, não uniformes e monodispersas. Choudhary; Salar; Thakur (2024), também obtiveram resultados similares com

nanopartículas contendo óleo essencial de menta-verde (*Mentha spicata*), nanopartículas esféricas, irregulares e com tamanhos variados.

Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura. Em ordem as nanoformulações: (A) C2P, (B) C2P-M1, (C) C2P-M2, (D) C5P, (E) C5P-M1, (F) C5P-M2 com as medições em cor verde.

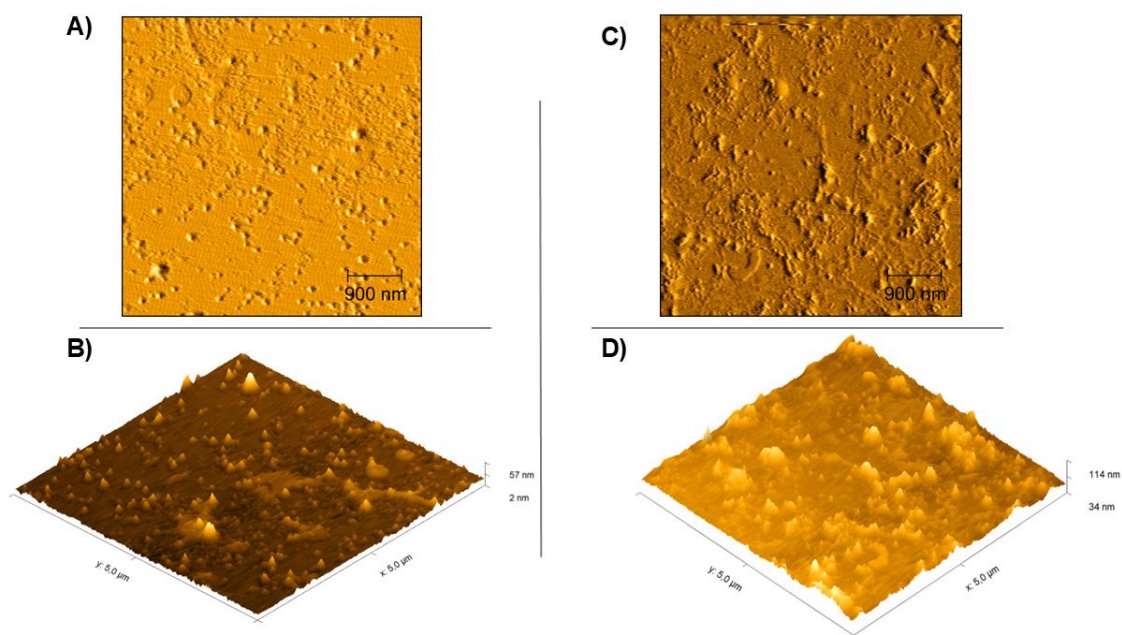


5.9 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises de topográfica das nanopartículas realizadas através da técnica de AFM, demonstrou a morfologia e o tamanho das nanopartículas C5P-M2 e C5P (Figura 17). A nanopartícula C5P-M2 (Figura 17 – A) apresentou como na análise de MEV morfologia esférica e tamanho médio de $101,01 \pm 34$ nm. Enquanto a nanopartícula C2P-M2 (Figura 17 – C) apresentou tamanho médio de $99,47 \pm 28$ nm.

O diâmetro médio analisado pela técnica de AFM foi inferior ao encontrado pela técnica de DLS e NTA, este fato pode ser devido ao número de partículas utilizadas para a análise de distribuição de tamanho ser bem inferior ao utilizado pelas outras técnicas. Foram utilizadas 50 partículas para esta análise. As nanopartículas C5P-M1, C2P-M1, C5P, C2P não foram analisadas devido à alta agregação nas imagens coletadas, dificultando a análise e contagem.

Figura 17. Micrografias das nanopartículas C5P-M2 em (A) e 3D em (B), e a nanopartícula C2P-M2 (C) e 3D em (D).



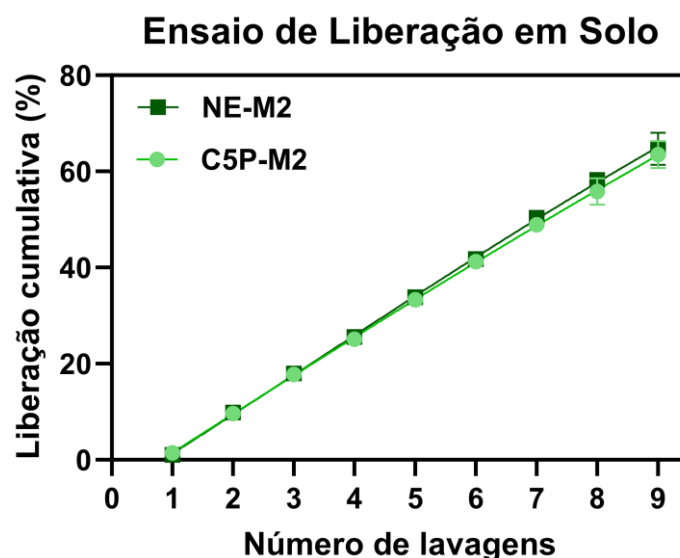
5.10 Ensaio de Liberação em Camada de Solo

Os lixiviados das misturas dos óleos essenciais das nanoformulações C5P-M2 e NE-M2 foram avaliados por Espectroscopia na faixa do UV-VIS (50 Conc, Varian), para garantir que a leitura feita seria apenas dos lixiviados provenientes dos OEs, foi realizado uma lixiviação apenas do solo com água (branco), e para cada lavagem esse branco era utilizado para retirar a diferença na análise do software denominada “zero”. Os resultados demonstraram que o mecanismo de liberação foi similar para ambas as nanoformulações (Figura 18). Até a terceira lavagem, a liberação foi de 17,79% (C5P-M2) e 17,96% (NE-M2). No entanto, a partir da sétima lavagem, a liberação do lixiviado da mistura dos OEs começou a apresentar diferenças entre as nanoformulações, sendo de 48,87% para a C5P-M2 e 50,36% para a NE-M2.

Em estudos realizados por Campos *et al.* (2015), foi comparada a formulação comercial de tebuconazol (fungicida) com o produto encapsulado por nanocápsulas de PCL e por nanopartículas lipídicas sólidas, em uma liberação em camada solo. O perfil de liberação foi semelhante, porém, as nanocápsulas e as nanopartículas lipídicas sólidas reduziram a quantidade de tebuconazol liberada nas lavagens, quando comparadas com a formulação comercial não encapsulada.

Vários fatores podem influenciar o fluxo de liberação de óleo essencial em nanoemulsões, incluindo emissão, absorção, e deterioração da superfície (Choudhary; Salar, e Thakur , 2024). Esses fatores, em conjunto com outros processos, como agregação, dissolução, e deposição podem impactar a forma como as nanopartículas interagem com o solo (Sharma; Kumar, 2024). É possível que a pectina presente em ambas as nanoformulações tenha interagido com o solo de maneira química ou física, resultando em um perfil de liberação semelhante, com uma liberação sustentada, mesmo sem o encapsulamento na nanoemulsão NE-M2.

Figura 18. Liberação cumulativa em camada de solo das nanoformulações NE-M2 (verde-escuro) e C5P-M2 (verde claro). Os testes foram realizados em triplicata. Foi considerado significância de $p < 0,05$.

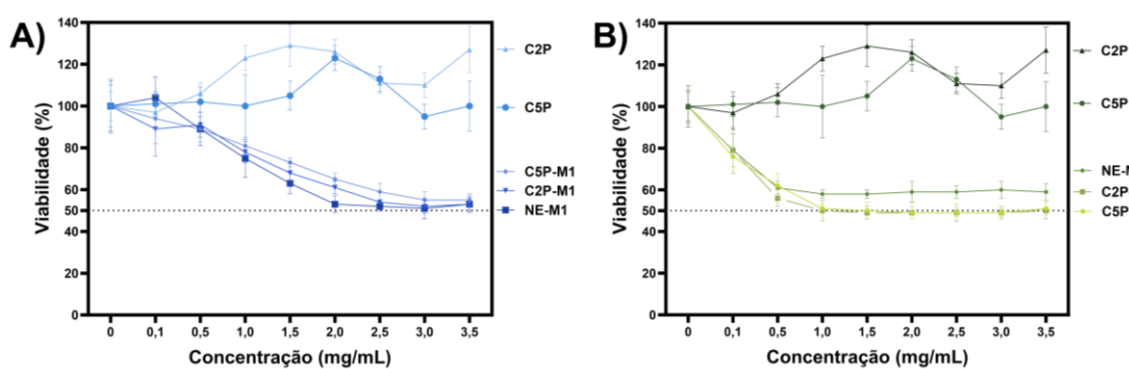


5.11 Bioensaio de Citotoxicidade

O bioensaio de citotoxicidade foi realizado em células de fibroblastos de camundongos Balb-c, 3T3 mantidas em cultura em meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell*) seguindo o protocolo de Grillo *et al.* (2014) com algumas alterações. Para se obter os parâmetros de controle dos óleos essenciais foi utilizada uma nanoemulsão das misturas dos óleos essenciais M1 e M2 com pectina, e as concentrações testadas foram 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mg/mL baseadas na quantidade de ativo das nanopartículas contendo OEs. A análise estatística foi feita utilizando o *software Graphpad Prism 10*, utilizando as análises de variância *one-way ANOVA* com a posterior de Tukey-Kramer.

Foi observado que as formulações controles C5P e C2P não exibiram citotoxicidade aparente, houve uma estimulação celular, nas concentrações mais baixas (2,0 mg/mL e 1,0-2,0 mg/mL, respectivamente) não persistindo nas concentrações maiores (Figura 19). Em estudos feitos por Chen *et al.* (2021), com nanopartículas de caseína contendo tetrahidrocurcumina, as nanopartículas tiveram estímulo celular na concentração de 1 µg/mL que também não persistiu em concentrações maiores.

Figura 19. Citotoxicidade das nanopartículas controle e carregadas, e das nanoemulsões contendo OEs usando células 3T3, em (A) C2P, C5P, C5P-M1, C2P M1 e NE-M1. Em (B) C2P, C5P, C5P-M2, C2P M2 e NE-M2. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (*one-way ANOVA*).



A nanoemulsão NE-M1 (Figura 19 - A) apresentou viabilidade celular de 100% na menor concentração testada (0,1 mg/mL). Foi observado que essa viabilidade teve uma diminuição para 89% a partir do aumento da concentração de ingrediente ativo (0,5 mg/mL), e na maior concentração testada (3,5 mg/mL) a diminuição da viabilidade celular foi para 53%.

As nanopartículas C5P-M1 e C2P-M1 tiveram um comportamento similar com a nanoemulsão. A nanopartícula C5P-M1 na menor concentração (0,1 mg/mL) apresentou viabilidade celular de 94%, foi observado que a viabilidade celular diminuiu a partir da concentração de (0,5 mg/mL) para 89%, e na maior concentração de ingrediente ativo testada (3,5 mg/mL) a viabilidade celular foi para 55%. A nanopartícula C2P-M1 na menor concentração de ingrediente ativo testada apresentou viabilidade celular de 89%, e começou a diminuir a partir da concentração 1,0 mg/mL, indo para 78%, e na maior concentração testada de ingrediente ativo a viabilidade celular ficou em 53%.

A nanoemulsão NE-M2 (Figura 19 - B) apresentou viabilidade celular de 79% na menor concentração testada (0,1 mg/mL). Foi observado que essa viabilidade teve uma diminuição para 65% a partir do aumento da concentração de ingrediente ativo (0,5 mg/mL), e na maior concentração testada (3,5 mg/mL) a diminuição da viabilidade celular foi para 59%. Demonstrando uma toxicidade maior que a NE-M1 que apresentava uma alta viabilidade celular na menor concentração de ativo testada.

As nanopartículas C5P-M2 e C2P-M2 tiveram um comportamento similar com a nanoemulsão NE-M2. A nanopartícula C5P-M2 na menor concentração testada apresentou viabilidade celular de 76%, foi observado que a viabilidade celular diminuiu a partir da concentração de (0,5 mg/mL) para 62%, na maior concentração de ingrediente ativo testada a viabilidade celular foi de 51%. A nanopartícula C2P-M2 na menor concentração (0,1 mg/mL) apresentou viabilidade celular de 79%, foi observado que a viabilidade celular diminuiu a partir da concentração de (0,5 mg/mL) para 56%, e na maior concentração de ingrediente ativo testada (3,5 mg/mL) a viabilidade celular foi para 50%, demonstrando uma citotoxicidade maior que a C5P-M2.

Em estudos feitos por Salsabila *et al.* (2023), óleo essencial de capim-limão obteve um comportamento parecido com o deste estudo, sendo mais tóxico para as células de balb-c 3T3 e obtendo uma IC50% em uma concentração de 80µg/mL. Não houve diferença significativa entre os ativos emulsionados e nanoencapsulados.

5.12 Ensaio de Fitotoxicidade em soja

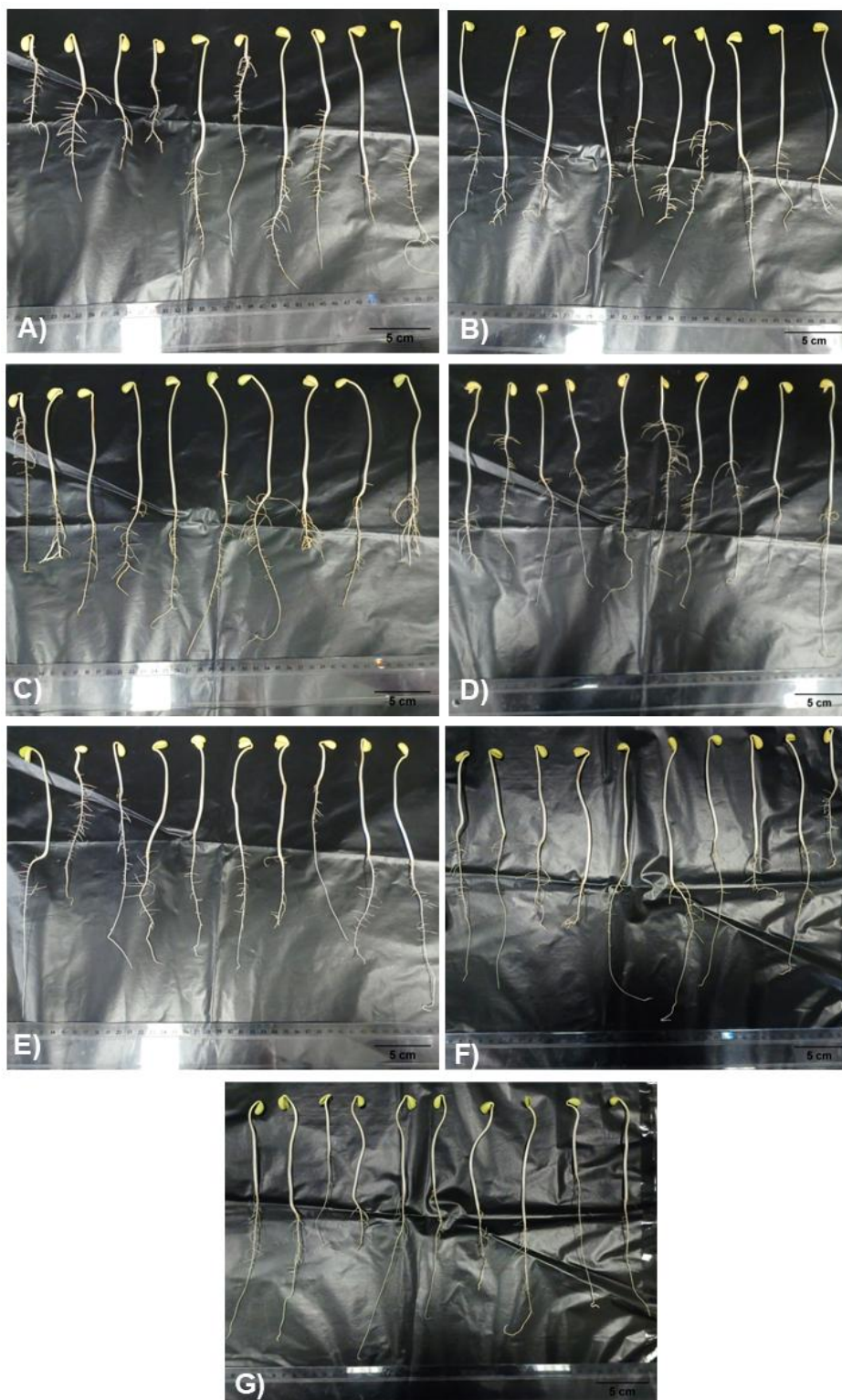
Para o ensaio de fitotoxicidade foi realizada a contagem da porcentagem de germinação inicial com cinco dias e com oito dias após tratamento, foram analisadas a porcentagem de germinação final, e os parâmetros morfológicos de comprimento da raiz, massa fresca da parte aérea, e massa fresca da raiz (Brasil, 2009). As imagens das plântulas após os oito dias podem ser vistas na Figura 20.

Os experimentos foram realizados em duas concentrações diferentes (10mg/mL [pura] e 5mg/mL) para as nanoformulações (C5P, C5P-M2 e NE-M2) e para a testemunha foi utilizado água deionizada. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (*ordinary one-way ANOVA* com teste de Bartlett). Diferenças significativas foram realizadas com $p < 0,05$ (Campos; Proença; Oliveira *et al.*, 2018).

Os resultados demonstraram que os tratamentos com as nanoformulações (C5P, C5P-M2 e NE-M2) não demonstraram efeitos fitotóxicos nas sementes de soja, demonstrando

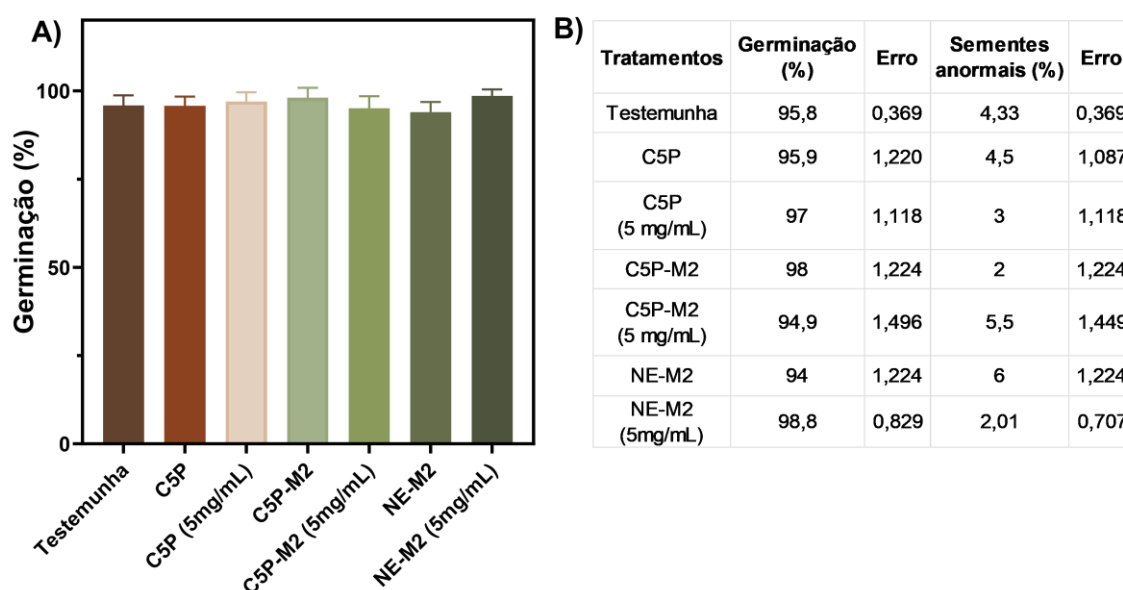
porcentagem de germinação similar ou maior a da testemunha como demonstra na Figura 21 – B.

Figura 20. Imagens das plântulas de soja após os oito dias de tratamento e crescimento na estufa a 25°C. Em (A) Testemunha, (B) C5P (10 mg/mL), (C) C5P (5mg/mL), (D) C5P-M2 (10 mg/mL), (E) C5P-M2 (5 mg/mL), (F) NE-M2 (10 mg/mL), (G) NE-M2 (5mg/mL).



Óleos essenciais têm diferentes efeitos na germinação de sementes e em seu desenvolvimento, dependendo dos seus constituintes e concentrações (Visakh *et al.*, 2022). Segundo estudos de Synowiec *et al.* (2019), a emulsão de óleo essencial de cominho (*Carum carvi*) com o adjuvante Atpolan Bio 80 EC, obteve efeito herbicida sob a espécie de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), sem promover efeitos no desenvolvimento ou germinação do milho. Demonstrando seletividade para a espécie invasora sem afetar a cultura principal.

Figura 21. Em (A) gráficos de fitotoxicidade, em (B) tabela com dados de porcentagem de germinação e de sementes anormais. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (one-way ANOVA).

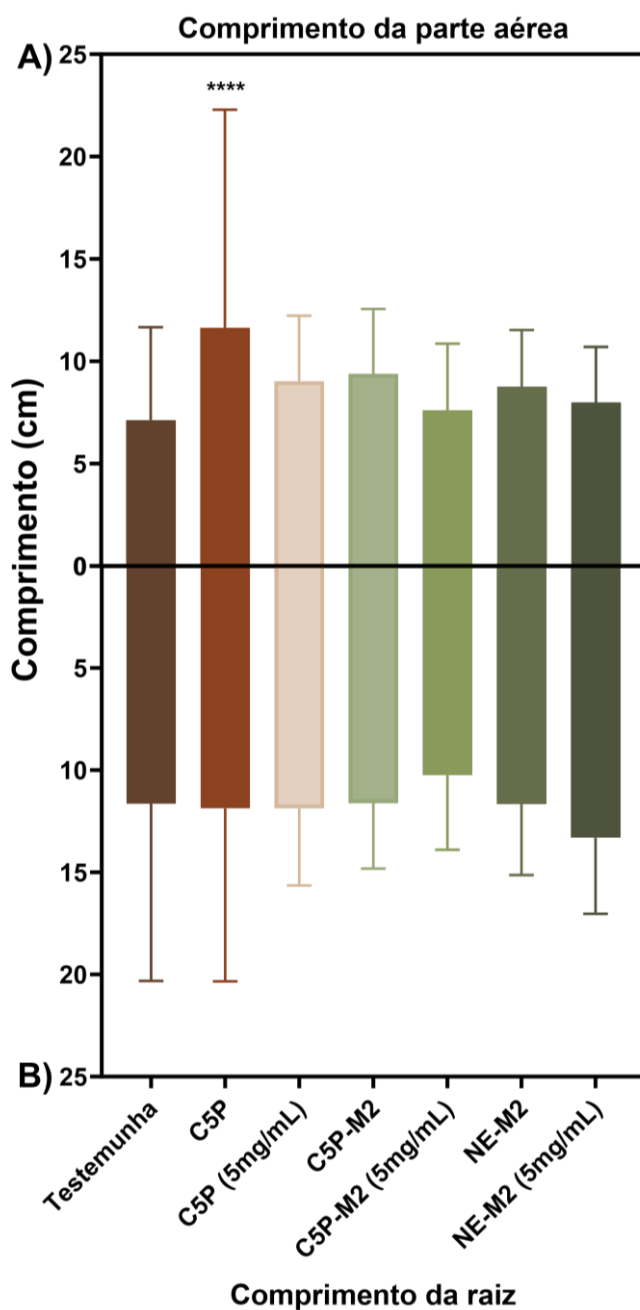


Para os parâmetros morfológicos foi analisado o comprimento da parte aérea e da raiz, que foram medidos através do *software* ImageJ. A nanoformulação controle C5P (10mg/mL) demonstrou um aumento significativo no comprimento da parte aérea, obtendo uma média de $11,63 \pm 10,66$ cm de comprimento, quando comparado com a testemunha a qual a média de comprimento foi de $7,13 \pm 4,53$ cm (Figura 22 - A). Em relação ao comprimento da raiz não houve diferenças significativas quando comparadas com a testemunha (Figura 22 - B).

De acordo com Lu *et al* (2019), as cadeias de açúcares da pectina têm um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas. A homogalacturana tem funções de expansão e adesão celular, também controlando trocas gasosas através dos estômatos. Enquanto a ramnose I tem funções como a promoção da expansão celular e a inibição do crescimento em espiral, a ramnose II tem a função no auxílio da força da parede celular e na

expansão celular. O que pode indicar o aumento significativo no comprimento da parte aérea do tratamento da nanopartícula C5P.

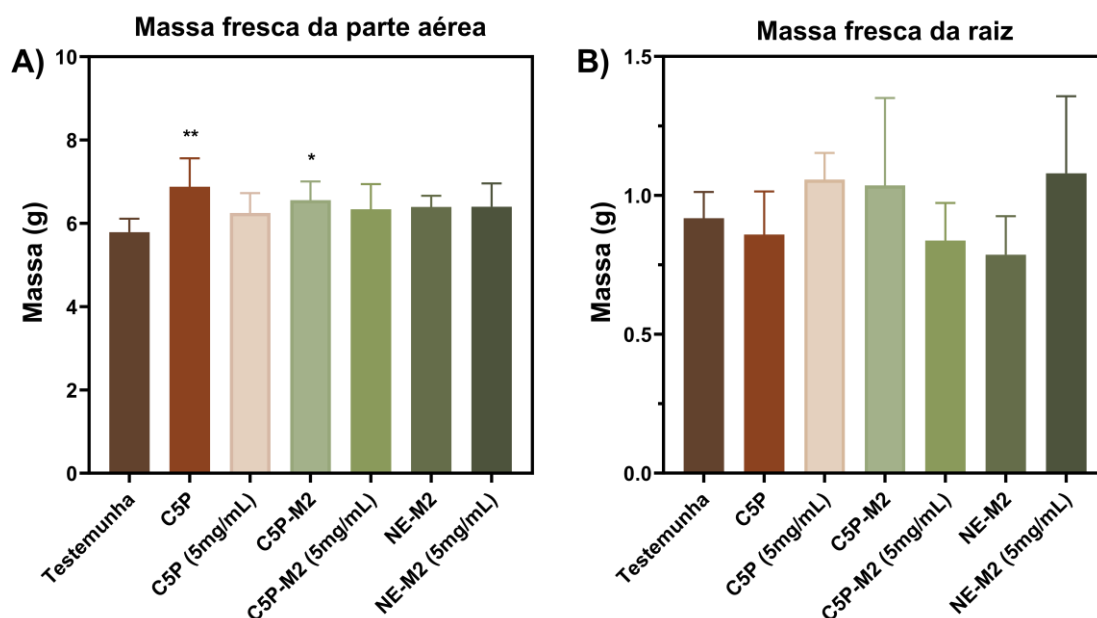
Figura 22. Em (A) gráficos de comprimento da parte aérea, em (B) gráficos de comprimento da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (*one-way ANOVA*). * indica significância.



Os parâmetros de massa fresca da parte aérea e da raiz também foram analisados. Quando comparados com a testemunha, a massa fresca da parte aérea das plântulas tratadas com as nanoformulações C5P (10 mg/mL) e C5P-M2 (10mg/mL) demonstraram aumentos significativos, obtendo média de $6,87 \pm 0,68g$ e $6,55 \pm 0,47g$, respectivamente, como pode

ser observado na Figura 23 – A. Em relação a massa fresca da raiz, não houve diferenças significativas quando comparados os tratamentos com a testemunha.

Figura 23. Em (A) gráficos de massa fresca da parte aérea, em (B) gráficos de massa fresca da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA). * indica significância.



Em estudos Li *et al.* (2022) demonstrou que as nanoesferas de pectina aumentaram a germinação, comprimento e quantidade de raízes adventícias de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). O estudo mostrou também que a massa fresca aumentou em 27,6% quando comparado ao controle. Demonstrando que a pectina pode promover um melhor crescimento e desenvolvimento das plântulas.

5.12.1 Ensaio de fitotoxicidade pós-emergente

Para a avaliação das notas segundo a escala de Barbaś *et al.* (2024), as plantas foram avaliadas individualmente dentro de seus grupos, e não foram encontrados danos ou sintomas causados pelas nanoformulações C5P, C5P-M2 e NE-M2 como demonstra a Figura 24. Portanto, seguindo a escala, todas obtiveram nota 1 como para esta avaliação.

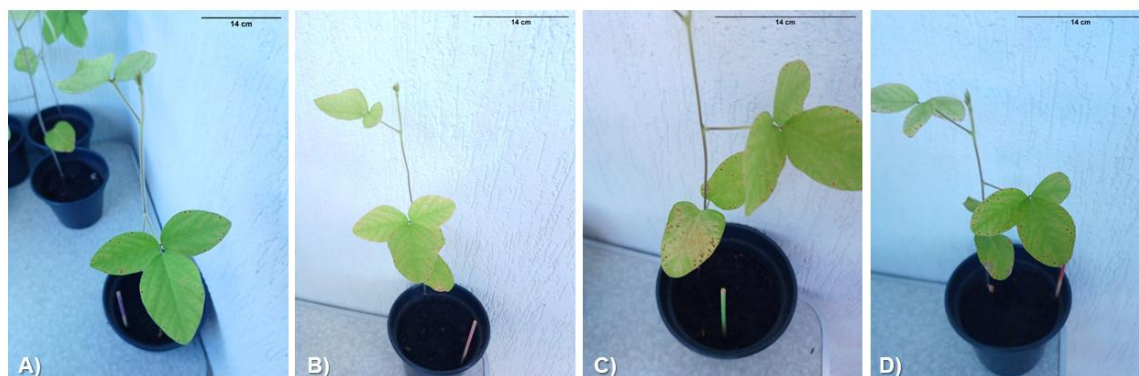
Em estudos Chen *et al.* (2024), também demonstrou que suas nanoemulsões com óleo essencial de absinto (*Artemisia argyi*) com propriedades herbicidas, não tinham efeitos fitotóxicos em espécies não alvo como algodão, soja, arroz, absinto e crisântemo na concentração de 5 mg/g.

Figura 24. Imagens dos tratamentos após o término do período de avaliação: (A) testemunha, (B) C5P, (C) C5P-M2, (D) NE-M2.



Entretanto, todos os tratamentos (testemunha, C5P, C5P-M2 e NE-M2) apresentaram sintomas de mancha-parda (*Septoria glycines*). A mancha-parda é uma patologia fúngica que é observada inicialmente nas folhas primárias, causando pontuações pardas inferiores a 1 mm de diâmetro, que evoluem para manchas com halos amarelados e centros de contornos angulares de cor parda na face superior da folha, seu esporos são espalhados pelo ar e por gotículas de chuva (Almeida *et al.*, 2019). Esses sintomas foliares podem ser observados na Figura 25 abaixo.

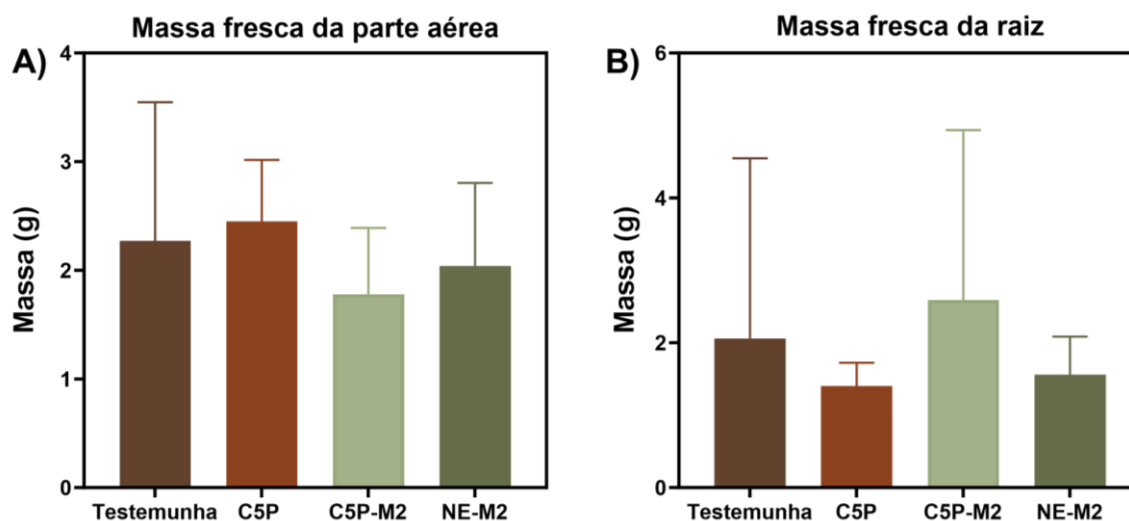
Figura 25. Imagem dos tratamentos: (A) testemunha, (B) C5P, (C) C5P-M2, (D) NE-M2 com sintomas de mancha-parda nas folhas.



Os parâmetros morfológicos de massa fresca da parte aérea e da raiz foram avaliados. Não houve diferenças significativas na massa fresca da parte aérea nem na massa fresca da raiz em comparação com a testemunha, conforme ilustrado na Figura 26.

Em estudos realizados por Adamu *et al.* (2021), com nanoemulsões contendo óleo essencial de gengibre para o tratamento de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), demonstrou não ter efeitos fitotóxicos no arroz (*Oryza sativa* L.) durante os tratamentos. Além de suprimir a bactérias no arroz, os tratamentos com a nanoemulsão ainda aumentaram significativamente as taxas de fotossíntese, e dos parâmetros morfológicos como comprimento, massa seca, massa seca dos grãos em comparação com o controle sem o tratamento.

Figura 26. Em (A) gráficos de massa fresca da parte aérea, em (B) gráficos de massa fresca da raiz. Foi considerado significância de $p < 0,05$. (one-way ANOVA). * indica significância



5.13 Ensaio de Atividade biológica com *C. elegans*

5.13.1 Ensaio de sobrevivência e determinação da concentração letal 50% (CL_{50})

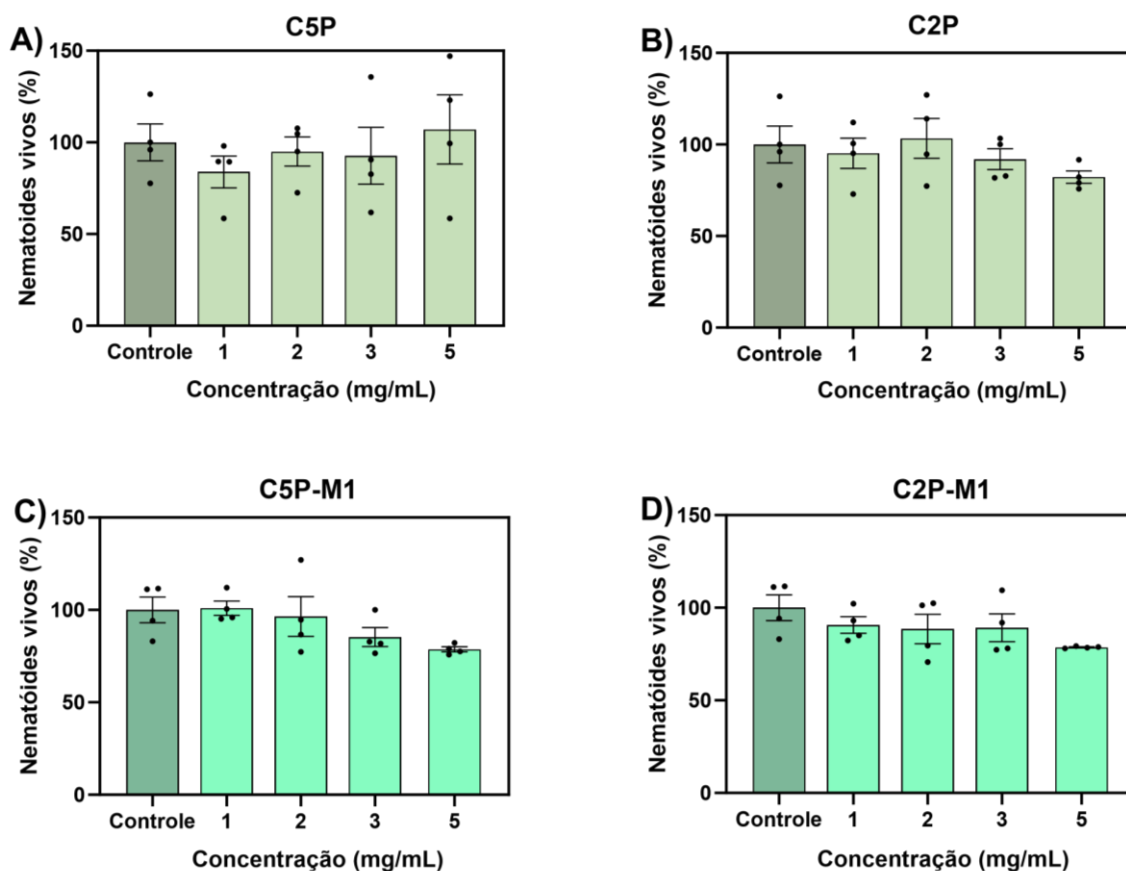
Para determinar a letalidade das nanopartículas controle e contendo os OEs, os nematoides sobreviventes foram analisados. Foram expostos 1500 vermes (juvenis, J1) de cepas N2 (selvagem) seguindo o protocolo de (Jacques *et al.*, 2017). Para obter os parâmetros de controle das nanopartículas (com ou sem OE) foi utilizado a solução tampão M9 (0,02M KH_2PO_4 ; 0,04M Na_2HPO_4 e 0,085M NaCl), as diluições para análise foram feitas baseadas na quantidade de ativo das nanopartículas contendo OEs, deste modo: 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL e 5 mg/mL. A análise estatística foi feita no *software Graphpad Prism 10* utilizando o teste *One-way ANOVA* e o teste de normalidade D'Agostino e Pearson.

Foi observado que as formulações controles C5P e C2P não exibiram letalidade aparente em nenhuma das concentrações quando comparados com o controle (solução tampão M9) (Figura 27 – A e B, respectivamente). As nanopartículas C5P-M1 e C2P-M1 (Figura 27 – C e D, respectivamente) também não apresentaram toxicidade quando comparadas com o controle, tendo resultados similares aos controles C5P e C2P.

Resultados semelhantes foram observados por Zhao *et al.* (2020), os quais sintetizaram nanopartículas de pectina-quitosana contendo antocianinas, que não demonstraram toxicidade para *C. elegans*, provavelmente devido às matrizes naturais da nanopartícula, que possuem propriedades atóxicas, assim como as antocianinas.

Entretanto, Bissinger *et al.* (2014) em estudos, demonstrou que o timol (não encapsulado), monoterprenoide componente do óleo essencial de tomilho-branco, possui atividade nematicida contra *C. elegans* de estirpes selvagens (N2), e estirpes resistentes a droga anti-helmínticas ($LC_{50} = 150$ ppm). No entanto, o mesmo efeito não foi observado neste estudo nas concentrações analisadas, até 5 mg/mL.

Figura 27. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P e C2P), e carregadas (C5P-M1 e C2P-M1) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C2P, (C) C5P-M1, (D) C2P-M1. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



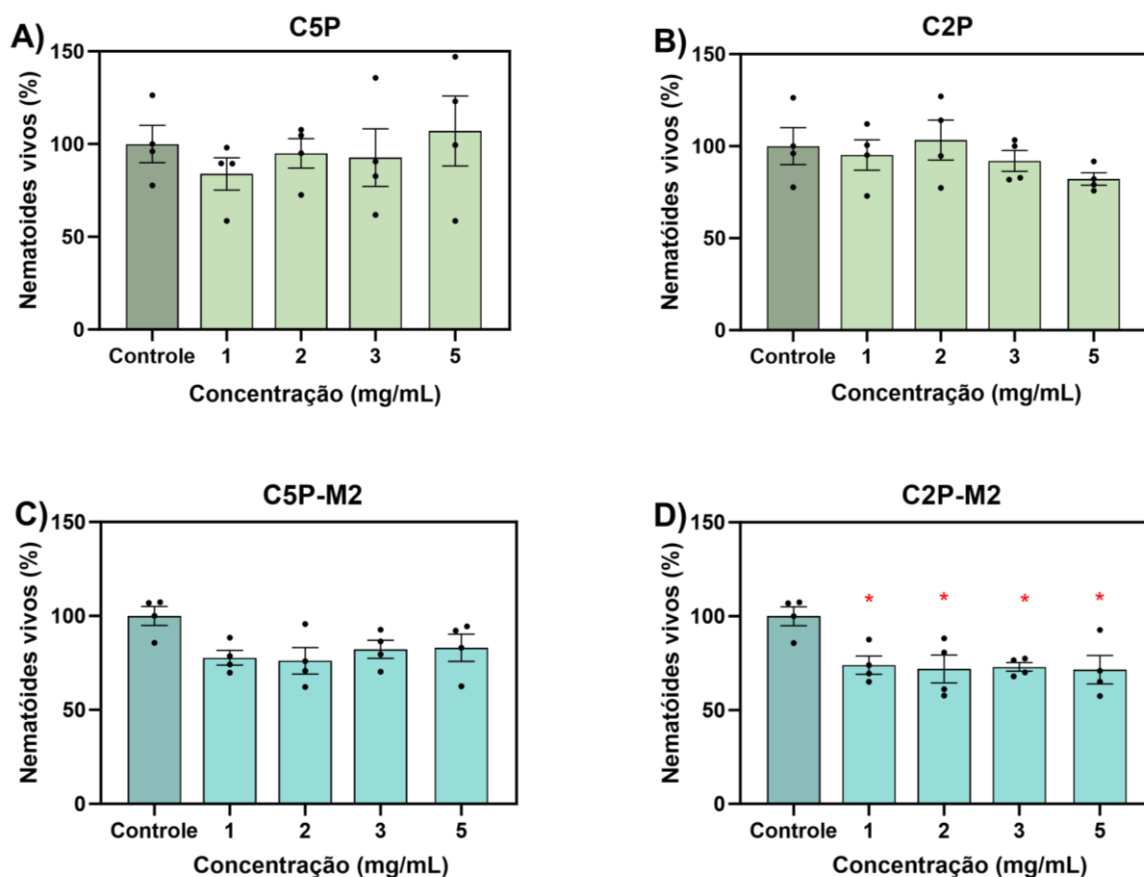
As nanopartículas C5P-M2 e C2P-M2 (Figura 28 – C e D, respectivamente) apresentaram resultados melhores que a outra mistura de OEs, porém, a C5P-M2 ainda não apresentou a toxicidade esperada, enquanto a C2P-M2 apresentou resultados mais promissores, com uma diferença significativa. Como o único fator que as diferencia é a concentração de caseína utilizada, novas análises foram feitas com a C5P-M2 e com a nanoemulsão NE-M2 utilizada nos testes de citotoxicidade.

A toxicidade do óleo essencial de capim-limão já foi relatada em estudos de Rocha *et al.*, (2020) contra ovos e juvenis em estágio J3 de nematoides gastrointestinais de ovelhas (*Haemonchus contortus*), onde foi testado o OE puro e frações, e ambos tiveram efeito tóxico para larvas sendo o maior de 100% e o menor de 73%, ainda foi relatado que nenhum dos ovos eclodiu após o tratamento.

Em estudos feitos por Gonçalves *et al* (2022), para controle do nematoide-da-madeira-do-pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*), foram utilizados diversos óleos

essenciais incluindo o de capim-limão. A análise de porcentagem de mortalidade a 1 $\mu\text{L/mL}$ foi de 100%, com as outras combinações de óleos essenciais a mortalidade permaneceu 100%, demonstrando o seu potencial nematicida mesmo quando combinado com outros OEs.

Figura 28. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P e C2P), e contendo os OEs (C5P-M2 e C2P-M2) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C2P, (C) C5P-M2, (D) C2P-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



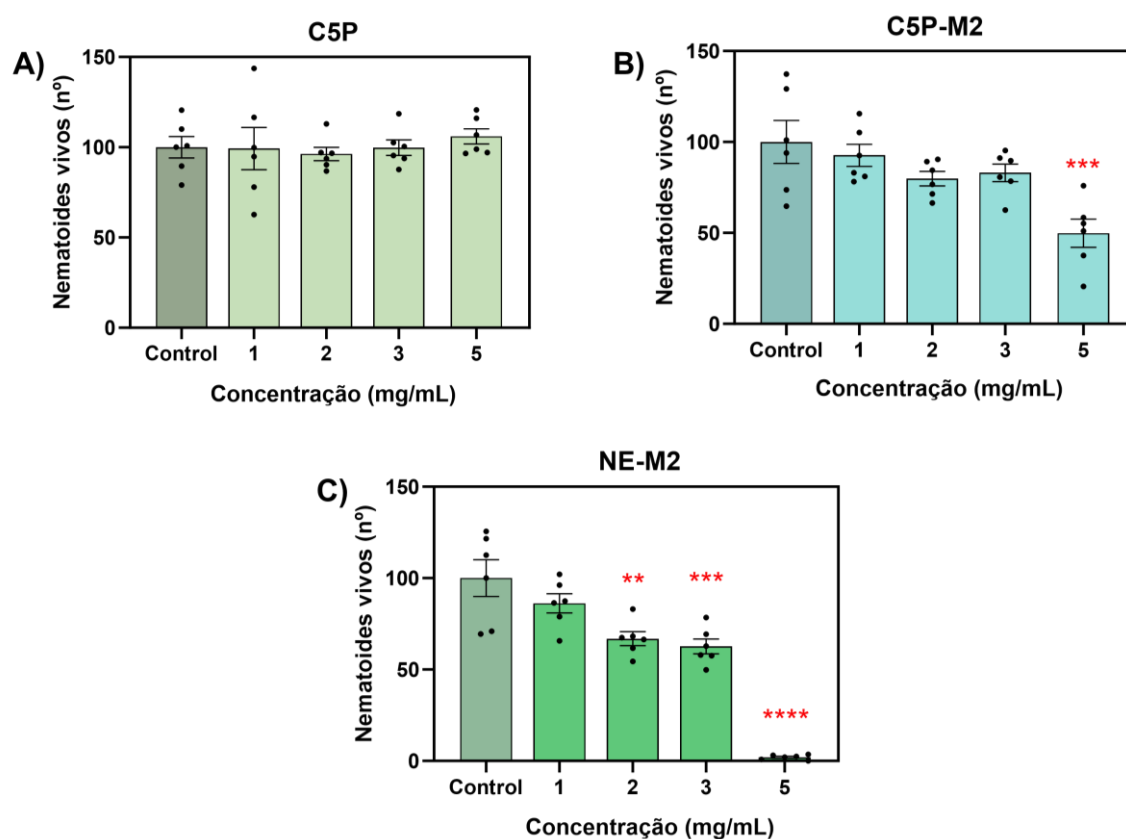
Novos testes foram conduzidos com a nanopartícula controle C5P, a nanopartícula carregada C5P-M2, que obteve melhor performance nos testes de estabilidade e a nanoemulsão NE-M2 para a análise como controle dos óleos essenciais, como feito anteriormente nos ensaios de citotoxicidade.

Como nos testes anteriores, a nanopartícula controle C5P (Figura 29 - A) não demonstrou toxicidade para o *C. elegans*. Entretanto, nos testes mais recentes, na concentração de 5 g/mL a nanopartícula C5P-M2 (Figura 29 - B) demonstrou maior

toxicidade quando comparada com os testes anteriores, a quantidade de nematoides vivos foi de $49,7 \pm 18,9\%$, deste modo houve uma redução de 50,7% da população.

Um dos fatores que podem ter influenciado estes resultados, pode ter sido o tempo de análise, os testes mais recentes foram feitos com a nanopartícula tendo uma semana de preparo e armazenamento, enquanto os testes anteriores foram feitos após 45 dias de armazenamento, o que pode ter influenciado na efetividade da nanopartícula, já que agora é sabido que após 45 dias existe diferenças significativas na estabilidade da nanopartícula.

Figura 29. Gráficos de toxicidade das nanopartículas controle (C5P) e carregada (C5P-M2) com estirpe N2 de *C. elegans*. Em (A) C5P; (B) C5P-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



Quando comparado o efeito das nanopartículas com o da nanoemulsão foi possível observar que a nanoemulsão NE-M2 (Figura 29 - C) foi muito mais tóxica já com a concentração de 2 mg/mL onde a população de indivíduos vivos era de $66,8 \pm 9,42\%$; e esse número continuou a reduzir até na concentração de 5 mg/mL onde a população reduziu para $1,9 \pm 1,3\%$ indivíduos vivos, reduzindo dessa forma em 98,1% a população.

Em estudos Hammad e El-Sagheer, (2023), também observaram diminuição de população da espécie de *Meloidogyne incognita* (nematóide-das-galhas) quando utilizado nanoemulsões a 5% de óleo essencial de menta-verde (*Mentha spicata* L.) e de manjerição-de-folha-larga (*Ocimum basilicum* L.), as reduções na população foram de 78,5% e 80,7%, respectivamente.

Este efeito deve-se provavelmente ao fato da liberação da nanoemulsão ser mais rápida do que a nanopartícula, além do seu sistema não encapsular o óleo essencial, e sim manter as gotículas em suspensão, tornando de mais fácil liberação e contato com o alvo.

Após os novos testes foi calculada a concentração letal 50% (CL50), sendo a nanopartícula C5P-M2 CL50 = 7 mg/mL, enquanto a da nanoemulsão NE-M2 CL50 = 4 mg/mL.

5.13.2 Swimming Assay

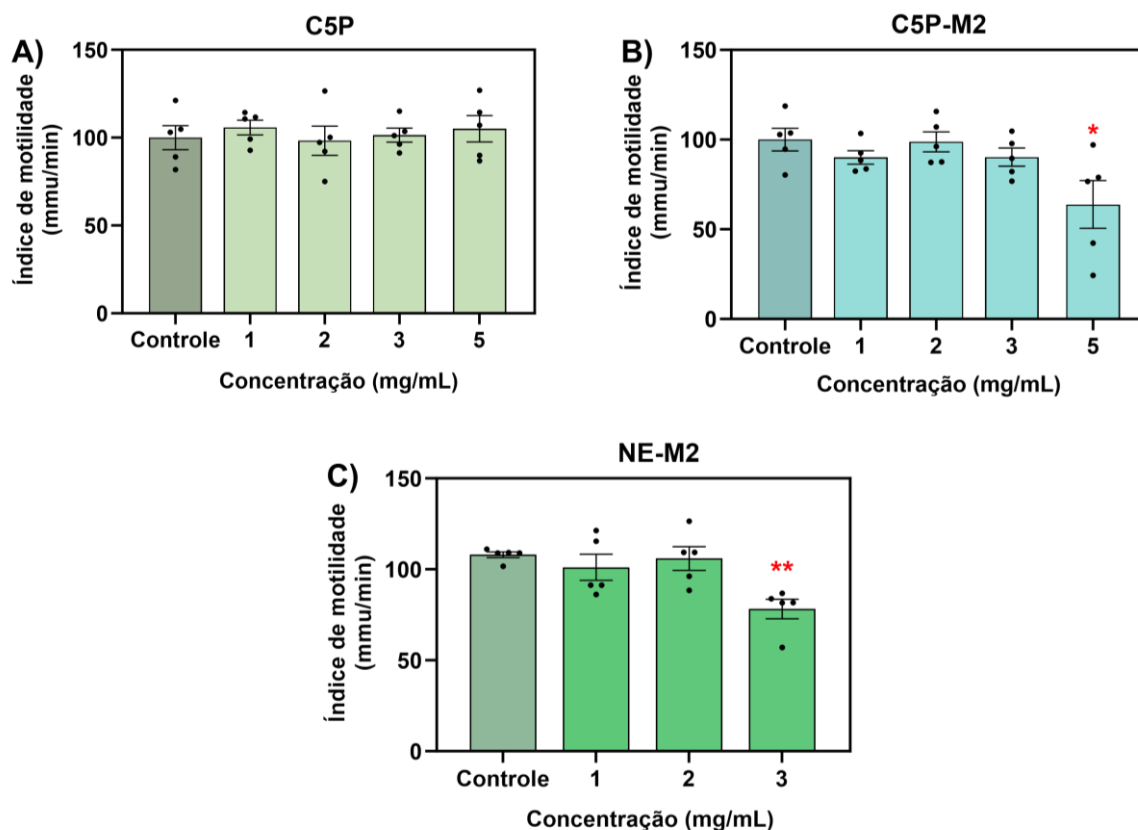
Foi determinado os efeitos na motilidade dos nematoides sobreviventes, as nanopartículas contendo ou não os OEs. A nanopartícula C5P (Figura 30 – A) não apresentou redução na motilidade em nenhuma das concentrações testadas. Enquanto a nanopartícula C5P-M2 (Figura 30 - B), apresentou uma redução significativa de $63,83 \pm 29,6\%$ da motilidade dos nematoides na concentração de 5 mg/mL. A nanoemulsão NE-M2 também apresentou redução significativa na motilidade dos nematoides, sendo de $78,63 \pm 11,9\%$ na concentração de 3 mg/mL. A maior concentração não pode ser testada devido sua toxicidade, a quantidade de nematoides sobreviventes foi insuficiente para o teste ser realizado.

Em estudos Hernando; Turani e Bouzat (2019), também observaram os efeitos de perda de motilidade em *C.elegans* quando tratados com terpenoides presentes nos óleos essenciais, sendo eles carvacrol, timol e eugenol. A redução de motilidade, atingindo a paralisia foi concentração dependente, sendo o carvacrol o mais tóxico dentre os componentes ($EC_{50} = 0,80 \pm 0,13$ mM, por uma hora de tratamento).

As entradas excitatórias e inibitórias recebidas pelos neurônios motores colinérgicos (acetilcolina - AchR) e gabaérgicos (ácido gama-aminobutírico - GABA), respectivamente, fazem com que os músculos do corpo do *C. elegans* se locomovam de forma coordenada (Davis; Tanis, 2022). Terpenoides com ações nematicidas são relacionados com a inibição da atividade muscular nos receptores de contração e locomoção, podendo interferir em

processos como as contrações da faringe, impedindo a alimentação; e a oviposição (André *et al.*, 2017; Fuentes *et al.*, 2022; Shu; Sun; Zhang, 2016; Trailović *et al.*, 2015).

Figura 30. Gráficos de motilidade das nanoformulações (A) C5P, (B) C5P-M2, (C) NE-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



5.13.3 Ensaio de Estresse Oxidativo

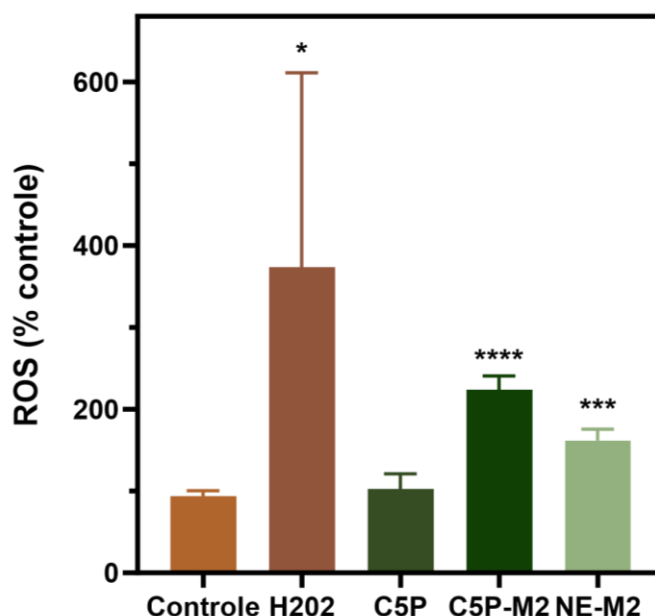
Foi determinado o nível de estresse oxidativo nos nematoides causado pelas nanopartículas contendo ou não os OEs. A nanopartícula C5P (Figura 31) não induziu estresse oxidativo nos nematoides. Enquanto a nanopartícula C5P-M2 apresentou uma porcentagem significativa de aumento no estresse oxidativo, obtendo média de $223,7 \pm 16,7\%$ (na concentração de 5 mg/mL) em relação ao controle que obteve uma média de $93,71 \pm 161,7$. A nanoemulsão NE-M2 também demonstrou uma porcentagem significativa de aumento no estresse oxidativo, obtendo média de $161,7 \pm 13,8\%$ (na concentração de 5 mg/mL), como pode ser visto na Figura 31.

Em estudos, Piao; Sun e Yi (2020) demonstraram que o óleo essencial de cidra (*Citrus medica*) e seus componentes (d-limoneno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno)

diminuíam a vida do *C. elegans*, resultado do aumento do estresse oxidativo nos espécimes em concentrações diferentes (0,5, 1, 1,5, 2 mg/mL).

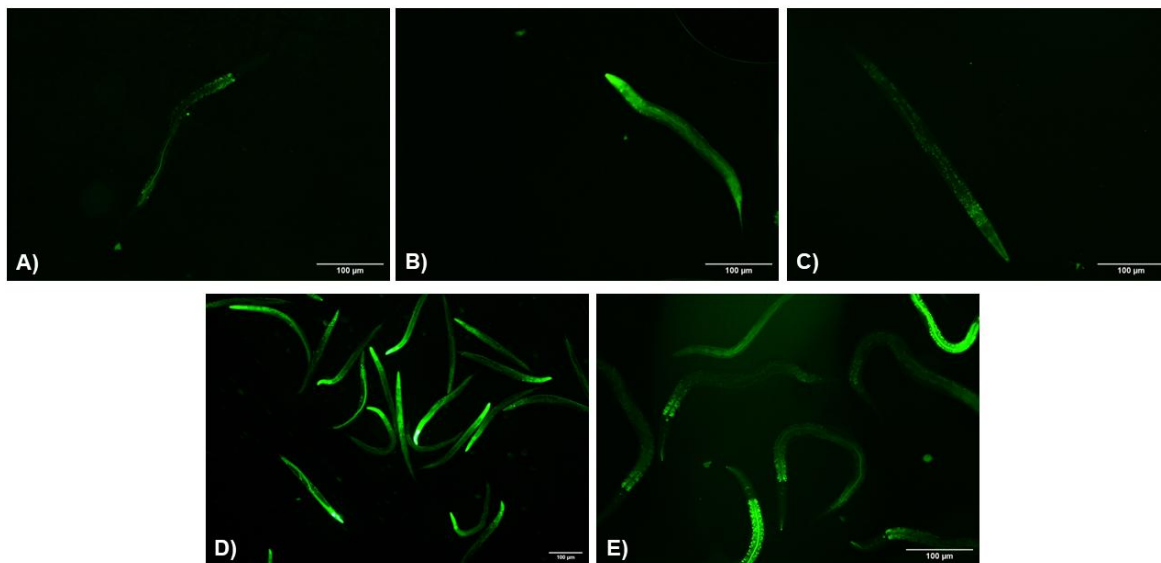
Óleos essenciais contém uma variedade de componentes que podem desencadear diferentes atividades biológicas. Quanto maior as concentrações do extrato, maior pode ser a sua toxicidade, reduzindo os efeitos antioxidantes no *C. elegans* (Piao; Sun; Yi, 2020). A diferenças de atividade biológica dos óleos essenciais dependem dos seus constituintes, que podem variar não somente nas espécies de plantas, mas, devido ao ambiente e fatores de crescimento (Yu *et al.*, 2014).

Figura 31. Gráfico das espécies reativas de oxigênio (ROS) com os tratamentos: controle, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), C5P (5 mg/mL), C5P-M2 (5 mg/mL), NE-M2 (5 mg/mL). O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



Níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem desencadear estresse oxidativo, desregular a atividade de enzimas essenciais para a homeostase celular e causar danos a macromoléculas, como o DNA. Além disso, o estresse oxidativo também influencia a regulação das neurotransmissões mediadas pelo GABA e pela serotonina (Saraiva *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). As imagens na Figura 32 mostram os efeitos das nanoformulações na acumulação de ROS, através da fluorescência.

Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência em *C. elegans* de cada tratamento: (A) controle, (B) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (C) C5P, (D) C5P-M2, (E) NE-M2, quanto maior fluorescência, maior o estresse oxidativo gerado no organismo do nematoide.



5.13.4 Ensaio de Brood size

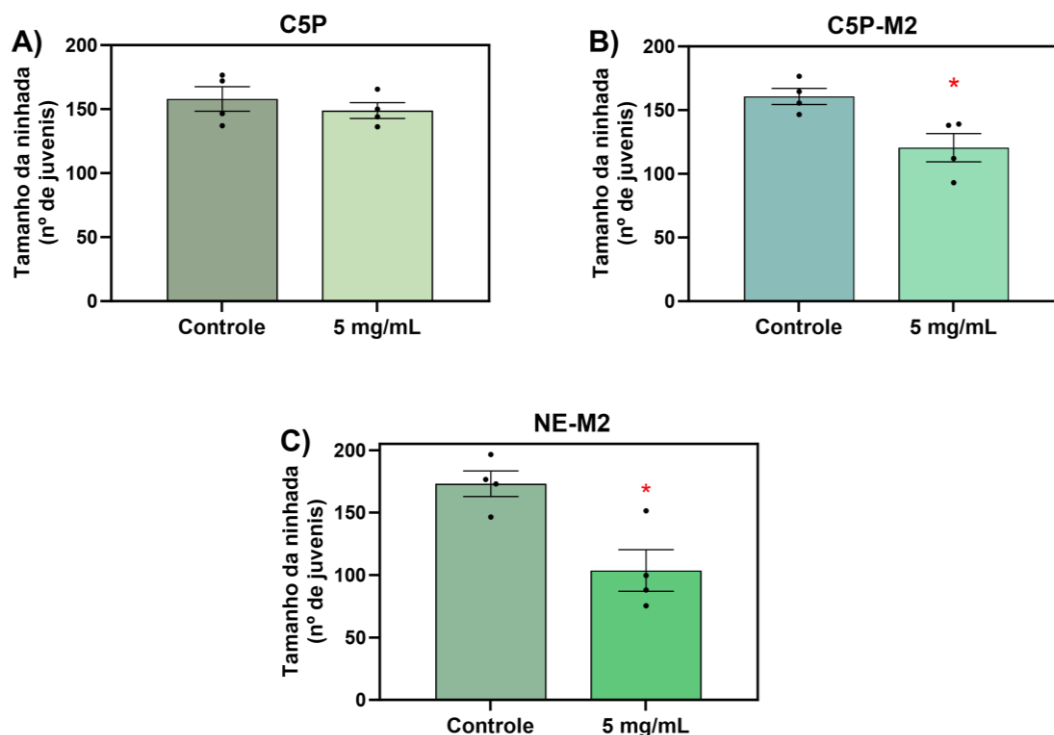
Para determinar a toxicidade no sistema reprodutor dos nematoides, o ensaio de tamanho da ninhada foi realizado com as nanopartículas contendo ou não os OEs.

Os resultados obtidos demonstraram que a nanopartícula C5P não obteve diminuição no tamanho da ninhada quando comparados com o controle. Entretanto, as nanopartículas C5P-M2 e NE-M2 demonstraram diminuição significativa quando comparados com o controle, o tamanho da ninhada foi de $120,5 \pm 22,1$ n° de juvenis e $103,6 \pm 33,3$ n° de juvenis, respectivamente, como mostra a Figura 33.

Em estudos conduzidos por Lanzerstorfer *et al.* (2021), o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) mostrou ter efeitos tóxicos no tamanho da ninhada em diferentes concentrações, sendo observado nenhum descendente após a concentração de 0,1% [v/v] de óleo essencial. Enquanto, os óleos essenciais de citrus e eucalipto apresentaram esse comportamento a partir da concentração de 1% [v/v].

A oviposição resulta da contração dos músculos especializados da vulva e da compressão do útero, o que permite a deposição dos ovos. Como mencionado anteriormente, os possíveis efeitos dos OEs na locomoção do *C. elegans*, os receptores de serotonina e acetilcolina demonstraram modular a atividade muscular da vulva, deste modo, a oviposição pode ser inibida indiretamente devido a efeitos da motilidade derivados da neurotoxicidade dos OEs (Bradford *et al.*, 2020; Collins *et al.*, 2016; Rand, 2007; Schafer, 2016).

Figura 33. Gráficos de *Brood size*, das nanoformulações (A) C5P, (B) C5P-M2, (C) NE-M2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



5.14 Atividade biológica em *Pratylenchus brachyurus*

5.14.1 Ensaio *in vivo*

Para a análise da atividade biológica, as raízes foram coletadas após o período de 80 dias após o tratamento (com as nanoformulações que obtiveram efeito no *C. elegans* previamente, C5P-M2 e NE-M2) e inoculação com os nematoides, estas foram trituradas em um liquidificador por 20 segundos duas vezes, peneiradas (Granutest, Mesh: 500, 200, 60) para poder obter-se uma solução para a contagem da população dos nematoides através da microscopia ótica comum (Nikon, Eclipse E200, Tóquio, Japão) (Figura 4). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando análise de variância (*one-way* ANOVA com teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e pós-teste de Tukey) no *software* Statisticx 10. Diferenças significativas foram realizadas como $p < 0,05$ (Grillo *et al.*, 2014).

O ensaio 1 foi realizado em setembro de 2024, enquanto o ensaio 2 foi realizado em outubro de 2024. Na análise de população final do ensaio 1 não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, no ensaio 2 foi observado uma diminuição

significativa da população nos tratamentos das nanoformulações C5P-M2 e NE-M2 como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Multiplicação populacional de *Pratylenchus brachyurus* nos diferentes tratamentos em soja, nos ensaios 1 e 2. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o pós-teste de Tukey 5%. Os dados foram transformados antes das análises estatísticas usando o logaritmo do valor de (X+1). Pi – População inoculada, PF – população final.

Tratamento	Ensaio 1		Ensaio 2	
	PI	PF	PI	PF
Testemunha	110	5505,8 ^a	112	9834,5 ^a
C5P	110	5487,0 ^a	112	7362,2 ^a
C5P-M2	110	5372,6 ^a	112	4594,9 ^b
NE-M2	110	4342,5 ^a	112	4628,4 ^b

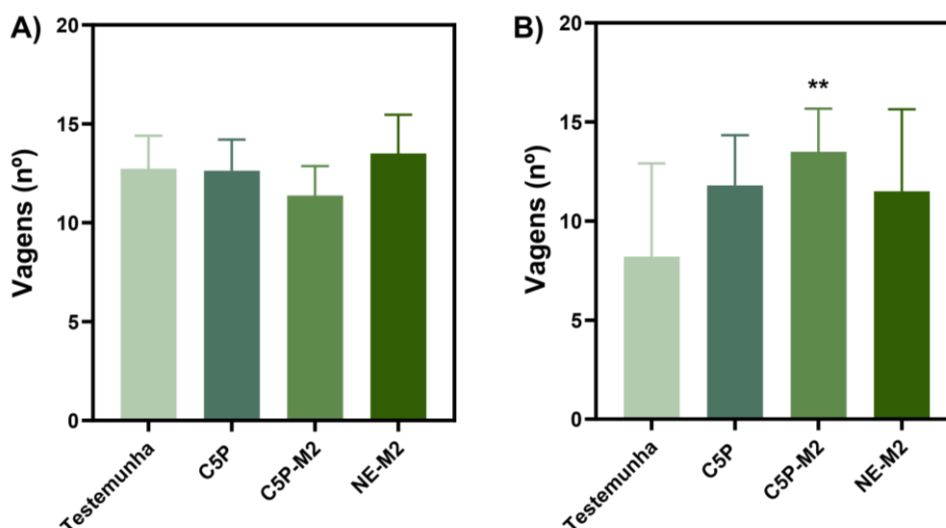
As variações encontradas de população no ensaio 1 e ensaio 2 podem ser influenciadas por fatores como temperatura, solo, e contato com as nanopartículas. A temperatura ideal para o desenvolvimento dos nematoides variam de acordo com gênero e espécie (Khanal; Land, 2023), entretanto a temperatura ideal para o *Pratylenchus brachyurus* é de 25 – 30°C (Kandel *et al.*, 2013). O contato ou a ausência dele com as nanopartículas em solo também pode ser um fator de impacto para a reprodução dos nematoides. Como visto no item 5.13.4 as nanoformulações C5P-M2 e NE-M2 demonstraram impacto no tamanho da ninhada do *C. elegans* por mecanismos neurotóxicos que impactam a mobilidade e oviposição, podendo ter apresentado o mesmo impacto no *P. brachyurus*, devido a diminuição da população no ensaio 2.

Em estudos realizados por Madalosso *et al.* (2017), para analisar a atividade nematicida *in vivo* das nanopartículas contendo óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) no nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* sp.), os resultados demonstraram diminuição da população do nematoide, e da massa de ovos nas concentrações de 10 mg/mL e 15 mg/mL, sendo equivalentes a diminuição do controle testado de Abamectin (produto comercial). Todas as concentrações testadas (5 mg/mL, 10 mg/mL e 15 mg/mL) também demonstraram redução total no número de galhas após 72h de tratamento.

Além da população, foi avaliada a produção de vagens e de grãos, pois os nematoides podem reduzir a quantidade de grãos produzidos, afetando o rendimento da cultura

(Agrivalle, 2024). Na contagem da produção da soja através da quantidade de vagens, não foram observadas alterações significativas na quantidade de vagens no primeiro ensaio (Figura 34 – A). Porém, no segundo ensaio houve um aumento significativo na quantidade de vagens do tratamento com a nanoformulação C5P-M2 (Figura 34 – B).

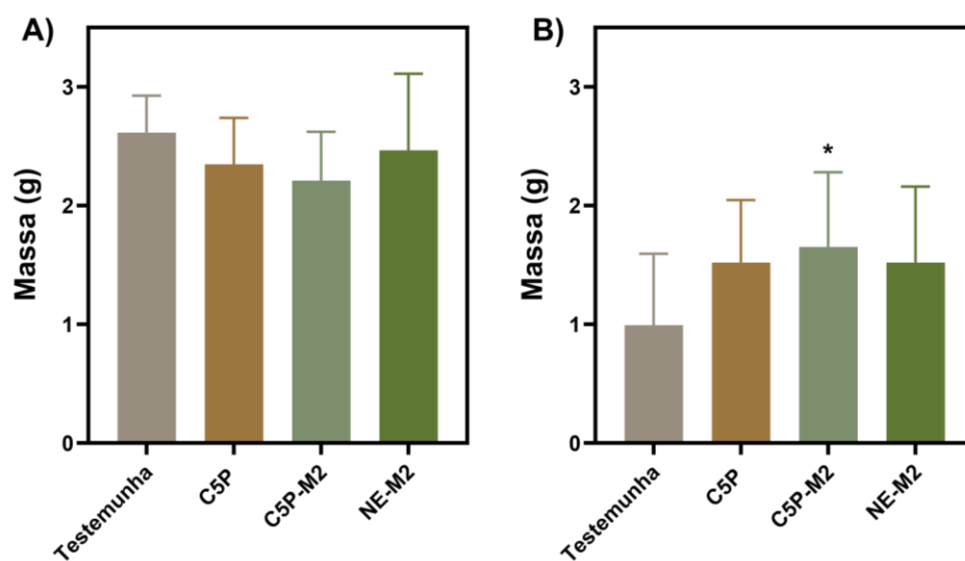
Figura 34. Gráficos de produção de vagens, em (A) Ensaio 1 em (B) Ensaio 2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



A produção de grãos demonstrou que no ensaio 1 não houve diferenças significativas quanto a massa dos grãos nos diferentes tratamentos, entretanto, no ensaio 2 houve um aumento significativo na massa dos grãos da nanoformulação C5P-M2 como pode ser observado na Figura 35 - B.

O aumento na produção de grãos e de vagens pode estar interligado há alguns fatores como a diminuição significativa dos nematoides no tratamento da nanoformulação C5P-M2, suprimindo efeitos negativos na produção (Sarri *et al.*, 2024), e o efeito já observado no item 5.11 onde houve um desenvolvimento significativo na parte aérea da soja, que pode ter sido ocasionado pela matriz natural de pectina da nanoformulação (Li *et al.*, 2022).

Figura 35. Gráfico de produção de grãos, em (A) Ensaio 1 em (B) Ensaio 2. O símbolo * indica significância. Foi considerado significância de $p < 0,05$.



6 CONCLUSÕES

O sistema caseína-pectina com as misturas de óleos essenciais, apresentou alta eficiência de encapsulação, com valores superiores a 75% para C5P-M1 e C2P-M1, e 99% para C5P-M2 e C2P-M2 ao longo do período de análise. As análises de FTIR e DSC concordam com a alta eficiência de encapsulação, pois nas análises das nanopartículas não existem evidências de quantidades significativas de ativos livres. As imagens de MEV mostram que as nanopartículas possuem uma estrutura esférica.

Os sistemas apresentaram citotoxicidade na linhagem de células Balb-c 3T3, com destaque para C5P-M2, C2P-M2 e NE-M2 que reduziram a viabilidade celular para menos do que 80% na menor concentração testada e para abaixo de 55% na concentração mais alta. Em contraste, os ensaios de fitotoxicidade mostraram que as nanoformulações C5P, C5P-M2 e NE-M2 não apresentaram efeito fitotóxico em sementes e em plântulas de soja nas concentrações testadas.

Nos ensaios com *Caenorhabditis elegans*, C5P-M2 e NE-M2 mostraram toxicidade significativa, reduzindo a população em 50,3% e 98,1%, respectivamente, na concentração de 5mg/mL, com valores de CL50 de 7 mg/mL (C5P-M2) e 4 mg/mL (NE-M2). Essas nanoformulações também diminuíram a motilidade do nematoide ($63,83 \pm 29,6\%$ para C5P-M2 e $78,63 \pm 11,9\%$ para NE-M2), aumentaram o estresse oxidativo, concordando com a possibilidade de efeitos neurotóxicos, além de reduzir o tamanho da ninhada.

Pode-se concluir que a nanoformulação apresentou o efeito nematocida em *Pratylenchus brachyurus* no Ensaio 2 que pode ter sido influenciado por diversos fatores como o contato das nanopartículas, solo, e as temperaturas. Uma possibilidade para estudos futuros seria o aumento da concentração de óleo essencial nas nanopartículas, e/ou um tratamento prévio nas sementes para que haja um efeito de proteção das raízes em estádios iniciais de germinação, criando uma barreira de proteção maior.

Este trabalho fornece informações sobre o processo de preparo e caracterização de nanopartículas de pectina-caseína contendo uma mistura de óleos essenciais visando aplicações futuras na agricultura sustentável. Vale destacar que na literatura são encontrados poucos trabalhos que estudam o nano e/ou microencapsulamento de óleos essenciais para a aplicação em nematoides parasitas de planta. Do ponto de vista físico-químico as nanopartículas se mostram como bons sistemas carreadores para os OEs.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELGAWAD, M. M. M. Exploiting Plant–Phytonematode Interactions to Upgrade Safe and Effective Nematode Control. **Life**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1916, 2022.
- ADAMU, A. *et al.* Ginger Essential Oils-Loaded Nanoemulsions: Potential Strategy to Manage Bacterial Leaf Blight Disease and Enhanced Rice Yield. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 13, p. 3902, 2021.
- AGRIVALLE. Nematoides na plantação de soja. In: AGRIVALLE | BIOINSUMO AGRÍCOLA. 2024. Disponível em: <https://agrivalle.com.br/blog/2024/11/28/nematoides-na-plantacao-de-soja/>. Acesso em: 17 jan. 2025.
- AGROLINK. **Nematóide de cistos da soja (Heterodera glycines)**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/nematoide-de-cistos-da-soja_3092.html. Acesso em: 2 jan. 2025.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Horizontal and vertical droplet dispersion mimicking soybean - Septoria glycines pathosystem. **Horizontal and vertical droplet dispersion mimicking soybean - Septoria glycines pathosystem**, [s. l.], v. 154, p. 437–443, 2019.
- ALONSO-GATO, M. *et al.* Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 34, 2021.
- ALVES, M. D. S. *et al.* Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. **Crop Protection**, [s. l.], v. 119, p. 191–196, 2019.
- ANDRÉ, W. P. P. *et al.* Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 26, p. 323–330, 2017.
- ANJUM, A. *et al.* Preparation and characterization of guar gum based polyurethanes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 2174–2183, 2021.
- BADOWSKI, M. *et al.* **Methodology of Biological Evaluation Experiments of Herbicides, Bioregulators and Adjuvants. Part I. Field Experiments**. Puławy, Poland,: Wyd. IUNG, 2001.
- BAHOJB NORUZI, E. *et al.* Chemical and physical modification of graphene oxide nano-sheets using casein, Zn-Al layered double hydroxide, alginate hydrogel, and magnetic nanoparticles for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 269, p. 132047, 2024.
- BARBAŚ, P. *et al.* Assessing Phytotoxic Effects of Herbicides and Their Impact on Potato Cultivars in Agricultural and Environmental Contexts. **Agronomy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 85, 2024.
- BISSINGER, B. W. *et al.* Activity of Plant-Based Compounds on Anthelmintic-Resistant *Caenorhabditis elegans*. In: GROSS, A. D. *et al.* (org.). **ACS Symposium Series**. Washington, DC: American Chemical Society, 2014. v. 1172, p. 133–144. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2014-1172.ch010>. Acesso em: 5 jul. 2024.

BOOSTANI, S.; JAFARI, S. M. A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 109, p. 303–321, 2021.

BRADFORD, B. R. *et al.* Neonicotinoid-containing insecticide disruption of growth, locomotion, and fertility in *Caenorhabditis elegans*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. e0238637, 2020.

BRENNER, S. THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. **Genetics**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

BRÜGGER, B. P. *et al.* Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 8358, 2019.

BURNS, A. R. *et al.* *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 7485, 2015.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 13809, 2015a.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 13809, 2015b.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Preparation and Characterization of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanospheres Containing the Local Anesthetic Lidocaine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 215–226, 2013.

CAMPOS, V. A. C. *et al.* STYRYLLACTONES FROM *Cryptocarya aschersoniana* MEZ. (LAURACEAE JUSS.) WITH ACTIVITY AGAINST *Meloidogyne* SPP. AND IN SILICO INTERACTION WITH A PUTATIVE FUMARASE FROM *Meloidogyne* hapla. **Química Nova**, [s. l.], v. 39, p. 130–136, 2016.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Using Chitosan-Coated Polymeric Nanoparticles-Thermosensitive Hydrogels in association with Limonene as Skin Drug Delivery Strategy. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, n. 1, p. 9165443, 2022.

CANTERI, M. *et al.* Pectin: from raw material to the final product. **Polímeros**, [s. l.], v. 22, p. 149–157, 2011.

CARRANZA-GARCÍA, E.; NAVARRO, R. E. Insights Into the Hypometabolic Stage Caused by Prolonged Starvation in L4-Adult *Caenorhabditis elegans* Hermaphrodites. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, p. 124, 2020.

CASTANHEIRA, C. M. *et al.* *Pratylenchus brachyurus* parasitism on soybean: effects on productivity, vegetative and nematological parameters and chemical properties. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 651–661, 2020.

CATANI, L. *et al.* Essential Oils as Nematicides in Plant Protection—A Review. **Plants**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1418, 2023.

- CATAURO, M. *et al.* Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania Thymus Vulgaris essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 461–470, 2017.
- CHAVAN, S. N.; SOMASEKHAR, N.; RANI, B. J. Nematicidal Activity of Essential Oils Against Rice Root-Knot Nematode. [s. l.], v. 49, p. 139–145, 2019.
- CHEN, L. *et al.* Casein nanoparticles as oral delivery carriers of mequindox for the improved bioavailability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 195, p. 111221, 2020.
- CHEN, S. *et al.* Designing biocompatible protein nanoparticles for improving the cellular uptake and antioxidation activity of tetrahydrocurcumin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 102404, 2021.
- CHEN, H. *et al.* Development and characterization of *Artemisia argyi* essential oil-loaded nanoemulsion for sustainable weed control: Enhanced stability, amplified activity, protected non-target. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 457, p. 142487, 2024.
- CHILLET, M. *et al.* Postharvest treatment of mango: Potential use of essential oil with thymol to control anthracnose development. **Fruits**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 153–157, 2018.
- CHITWOOD, D. J. Nematicides. In: **ENCYCLOPEDIA OF AGROCHEMICALS**. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/047126363X.agr171>.
- CHOUDHARY, A.; SALAR, R. K.; THAKUR, R. Synthesis, characterization and insecticidal activity of *Mentha spicata* essential oil loaded polymeric nanoparticles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 55, p. 102989, 2024.
- CIÊNCIA E TECNOLOGIA TORNARAM O BRASIL UM DOS MAIORES PRODUTORES MUNDIAIS DE ALIMENTOS - PORTAL EMBRAPA. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/75085849/ciencia-e-tecnologia-tornaram-o-brasil-um-dos-maiores-produtores-mundiais-de-alimentos>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- COLLINS, K. M. *et al.* Activity of the *C. elegans* egg-laying behavior circuit is controlled by competing activation and feedback inhibition. **eLife**, [s. l.], v. 5, p. e21126, 2016.
- D'ADDABBO, T.; AVATO, P. Chemical Composition and Nematicidal Properties of Sixteen Essential Oils—A Review. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1368, 2021.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011.
- DARRAG, H. M.; ALHAJHOJ, M. R.; KHALIL, H. E. Bio-Insecticide of Thymus vulgaris and Ocimum basilicum Extract from Cell Suspensions and Their Inhibitory Effect against Serine, Cysteine, and Metalloproteinases of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). **Insects**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 405, 2021.

- DASSANAYAKE, M. K. *et al.* Synergistic Field Crop Pest Management Properties of Plant-Derived Essential Oils in Combination with Synthetic Pesticides and Bioactive Molecules: A Review. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2016, 2021.
- DAVIS, A. N.; TANIS, J. E. Measuring *Caenorhabditis elegans* Sensitivity to the Acetylcholine Receptor Agonist Levamisole. **Journal of visualized experiments : JoVE**, [s. l.], n. 184, p. 10.3791/64056, 2022.
- DE OLIVEIRA, J. L. *et al.* Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 75, n. 7, p. 1855–1865, 2019.
- DE OLIVEIRA, C. M. *et al.* Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. **Biological Control**, [s. l.], v. 152, p. 104425, 2021.
- DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; FRACETO, L. F. Recent Developments and Challenges for Nanoscale Formulation of Botanical Pesticides for Use in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 34, p. 8898–8913, 2018.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. *et al.* Biological control of *Pratylenchus brachyurus* in soybean crops. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 166, n. 10, p. 722–728, 2018.
- DIAS-ARIEIRA, C. R. *et al.* Correlations between nematode numbers, chemical and physical soil properties, and soybean yield under different cropping systems. **Rhizosphere**, [s. l.], v. 19, p. 100386, 2021.
- ANTONIOLI, G. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo óleo essencial de capim-limão e avaliação contra fungos fitopatogênicos. (Dissertação), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.
- DJEBBI, T. *et al.* Encapsulated Bio-insecticide from *Citrus aurantium* (Rutaceae) Essential Oil and Pectin and Potential for the Control of the Lesser Grain Borer *Rhyzopertha dominica* (Bostrichidae). **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 2997–3011, 2023.
- DUERASCH, A. *et al.* Study on β -Casein Depleted Casein Micelles: Micellar Stability, Enzymatic Cross-Linking, and Suitability as Nanocarriers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 68, n. 47, p. 13940–13949, 2020.
- EBONE, L. A.; KOVALESKI, M.; DEUNER, C. C. Nematicides: history, mode, and mechanism action. **Plant Science Today**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 91–97, 2019.
- E-BOOK_BOLETIMZDEZSAFRASZ-Z4ZLEVANTAMENTO_1.PDF. [S. l.: s. n.], [s. d.].
- ELMIZADEH, A. *et al.* Fabrication and characterization of pectin-zein nanoparticles containing tanshinone using anti-solvent precipitation method. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 260, p. 129463, 2024.

EMBRAPA. **Safra 2024/2025: Produção de Grãos deve alcançar 323,3 Milhões de toneladas.** [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/93594768/safra-20242025-producao-de-graos-deve-alcancar-3233-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 18 jan. 2025.

EXPORTAÇÕES DO AGRONEGÓCIO SOMAM MAIS DE US\$ 14 BI EM AGOSTO. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-somam-mais-de-us-14-bi-em-agosto>. Acesso em: 18 jan. 2025.

FAN, S. *et al.* Effects of Salts on Structural, Physicochemical and Rheological Properties of Low-Methoxyl Pectin/Sodium Caseinate Complex. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2009, 2021.

FAVORETO, L. *et al.* Diagnose e manejo de fitonematoides na cultura da soja. [s. l.], 2019.

FEDERICO, O.-D. *et al.* 7 - Pectin nanoparticles: Fabrication and uses. In: VENKATESAN, J. *et al.* (org.). **Polysaccharide Nanoparticles**. [S. l.]: Elsevier, 2022. (Micro and Nano Technologies). p. 163–201. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012822351200022X>.

FERNANDES, G. A. *et al.* Métodos de controle do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus* na cultura da soja. **Multidisciplinary Reviews**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e2020012, 2020.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. [S. l.]: Norma Editora, 2016.

FERRAZ, S.; DE FREITAS, L. G. O CONTROLE DE FITONEMATÓIDES POR PLANTAS ANTAGONISTAS E PRODUTOS NATURAIS. [s. l.], 2008. Disponível em: <http://www.ifc-camboriu.edu.br/~wilson/LPPO-Agroecologia/Artigocontroledenematoidespor%20plantas.pdf>.

FERREIRA, L. *et al.* Nematóide do cisto da soja e princípios de controle. **Multidisciplinary Reviews**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. e2019012, 2019.

FERREIRA, L. E. *et al.* *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 228, p. 70–76, 2016.

FINCHEIRA, P. *et al.* Nanotechnology advances for sustainable agriculture: current knowledge and prospects in plant growth modulation and nutrition. **Planta**, [s. l.], v. 254, n. 4, p. 66, 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **THE ROLE OF SOYBEAN IN FIGHTING WORLD HUNGER**. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/c239502b-efef-4448-9fe0-2af1db6dffaa/content>.

FRAJ, A. *et al.* A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical

characterization, and storage stability. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 140, p. 111669, 2019.

FREITAS, J. R. B. *et al.* Distribuição espacial de *Pratylenchus brachyurus* em área de soja no Leste do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–6, 2019.

FRÉZAL, L.; FÉLIX, M.-A. The Natural History of Model Organisms: *C. elegans* outside the Petri dish. **eLife**, [s. l.], v. 4, p. e05849, 2015.

FUENTES, C. *et al.* Effects of essential oil components exposure on biological parameters of *Caenorhabditis elegans*. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 159, p. 112763, 2022.

GEBHARDT, R. *et al.* Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. **European Biophysics Journal**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 503–509, 2006.

GERMANO-COSTA, T. *et al.* Use of 2D and co-culture cell models to assess the toxicity of zein nanoparticles loading insect repellents icaridin and geraniol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 216, p. 112564, 2022.

GHOLAM JAMSHIDI, E. *et al.* Edible Iron-Pectin Nanoparticles: Preparation, Physicochemical Characterization and Release Study. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 628–639, 2024.

GONG, H. Y. *et al.* Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 25–32, 2014.

GOYAL, L. *et al.* Nematicidal potential of *Citrus reticulata* peel essential oil, isolated major compound and its derivatives against *Meloidogyne incognita*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, [s. l.], v. 54, p. 1–19, 2021.

GRILLO, R. *et al.* Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 278, p. 163–171, 2014.

HAMMAD, E. A.; EL-SAGHEER, A. M. Comparative efficacy of essential oil nanoemulsions and bioproducts as alternative strategies against root-knot nematode, and its impact on the growth and yield of *Capsicum annuum* L. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 47–53, 2023.

HAO, L. *et al.* Antibacterial Microfibrillated Cellulose as Stimuli-Responsive Carriers with Enhanced UV Stability for Sustained Release of Essential Oils and Pesticides. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s. l.], v. 12, n. 17, p. 6666–6681, 2024.

HENNING, A. A. *et al.* Manual de identificação de doenças de soja. [s. l.], n. 5, 2014.

HERNANDO, G.; TURANI, O.; BOUZAT, C. *Caenorhabditis elegans* muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. e0007895, 2019.

HOU, H. *et al.* Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **PeerJ**, [s. l.], v. 8, p. e9626, 2020.

HUA, C. *et al.* Casein-pectin nanocomplexes as a potential oral delivery system for improving stability and bioactivity of curcumin. **Colloid and Polymer Science**, [s. l.], v. 299, n. 10, p. 1557–1566, 2021.

HUSSAIN, M. A.; MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z. REPRODUCTION OF *Meloidogyne incognita* ON RESISTANT AND SUSCEPTIBLE OKRA CULTIVARS. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 53, n. 02, p. 371–375, 2016.

IDROES, R. *et al.* Kovats Retention Index analysis of flavor and fragrance compound using Biplot Statistical method in gas chromatography systems. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 523, n. 1, p. 012007, 2019.

ISMAN, M. B. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 235–241, 2020.

JACQUES, M. T. *et al.* Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 139, p. 245–253, 2017.

JAIN, N.; CHOUDHARY, P. Phytochemistry Traditional Uses and Pharmacological Aspect of *Thymus vulgaris*: A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 84, n. 6, 2022. Disponível em: <https://www.ijpsonline.com/articles/phytochemistry-traditional-uses-and-pharmacological-aspect-of-emthymus-vulgarisem-a-review-4782.html>. Acesso em: 22 jul. 2024.

JAMES, A. E.; DRISKELL, J. D. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). **Analyst**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 1212–1218, 2013.

JARDIM, I. N. *et al.* (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 479–487, 2018.

JBILOU, R. *et al.* Potential use of *Origanum vulgare* in agricultural pest management control: a systematic review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 347–363, 2024.

JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020.

KAKOURI, E. *et al.* *Origanum majorana* Essential Oil—A Review of Its Chemical Profile and Pesticide Activity. **Life**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1982, 2022.

KALAISELVI, D. *et al.* Altitude-related changes in the phytochemical profile of essential oils extracted from *Artemisia nilagirica* and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 139, p. 111472, 2019.

KANDEL, S. L. *et al.* Relationship Between Climatic Factors and Distribution of *Pratylenchus* spp. in the Dryland Wheat-Production Areas of Eastern Washington. **Plant Disease**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 1448–1456, 2013.

KATIKI, L. M. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 182, n. 2, p. 264–268, 2011.

KATIKI, L. M. *et al.* Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 243, p. 47–51, 2017.

KHANAL, C.; LAND, J. Study on two nematode species suggests climate change will inflict greater crop damage. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, p. 14185, 2023.

KIM, S. *et al.* A method of finding optimal weight factors for compound identification in gas chromatography–mass spectrometry. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1158, 2012.

KIM, Y. J. *et al.* Nematicidal Activity of Grammicin Biosynthesis Pathway Intermediates in *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 15, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4675>.

KOO, I. *et al.* iMatch2: Compound identification using retention index for analysis of gas chromatography–mass spectrometry data. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1337, p. 202–210, 2014.

KUMAR, A. *et al.* Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils. In: FUNCTIONAL AND PRESERVATIVE PROPERTIES OF PHYTOCHEMICALS. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 241–267. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128185933000087>. Acesso em: 22 jul. 2024.

LANZERSTORFER, P. *et al.* Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 673–691, 2021.

LARSCH, J. *et al.* High-throughput imaging of neuronal activity in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 45, 2013. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1318325110>. Acesso em: 23 jul. 2024.

LI, R. *et al.* Preparation of Pectin Nanospheres and Its Effect on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seed Germination and Growth. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 3197–3207, 2022.

LIU, M. *et al.* Bioassay-Guided Isolation of Anthelmintic Components from Semen pharbitidis, and the Mechanism of Action of Pharbitin. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 15739, 2022.

LIU, Z.; LI, Q. X.; SONG, B. Pesticidal Activity and Mode of Action of Monoterpenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 70, n. 15, p. 4556–4571, 2022.

LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 486, n. 1–2, p. 59–68, 2015.

MA, X. *et al.* Extraction of Low Methoxyl Pectin from Fresh Sunflower Heads by Subcritical Water Extraction. **ACS Omega**, [s. l.], v. 5, n. 25, p. 15095–15104, 2020.

MACHADO, A. C. Z.; AMARO, P. M.; SILVA, S. A. D. Two novel potential pathogens for soybean. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e0221416, 2019.

MADALOSSO, R. G. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effects of *Melaleuca alternifolia* nanoparticles in *Meloidogyne* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1344–1349, 2017.

MAINARDI, J. T.; ASMUS, G. L. DANOS E POTENCIAL REPRODUTIVO DE *Pratylenchus brachyurus* EM CINCO ESPÉCIES VEGETAIS. **REVISTA DE AGRICULTURA NEOTROPICAL**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 38–47, 2015.

MARTĂU, G. A.; MIHAI, M.; VODNAR, D. C. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. **Polymers**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1837, 2019.

MEBARKI, N. *et al.* Microencapsulation of *Thymus fontanesii* extracts in pectin/casein: characterization, release behavior and storage stability. **Iranian Polymer Journal**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 301–316, 2022.

MENDES, M. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU ANÁLISE INSTRUMENTAL. [s. l.], 2016.

MONGIANO, G. *et al.* Application of plant-derived bioactive compounds as seed treatments to manage the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*. **Crop Protection**, [s. l.], v. 148, p. 105739, 2021.

NÓBREGA, F.F.F. **Monoterpeno 4-terpineol — uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos**. (Tese) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará. 2012.

MONTEIRO, R. A. *et al.* Zein based-nanoparticles loaded botanical pesticides in pest control: An enzyme stimuli-responsive approach aiming sustainable agriculture. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 417, p. 126004, 2021.

MOTA FILHO, T. M. M. *et al.* Chemical composition of *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) essential oil, its insecticidal and repellency activity against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera:Curculionidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 2701–2708, 2022.

NASIOU, E.; GIANNAKOU, I. O. The potential use of carvacrol for the control of *Meloidogyne javanica*. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 415–424, 2017.

JORDI Labs. **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Compound Scoring: Match Factor, Reverse Match Factor, and Probability**. 2017. Disponível em: <https://jordilabs.com/wp-content/uploads/2017/07/Whitepaper-NIST-EPA-NIH-Mass-Spectral-Library-Compound-Scoring.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2024

NOMURA, R. B. G. *et al.* *Pratylenchus brachyurus*: status and perspectives in Brazilian agriculture. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 573–589, 2024.

OLIVEIRA, C.; INOMOTO, M. Nematoides que atacam a cultura do milho no Brasil. **O Biológico**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 1–13, 2023.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Desenvolvimento Sustentável Objetivo 2: Fome zero e agricultura sustentável | As Nações Unidas no Brasil**. [S. l.], 2025a. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 11 mar. 2025.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Desenvolvimento Sustentável Objetivo 9: Indústria, inovação e infraestrutura | As Nações Unidas no Brasil**. [S. l.], 2025b. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/9>. Acesso em: 11 mar. 2025.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Desenvolvimento Sustentável Objetivo 12: Consumo e produção responsáveis | As Nações Unidas no Brasil**. [S. l.], 2025c. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12>. Acesso em: 11 mar. 2025.

ORO, V. *et al.* Nematicidal Activity of Essential Oils on a Psychrophilic *Panagrolaimus* sp. (Nematoda: Panagrolaimidae). **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1588, 2020.

PALOMARES-RIUS, J. E. *et al.* Editorial: Protecting Our Crops - Approaches for Plant Parasitic Nematode Control. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 726057, 2021.

PAN, X. *et al.* Nanobiopesticides in sustainable agriculture: developments, challenges, and perspectives. **Environmental Science: Nano**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 41–61, 2023.

PAUL, S.; DAS, B.; SHARMA, H. K. A Review on Bio-Polymers Derived from Animal Sources with Special Reference to their Potential Applications. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 209–223, 2021.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 268, p. 207–215, 2014.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 157, p. 1862–1873, 2017.

PETERSON, R. B.; RANKIN, S. A.; IKEDA, S. Short communication: Stabilization of milk proteins at pH 5.5 using pectic polysaccharides derived from potato tubers. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 10, p. 8691–8695, 2019.

PIAO, X.; SUN, M.; YI, F. Evaluation of Nematocidal Action against *Caenorhabditis elegans* of Essential Oil of Flesh Fingered Citron and Its Mechanism. [s. l.], Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2020/1740938>. Acesso em: 11 jan. 2025.

PLATA-RUEDA, A. *et al.* Chemical Composition and Insecticidal Properties of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) Essential Oil against the Stored Product Beetle, *Sitophilus granarius*. **Agronomy**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 2204, 2022.

POLATOGLU, K. “Chemotypes”— A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. **The Natural Products Journal**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 10–14, 2013.

POMPY DUTTA, T. B., Neelav Sarma, Samarjit Saikia, Roktim Gogoi; LAL, M. Pharmacological Activity of *Trachyspermum ammi* L. Seeds Essential Oil Grown from Northeast India. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1373–1388, 2021.

PRABU, S. *et al.* Insecticidal activity of *Origanum majorana* L. essential oil as anti-cholinergic agent. **Entomological Research**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 402–413, 2020.

QU, M. *et al.* Amino modification enhances reproductive toxicity of nanopolystyrene on gonad development and reproductive capacity in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 254, p. 112978, 2019.

QU, C.; LI, Z.; WANG, X. UHPLC-HRMS-Based Untargeted Lipidomics Reveal Mechanism of Antifungal Activity of Carvacrol against *Aspergillus flavus*. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 93, 2021.

RADÜNZ, M. *et al.* Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 330, p. 108696, 2020.

RAND, J. B. Acetylcholine. In: WORMBOOK. 1. ed. [S. l.]: The C. elegans Research Community, 2007. v. 1. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.pdf. Acesso em: 27 dez. 2024.

RANTS’O, T. A. *et al.* Potential of Essential Oil-Based Anticholinesterase Insecticides against Anopheles Vectors: A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 20, p. 7026, 2022.

RASHIDIPOUR, M. *et al.* Pectin/Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles: Efficient Carriers for Reducing Soil Sorption, Cytotoxicity, and Mutagenicity of Paraquat and Enhancing Its Herbicide Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 20, p. 5736–5745, 2019.

RASTI, F. *et al.* Anticancer, antioxidant, and antibacterial effects of nanoemulsion of *Origanum majorana* essential oil. **Iranian Journal of Microbiology**, [s. l.], 2023. Disponível em: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/IJM/article/view/13511>. Acesso em: 26 maio 2024.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 365, 2020.

ROCHA, L. O. D. *et al.* Chemical characterization and in vitro biological activity of *Cymbopogon citratus* extracts against *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp. nematodes from sheep. **Parasitology**, [s. l.], v. 147, n. 13, p. 1559–1568, 2020.

SADGROVE, N.; PADILLA-GONZÁLEZ, G.; PHUMTHUM, M. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 789, 2022.

SALSABILA, D. *et al.* Cytoprotective Properties of Citronella Oil (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendl.) and Lemongrass Oil (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) through Attenuation of Senescent-Induced Chemotherapeutic Agent Doxorubicin on Vero and NIH-3T3 Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1667–1675, 2023.

SARAIVA, N. R. *et al.* Clove oil-loaded zein nanoparticles as potential bioinsecticide agent with low toxicity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 24, p. 100554, 2021.

SÁROSI, Sz. *et al.* Effect of different drying techniques on the aroma profile of *Thymus vulgaris* analyzed by GC–MS and sensory profile methods. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 46, p. 210–216, 2013.

SARRI, K. *et al.* Recent Advances and Developments in the Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components against Root-Knot Nematodes. **Agronomy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 213, 2024.

SATHIYABAMA, M. Biopolymeric Nanoparticles as a Nanocide for Crop Protection. In: PUDAKE, R. N.; CHAUHAN, N.; KOLE, C. (org.). **Nanoscience for Sustainable Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 139–152. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-97852-9_6.

SAYED, A. *et al.* Radiation Synthesis of Green Nanoarchitectonics of Guar Gum-Pectin/Polyacrylamide/Zinc Oxide Superabsorbent Hydrogel for Sustainable Agriculture. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 4589–4600, 2022.

SCHAFER, W. Nematode nervous systems. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 20, p. R955–R959, 2016.

SEONG, J. *et al.* Microbial production of nematicidal agents for controlling plant-parasitic nematodes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 108, p. 69–79, 2021.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 2018.

SHARMA, S. *et al.* Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 2–12, 2020.

SHARMA, R.; KUMAR, V. Nano enabled agriculture for sustainable soil. **Waste Management Bulletin**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 152–161, 2024.

SHU, C.; SUN, L.; ZHANG, W. Thymol has antifungal activity against *Candida albicans* during infection and maintains the innate immune response required for function of the p38 MAPK signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 1013–1024, 2016.

SILVEIRA, R. S. D. IMPORTÂNCIA E MANEJO DE NEMATÓIDES EM LAVOURAS DE SOJA NO BRASIL E PERSPECTIVAS FUTURAS. **MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**, [s. l.], 2021.

SOLTANZADEH, M. *et al.* Chitosan nanoparticles encapsulating lemongrass (*Cymbopogon commutatus*) essential oil: Physicochemical, structural, antimicrobial and in-vitro release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 192, p. 1084–1097, 2021.

SOSA, A. L. *et al.* In vitro compatibility of *Pimpinella anisum* and *Origanum vulgare* essential oils with nematophagous fungi and their effects against *Nacobbus aberrans*. **Journal of Pest Science**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1381–1395, 2020.

SOUTHAMPTON NEUROSCIENCE GROUP (SONG), CENTRE FOR BIOLOGICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON, SOUTHAMPTON SO17 1BJ, UK.; HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. **WormBook**, [s. l.], p. 1–29, 2014.

STAVROPOULOU, E. *et al.* Effects of four terpenes on the mortality of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 137–146, 2021.

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

SYNOWIEC, A. *et al.* *Carum carvi* L. essential oil: A promising candidate for botanical herbicide against *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. in maize cultivation. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 140, p. 111652, 2019.

TAK, J.-H.; JOVEL, E.; ISMAN, M. B. Effects of rosemary, thyme and lemongrass oils and their major constituents on detoxifying enzyme activity and insecticidal activity in *Trichoplusia ni*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 140, p. 9–16, 2017.

TANG, C.-H. Assembly of food proteins for nano- encapsulation and delivery of nutraceuticals (a mini-review). **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 117, p. 106710, 2021.

THANKAPPAN, D. A. *et al.* Plant-mediated biosynthesis of zein–pectin nanoparticle: Preparation, characterization and *in vitro* drug release study. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 1785–1791, 2020.

TRAILOVIĆ, S. M. *et al.* Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, n. 8, p. 3059–3068, 2015.

USMAN, M. *et al.* Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 721, p. 137778, 2020.

VERDEGUER, M.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ARANITI, F. Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. [s. l.], 2020.

VISAKH, N. U. *et al.* Chemical characterisation, insecticidal and antioxidant activities of essential oils from four *Citrus* spp. fruit peel waste. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 50, p. 102163, 2022.

WANG, K. *et al.* Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 1423–1430, 2019.

WANG, D. *et al.* Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. **Nature Nanotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 347–360, 2022.

WU, T. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. **Chemosphere**, [s. l.], v. 221, p. 708–726, 2019.

WUSIGALE; LIANG, L.; LUO, Y. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 97, p. 391–403, 2020.

YANG, L. *et al.* Pectin-Coated Iron-Based Metal–Organic Framework Nanoparticles for Enhanced Foliar Adhesion and Targeted Delivery of Fungicides. **ACS Nano**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 6533–6549, 2024.

YE, R.; HARTE, F. Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 799–805, 2013.

YU, C.-W. *et al.* Essential Oil Alloaromadendrene from Mixed-Type *Cinnamomum osmophloeum* Leaves Prolongs the Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 26, p. 6159–6165, 2014.

ZHANG, X. *et al.* Abnormal neurotransmission of GABA and serotonin in *Caenorhabditis elegans* induced by Fumonisin B1. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 304, p. 119141, 2022.

ZHAO, X. *et al.* Facile synthesis of nano-nanocarriers from chitosan and pectin with improved stability and biocompatibility for anthocyanins delivery: An in vitro and in vivo study. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 109, p. 106114, 2020.

ZHU, Y. *et al.* Plant Essential Oils: Dual Action of Toxicity and Egg-Laying Inhibition on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), Unveiling Their Potential as Botanical Pesticides. **Plants**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 763, 2024.