UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

Maria Vitória Oliveira de Carvalho

Júlia Moreira Silva

MICROENCAPSULAÇÃO DE TRICHODERMA SP. EM EMULSÃO DE ÓLEO DE NEEM PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Sorocaba – SP

2025

Maria Vitória Oliveira de Carvalho

Julia Moreira Silva

MICROENCAPSULAÇÃO DE TRICHODERMA SP. EM EMULSÃO DE ÓLEO DE NEEM PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade de Sorocaba.

Orientadora Profa. Dra.: Thais Jardim Oliveira

Sorocaba – SP

2025

Maria Vitória Oliveira de Carvalho

Julia Moreira Silva

MICROENCAPSULAÇÃO DE TRICHODERMA SP. EM EMULSÃO DE ÓLEO DE NEEM PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 05/06/2025.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Profa. Dra. Thais Jardim Oliveira

Universidade de Sorocaba.

_____

Prof. Dr Lorenzo Pissinatti

Universidade de Sorocaba.

_____

Ma. Saihonara Pereira

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a nossa orientadora, professora Dra. Thais Jardim, pelo seu olhar atento, suas orientações essenciais e, principalmente, sua paciência e incentivo que foram o combustível para que pudéssemos transformar nossas ideias em resultados. Mais do que uma orientadora, foi uma amiga e mentora que acreditou em nosso potencial desde o início e nos guiou por cada etapa deste processo.

Expressamos, também, nossos sinceros agradecimentos às instituições que contribuíram ativamente para o desenvolvimento deste trabalho, oferecendo apoio estrutural indispensável. Em especial, registramos nossa profunda gratidão à Ma. Saihonara Pereira, cujo apoio técnico e valiosas ideias foram fundamentais para a execução da nossa formulação. A confiança depositada em nosso trabalho e a abertura para que desenvolvêssemos nossas propostas em um ambiente profissional foram diferenciais marcantes neste projeto.

Dedicamos este trabalho a todas as pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para sua realização, em especial aos nossos familiares e amigos, pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos desafiadores. Mas principalmente dedicamos à nossa parceria enquanto dupla, construída com confiança, respeito e amizade ao longo da graduação.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar uma formulação contendo Trichoderma sp. microencapsulado em emulsão de óleo de neem, visando o controle biológico do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco. Para isso, foram aplicadas técnicas de coacervação complexa e emulsificação, utilizando como matriz polimérica goma xantana, pectina e quitosana. As formulações obtidas foram submetidas a análises físico-químicas de pH, densidade, viscosidade e avaliação morfológica por microscopia, além de testes biológicos in vitro. Os resultados demonstraram que a presença do óleo de neem, aliado à microencapsulação, conferiu maior estabilidade às formulações, mantendo pH e viscosidade adequados ao longo de 30 dias. Nos testes de antagonismo, as formulações apresentaram alta eficácia na inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, superando as formulações convencionais de suspenção aquosa de conídios. Assim, a combinação do Trichoderma sp. com o óleo de neem microencapsulado representa uma estratégia promissora e sustentável para o manejo do mofo branco, reforçando o potencial da biotecnologia na agricultura moderna.

Palavras-chave: Trichoderma sp., óleo de neem, microencapsulação, controle biológico, *Sclerotinia sclerotiorum*.

ABSTRACT

The present study aimed to develop and evaluate a formulation containing *Trichoderma* sp. microencapsulated in a neem oil emulsion, targeting the biological control of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold. For this purpose, complex coacervation and emulsification techniques were applied, using xanthan gum, pectin, and chitosan as the polymeric matrix. The obtained formulations were subjected to physicochemical analyses of pH, density, and viscosity, as well as morphological evaluation by microscopy and in vitro biological tests. The results showed that the presence of neem oil, combined with microencapsulation, provided greater stability to the formulations, maintaining appropriate pH and viscosity over 30 days. In antagonism tests, the formulations demonstrated high efficacy in inhibiting the growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, outperforming conventional aqueous conidial suspensions. Therefore, the combination of *Trichoderma* sp. with microencapsulated neem oil represents a promising and sustainable strategy for managing white mold, reinforcing the potential of biotechnology in modern agriculture.

Keywords: *Trichoderma* sp., neem oil, microencapsulation, biological control, *Sclerotinia sclerotiorum*.

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO 10

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12

2.1. Controle Biológico 12

2.2. Trichoderma sp. 12

2.3. *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo Branco) 13

2.4. *Azadirachta indica* (Neem) 14

2.5. Pectina 15

2.6. Quitosana 15

2.7. Goma de Xantana 16

2.8. Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) 16

2.9. Coacervação 17

2.9.1. Conservação simples 17

2.9.2. Coacervação Complexa 17

3. OBJETIVOS 19

3.1. Objetivo Geral 19

3.2. Objetivos Específicos 19

4. MATERIAIS E METODOS 20

4.1. Repique dos microrganismos 20

4.1.1. Obtenção de escleródios de mofo branco 20

4.1.2. Obtenção dos conídios de Trichoderma sp 20

4.2. Avaliação da biológica na presença do óleo de Neem 20

4.2.1. Avaliação de desenvolvimento micelial dos fungos 20

4.3. Produtos Formulados 21

4.3.1. Formulação biopolimérica contendo conídios (PXQ) 21

4.3.2. Formulação com óleo de Neem (PXQN) 21

4.4. Caracterização físico-química 21

4.4.1. Análise de pH 21
4.4.2. Análise de Viscosidade.....22
4.4.3. Análise de Densidade.....22
4.4.4. Análise de Microscopia.....23
4.5. Teste Biológicos.....23
4.5.1. Análise de Concentração.....23
4.5.2. Teste de Antagonismo *in vitro*. 24
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 26
5.1. Repique dos microrganismos.....26
5.2. Avaliação Biológica na presença do óleo de Neem.....26
5.3. Produtos Formulados.....31
5.4. Avaliação Físico-química das Formulações.....32
5.5. Testes Biológicos.....37
6. CONCLUSÃO.....40
REFERÊNCIAS.....41

1. INTRODUÇÃO

A agricultura desempenha um dos papeis mais importantes principalmente na estrutura econômica de países subdesenvolvidos, e a produção de alimentos é diretamente dependente de condições climáticas e do manejo adequado de doenças e pragas (GODFRAY et al., 2010). Os métodos convencionais como fertilizantes e pesticidas, tem sido amplamente utilizados como principal alternativa ao manejo de pragas na lavoura, e seu uso vem se intensificando com a alta demanda na produção de alimentos do último século (CAMPOS et al., 2023 & TUDI et al., 2021),

O uso de agrotóxicos e defensivos agrícolas vem se intensificando cada vez mais com o surgimento de novas pragas resistentes, levando a necessidade de aumentar as doses aplicadas, acarretando em impactos à saúde pública e o meio ambiente (LEITE et al., 2022). Apesar de seu uso ser imprescindível para o manejo agrícola, os pesticidas apresentam um grande desafio tanto para o meio ambiente como para a segurança alimentar, pois seus resíduos põem em risco a saúde pública e acarretar em danos a ecossistemas contaminando o solo e as águas (GOMES et al., 2020).

O uso de microrganismo antagonistas tem sido uma boa estratégia para o controle de patógenos no campo, atuando principalmente na competição por nutrientes, produzindo metabólitos e promovem a resistência as plantas (GALARZA et al., 2022). O gênero Trichoderma sp. é muito estudado por sua eficiência antimicrobiana, controlando as doenças nas plantas e melhorando a qualidade do solo. Produtos contendo este fungo são muito utilizados na agricultura, e possuem eficácia comprovada contra doenças causadas por patógenos como Fusarium spp. e Phytophthora spp. (PAGIN et al., 2023 & POMELLA et al., 2009).

A microencapsulação é uma tecnologia que ajuda a otimizar o uso de agentes biológicos, promovendo estabilidade em um sistema de liberação sustentada desses agentes (JOHN et al., 2011). O encapsulamento pode ser obtido por processos físico-químicos, dependendo do material de revestimento, como emulsificação, liofilização, coacervação e outros, conferindo a proteção de uma barreira física às células microbianas contra estresses mecânicos e condições ambientais adversas, criando um microambiente definido e estável, melhorando significativamente a viabilidade dos microrganismos (SABERI-RISEH et al., 2021).

O mofo branco ou também conhecido como podridão do caule, causado pelo fungo *Scleotinia sclerotiorum*, é uma das doenças que mais prejudicam diversas culturas agrícolas, como feijão; girassol; soja e o algodão. Possui alta capacidade de sobrevivência no solo, o que dificulta seu controle com os métodos utilizados convencionalmente (LAMEIRO et al., 2020). Atualmente a estratégia utilizada são os fungicidas sintéticos, entretanto sua eficácia pode ser reduzida devido a resistência do fungo e também à presença dos inóculos no solo, que duram longos períodos. (BOLAND & HALL, 2020). Uma alternativa inovadora e sustentável para resolver essa problemática é o uso do Trichoderma sp., reduzindo os impactos ambientais e minimizando a severidade das doenças (MEYER et al., 2021).

Além da utilização do Trichoderma sp como um antagonista para o mofo branco, pesquisas recentes têm destacado a complexidade da composição química do óleo de neem, enfatizando a presença de limonoides, como a azadiractina, e outros compostos que conferem a este óleo um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades inseticidas e antimicrobianas, que podem promover uma potencialização no efeito fungicida para controle do mofo branco. (WYLIE et al., 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Controle Biológico

O controle biológico é uma prática cada vez mais integrada às estratégias sustentáveis de manejo de pragas agrícolas, baseando-se na utilização de inimigos naturais, podendo ser classificada em três categoriais principais: o controle biológico clássico, que envolve a introdução de um inimigo natural de pragas emergente não nativa da região; o controle biológico aumentativo, que consiste na multiplicação e liberação controlada de agentes de controle nativos da região; e o controle biológico conservativo, que visa preservar e estimular populações naturais desses inimigos por meio de práticas culturais adequadas (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

Dentre os principais grupos de agentes biológicos utilizados estão os predadores, como as joaninhas da família *Coccinellidae*, os parasitoides, como as vespas do gênero *Trichogramma*, e os patógenos, como bactérias (*Bacillus thuringiensis*), fungos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) e vírus entomopatogênicos (SILVA; COSTA; PEREIRA, 2023).

Esses organismos têm sido aplicados com sucesso em diversas culturas. Um exemplo consolidado é o uso de *Trichogramma pretiosum* para o controle da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), bem como a aplicação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no manejo de lagartas em soja, milho e hortaliças (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

As vantagens do controle biológico incluem a alta especificidade para o alvo, o menor impacto ambiental, a ausência de resíduos tóxicos e a menor probabilidade de desenvolvimento de resistência pelas pragas. No entanto, sua adoção ainda é limitada por fatores como necessidade de conhecimento técnico específico, variabilidade da eficácia em função de condições climáticas e integração com outras práticas de manejo (SILVA; COSTA; PEREIRA, 2023).

2.2. Trichoderma sp.

O Trichoderma sp. corresponde à fungos filamentosos pertencentes à família Hypocreaceae. São microrganismos saprofíticos vastamente distribuídos no solo, em matéria orgânica em decomposição e, principalmente, na rizosfera de diversas plantas. Obtém um crescimento rápido, o que resulta na capacidade de adaptação e

produção de metabólitos bioativos, tornando-os altamente eficientes em aplicações agrícolas, especialmente como agentes de controle biológico e bioestimulantes (MUKHERJEE et al., 2022; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009).

As espécies de Trichoderma sp. são popularmente conhecidas por possuir um grande potencial no controle biológico de fitopatógenos por meio de técnicas como o micoparasitismo, onde ocorre uma competição por espaço, nutrientes e a produção de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários com ação antifúngica (VERMA et al., 2007; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). O convívio desses fungos com as raízes de plantas promove resistência sistêmica, estimulando o crescimento vegetal, por meio da modulação de vias hormonais (MUKHERJEE et al., 2022; VINALE et al., 2008).

O Trichoderma sp. vai muito além da sua função como agente de controle biológico, pois tem-se estudado sua capacidade de promover o crescimento de culturas agrícolas. Espécies como *T. harzianum* e *T. asperellum* são amplamente empregadas em bioformulações comerciais devido à sua eficácia e segurança ambiental (MASTOURI et al., 2012).

2.3. *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo Branco)

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças mais nocivas em culturas agrícolas, afetando mais de 600 espécies de plantas, incluindo feijão, girassol, soja, tomate, alface e algodão. Esse patógeno possui um ciclo de vida complicado, pois sobrevive no solo por meio de escleródios, que são estruturas de resistência que podem permanecer viáveis por anos. Em condições favoráveis, como alta umidade e temperaturas amenas, os escleródios germinam e produzem apotécios, que liberam ascósporos responsáveis pela infecção das plantas hospedeiras (ZHU et al., 2024).

A infecção por *S. sclerotiorum* ocorre durante a floração das plantas, quando os ascósporos colonizam tecidos senescentes, como pétalas, e posteriormente invadem os tecidos saudáveis. Os sintomas incluem a perda do viço, lesões aquosas e crescimento de micélio branco e cotonoso, seguido pela formação de escleródios pretos nas áreas infectadas (MURILLO-WILLIAMS, 2023).

O controle do mofo branco é desafio para os agricultores, pois devido à ampla gama de hospedeiros do patógeno e à sua alta capacidade de sobrevivência no solo.

Algumas estratégias adotadas por produtores no manejo incluem práticas culturais, como fazer uma rotação de culturas e um espaçamento adequado entre plantas, aplicação de fungicidas químicos e uso de agentes de controle biológico (BAYER, 2024). Recentemente, abordagens inovadoras, como o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) e o uso de nanomateriais, têm mostrado potencial no controle da doença (AJIBOYE et al., 2025).

2.4. *Azadirachta indica* (Neem)

O óleo de neem é extraído das sementes da árvore *Azadirachta indica*, que tem sido utilizado na agricultura devido às suas propriedades inseticidas, fungicidas e repelentes (NPIC, 2023). Seu principal composto ativo é a azadiractina, um limonoide que atua como um regulador de crescimento em diversas pragas agrícolas, interferindo no desenvolvimento hormonal dos insetos e dificultando sua alimentação e reprodução (ARICO-ORGANICS, 2024).

A azadiractina não é o único bioativo do óleo de neem, ele contém a nimbina, salanina e azadirona, que também apresentam propriedades medicinais e pesticidas, apresentando também atividades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2016), sendo aplicados em sua maioria na medicina tradicional para tratamento de infecções e doenças crônicas (KUMAR et al., 2016).

Na agricultura, o óleo de neem é considerado um biopesticida eficiente e sustentável, ele atua contra algumas espécies de pragas, possui uma baixa toxicidade para outros microrganismos, tais como abelhas e mamíferos (ZAKARI et al., 2023). O uso do óleo de neem tem sido estudado e utilizado como uma nova alternativa ao controle químico convencional, sendo um composto mais sustentável e igualmente eficaz no manejo integrado de pragas em cultivos orgânicos (NIM BRASIL, 2024).

Entretanto, pesquisadores e produtores vêm enfrentando alguns desafios com o uso do óleo de neem, por ser um composto sensível à luz, levando a sua degradação e também sua volatilidade, que podem comprometer sua eficácia em campo. Estudos recentes abordam o óleo de neem concentrado em uma nano e/ou micro formulação, utilizando emulsões e nanopartículas para melhorar sua estabilidade e assim prolongando sua ação nos sistemas agrícolas (OYEGUE et al., 2025).

2.5. Pectina

A pectina é um polissacarídeo estrutural encontrado nas paredes celulares de frutos, principalmente os cítricos e maçãs, com vasta aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, biomédica e, mais recentemente, na agricultura (XIANG et al., 2023). Quimicamente, é composta por unidades de ácido D-galacturônico e classificada em pectinas de alto metoxil (HM) e baixo metoxil (LM), de acordo com o grau de metoxilação. Pectinas HM formam géis em presença de açúcar e ácido, enquanto pectinas LM formam géis na presença de íons cálcio, sendo ideais para produtos com menor teor de açúcar (MELTON et al., 2013)

Atualmente, a pectina tem sido alvo de pesquisas com seu uso como biomaterial em formulações agrícolas, atuando como agente encapsulante e transportador de compostos bioativos, como biopesticidas e microrganismos benéficos. Possui uma característica de formar géis e filmes permitindo que obtenha um maior controle da liberação de ativos, aumentando também a proteção das formulações contra condições ambientais adversas e prolongando sua estabilidade e eficácia no campo (TANASSI et al., 2022).

A pectina também vem sendo estudada para encapsulação de óleos essenciais e microrganismos como o caso do *Trichoderma spp.* e *Bacillus spp.*, pois ela proporciona uma liberação gradual dos ativos, a adesão à superfície vegetal e maior estabilidade ambiental (LI et al., 2021).

2.6. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural obtido por meio da desacetilação da quitina, um dos principais componentes estruturais do exoesqueleto de crustáceos e das paredes celulares de alguns fungos (CHOUHAN et al., 2022). Sua estrutura química é composta por unidades de D-glucosamina, que conferem à molécula propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e capacidade de formar filmes e géis (VALENCIA-GÓMEZ, 2023).

Em aplicações agrícolas, a quitosana tem se destacado como um biopolímero multifuncional. É considerada um indutor natural de resistência em plantas, capaz de ativar mecanismos de defesa contra patógenos e estimular o crescimento vegetal, pois tem a capacidade de ativar genes relacionados a metabolitos secundários e a produção de enzimas importantes (YANG et al., 2023).

Além disso, a quitosana apresenta atividade antifúngica e antibacteriana direta, inibindo o crescimento de diversos fitopatógenos. Estudos apontam que sua aplicação na forma de filmes, revestimentos ou soluções pode reduzir a incidência de doenças causadas por fungos como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.* e *Botrytis cinerea* (CHOUHAN et al., 2022).

Outro destaque da quitosana na agricultura é seu uso como carreadora de ativos em formulações de liberação controlada. Ela pode ser utilizada para encapsular fertilizantes, pesticidas naturais, óleos essenciais ou microrganismos benéficos, como *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*, proporcionando proteção aos compostos e liberação gradual no ambiente, melhorando a eficácia do insumo, reduzido sua degradação e minimizando os impactos ambientais (LI et al., 2021).

Yang et al. (2023) demonstraram que nanopartículas de quitosana incorporadas a fertilizantes aumentaram a eficiência do uso de nitrogênio pelas plantas, reduzindo a necessidade de aplicação de fertilizantes sintéticos em até 30%. Já Li et al. (2021) relataram maior viabilidade e atividade de microrganismos encapsulados em quitosana durante a aplicação no solo, o que reflete em melhor colonização da rizosfera e aumento na produtividade agrícola.

2.7. Goma de Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo produzido por fermentação bacteriana, especialmente pela bactéria *Xanthomonas campestris*. É composta por uma cadeia principal de D-glicose com ramificações laterais contendo manose e ácido glucurônico, além de grupos acetila e piruvato. Essas características estruturais conferem à goma xantana alta viscosidade, estabilidade térmica e resistência a variações de pH, conferindo proteção ao ingrediente ativo, prolongando sua estabilidade no ambiente, promovendo a eficácia (BERNINGER et al., 2021). Hidrogeis à base de goma xantana têm sido desenvolvidos como matrizes para fertilizantes de liberação lenta, contribuindo para o uso mais eficiente de nutrientes pelas plantas (FENG et al., 2014).

2.8. Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)

O Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) é um parâmetro essencial na formulação de emulsões, especialmente em sistemas óleo/água. Ele determina a

afinidade de um tensoativo com as fases aquosa e oleosa, sendo crucial para a estabilidade e eficácia das emulsões. Tensoativos com EHL entre 8 e 18 são indicados para emulsões do tipo óleo em água (O/A), comuns em formulações agrícolas, pois facilitam a dispersão de compostos lipofílicos em meios aquosos, aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade (LUDGERO; CAMPOS, 2024).

O Polissorbato 80, também conhecido como Tween 80, é um tensoativo não iônico com EHL em torno de 15, sendo amplamente utilizado em formulações agrícolas, alimentícias e farmacêuticas. Sua eficácia na estabilização de emulsões óleo/água o torna uma escolha comum para a dispersão de compostos lipofílicos em meios aquosos (CHEM-IMPEX INTERNATIONAL, 2023).

2.9. Coacervação

A coacervação é um processo físico-químico caracterizado pela separação de fases em sistemas coloidais, no qual se forma uma fase rica em polímeros (fase coacervada) e outra pobre (fase contínua). Tal fenômeno ocorre como resultado de interações não covalentes, tais como forças eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals entre macromoléculas em solução (PENG et al., 2024). A técnica é amplamente empregada em microencapsulação devido à sua simplicidade, versatilidade e capacidade de preservar compostos bioativos sensíveis (ZHANG et al., 2023).

2.9.1. Conservação simples

Na coacervação simples, a separação de fases é promovida por uma única macromolécula, geralmente um polímero natural como a gelatina, cuja solubilidade pode ser modificada por alterações no pH, temperatura ou força iônica da solução (DE KRUIF; TUINIER, 2012). Ao atingir condições críticas, essas macromoléculas se agregam e se separam da fase contínua, formando gotas coacervadas que podem encapsular o material desejado. Tal abordagem é considerada eficiente, porém limitada pela menor estabilidade da cápsula resultante (PENG et al., 2024).

2.9.2. Coacervação Complexa

A coacervação complexa envolve a interação entre macromoléculas de cargas opostas, como proteínas e polissacarídeos, levando à formação de agregados

polieletrolíticos e posterior separação de fases. Essa técnica tem sido amplamente aplicada na microencapsulação de compostos bioativos (SINGH et al., 2024; NAPIÓRKOWSKA et al., 2022). A natureza das interações eletrostáticas confere ao sistema sensibilidade ao pH, o que pode ser vantajoso em aplicações que demandem liberação controlada (DE KRUIF; TUINIER, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar uma nova formulação baseada no processo de coacervação complexa e emulsificação contendo esporos de Trichoderma sp. e óleo de neem.

3.2. Objetivos Específicos

- Encapsular os conídios de Trichoderma sp. em uma matriz polimérica
- Avaliar os efeitos do óleo de neem aos isolados de Trichoderma sp
- Determinar a eficiência do óleo de neem, ao combate ao mofo branco
- Avaliar as propriedades físico-químicas da formulação
- Avaliar a concentração de unidades formadoras de colônias da formulação
- Avaliar o antagonismo das formulações ao combate ao mofo branco

4. MATERIAIS E METODOS

4.1. Repique dos microrganismos

4.1.1. Obtenção de escleródios de mofo branco

Os escleródios de mofo branco foram doados pelo Laboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais (LABITON) da Universidade de Sorocaba – UNISO. Foram então cultivados em meio cultura solido, BDA (Batata Dextrose Agar), por 10 dias a 27± 3°C na incubadora BOD (Biochimical Oxygen Demand).

4.1.2. Obtenção dos conídios de Trichoderma sp

A cepa IB19/17 de Trichoderma sp. foi obtida através de parceria com o Instituto Biológico - Centro Avança de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária de Campinas/SP. O repique da cepa foi realizado em meio de cultura BDA, pela técnica de picada central na placa, e incubada por 7 dias a temperatura de 27°C ± 3°C.

4.2. Avaliação da biológica na presença do óleo de Neem

4.2.1. Avaliação de desenvolvimento micelial dos fungos

O protocolo para avaliação da bicompatibilidade entre o fungo e o óleo foi adaptado dos testes realizado por Budha et al. (2022). O óleo de neem (produto comercial com 2900 ppm e 414 ppm de zadirachta A e B respectivamente) foi emulsionado com 1% de Tween 80 em meio de cultura BDA, antes do ciclo de esterilização com autoclave. Após a esterilização com auxílio de um tubo Falcon de 50mL, foi vertido 20mL do meio BDA+N por placa de petri (90x15mm).

Como forma de avaliar o efeito no desenvolvimento dos fungos, foram utilizadas diferentes concentrações de óleo de neem, sendo: N1 – 5%, N2 – 2,5%, N3 – 1,25%, N4 – 0,625% e N5 – 0,312%. Foram então inoculados com uma a alça de 1uL, micélios e conídios dos fungos de interesse, em triplicata, pela técnica de picada central. As placas foram levadas a incubadora BOD a temperatura de 27°C ± 3°C, e o crescimento micelial foi mensurado pelo diâmetro da colônia em milímetros com auxílio do software ImageJ, diariamente pelo período de 10 dias. Após esse período

foi realizado também uma análise comparativa entre os histogramas de intensidade da cor verde, característica do fungo Trichoderma sp., medida na faixa de 0 a 255, das imagens dos tratamentos. A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software OriginPro 8.5.

4.3. Produtos Formulados

4.3.1. Formulação biopolimérica contendo conídios (PXQ)

O protocolo para a formulação foi realizado com base Barroso (2022); e Zabot (2022) com algumas adaptações. Os conídios de trichoderma sp. foram extraídos das placas repicadas conforme descrito no item 4.1, com uma solução com 0,05% de Tween 80, 10mL desta suspenção foi adicionada a 20 mL de uma solução de goma de xantana a 0,3% (pH ajustado para 4,5 com uma solução de ácido cítrico a 2%) sob agitação de 600rpm. Após completa dissolução foi adicionado 40mL solução de pectina cítrica a 0,7% (pH ajustado para 4,5), ainda sob agitação por 5 minutos. Para a formação dos coacervados complexos, 30 mL de uma solução com 0,3% de quitosana – polissacarídeo catiônico, preparada com 0,4% de ácido acético, foi adiciona vagarosamente a mistura contendo os conídios e a combinação dos polímeros aniônicos (Xantana + Pectina), e mantida sob agitação contínua por 15 minutos a 750 rpm.

4.3.2. Formulação com óleo de Neem (PXQN)

O preparo da formulação contendo óleo de neem acontece pelo mesmo processo citado no tópico 4.3.1 acima, com alteração na quantidade de xantana para 18 mL e ordem da mistura dos componentes. Onde 2 mL do o óleo (contendo 1% de Tween 80), é misturado lentamente a solução antes da adição da solução de quitosana.

4.4. Caracterização físico-química

4.4.1. Análise de pH

O pH é uma das análises mais comuns de controle de qualidade, especialmente por sua importância na caracterização físico-química de substâncias. Essa análise é

realizada por meio de um equipamento chamado pHmetro, que mede a atividade dos íons hidrogênio (H^+) em solução. O funcionamento do pHmetro baseia-se em um eletrodo sensível ao pH acoplado a um sistema de referência, onde a diferença de potencial gerada é convertida em valores numéricos na escala de 0 a 14, conforme padronização internacional (ATLAS SCIENTIFIC, 2023).

Durante a análise, é essencial que a medição seja realizada em condições controladas, especialmente quanto à temperatura, visto que o pH é influenciado por variações térmicas. Como forma de avaliar a estabilidade, ambas as formulações foram avaliadas sob três diferentes temperaturas, sendo 5; 25; e 36°C pelo período de 30 dias, utilizando um pHmetro da marca Mettler Toledo, modelo SevenCompact Duo. Esse equipamento oferece precisão analítica e confiabilidade, sendo amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa e controle de qualidade, possuindo calibração automática, compensação de temperatura e visualização digital dos dados (METTLER TOLEDO, 2023).

4.4.2. Análise de Viscosidade

A determinação da viscosidade foi realizada com um viscosímetro digital da marca Brookfield, modelo LV DV2T, utilizando o spindle número 62, como forma de avaliar a estabilidade, as amostras das formulações PXQ e PXQN foram avaliadas sob três diferentes temperaturas, sendo 5; 25; e 36°C pelo período de 30 dias. O equipamento opera segundo o princípio rotacional, em que o torque necessário para girar um eixo (spindle) imerso no fluido é correlacionado com a viscosidade. Quanto maior a resistência ao movimento do spindle, maior a viscosidade registrada. O sistema eletrônico do modelo LV DV2T permite a leitura direta em cP (centipoise) e oferece ajuste automático de velocidade e torque, garantindo precisão nos dados obtidos (BROOKFIELD AMETEK, 2023).

4.4.3. Análise de Densidade

A densidade é uma propriedade físico-química fundamental que expressa a razão entre a massa de uma substância e o seu volume, sendo amplamente empregada para caracterização e controle de qualidade de líquidos. Tradicionalmente, essa medida era realizada por métodos manuais como o picnômetro ou o densímetro

de vidro, mas, com os avanços tecnológicos, dispositivos automáticos têm sido adotados por sua precisão e rapidez (METTLER TOLEDO).

A determinação da densidade foi realizada por meio de um densímetro digital da marca Anton Paar, para avaliar a estabilidade as amostras foram colocadas sob as mesmas condições citadas dos tópicos 4.6.2 e 4.6.3; operando a uma temperatura controlada de 25 ºC. O equipamento funciona com base na oscilação de um tubo em forma de U, preenchido com a amostra líquida. A frequência da oscilação do tubo varia conforme a densidade do líquido inserido, e o valor final é automaticamente convertido e apresentado em unidades como g/cm³ ou kg/m³, com altíssima precisão e repetibilidade (ANTON PAAR, 2024).

4.4.4. Análise de Microscopia

A avaliação microscópica é essencial para a caracterização morfológica dos conídios e até mesmo dos coacervados presentes nas formulações contendo óleo de neem, foi realizada uma análise microscópica utilizando um microscópio óptico de luz com sistema UIS (Universal Infinity System), equipado com objetiva de 40x, 100x e ocular de 10x. A amostragem foi conduzida por meio da câmara de contagem tipo Neubauer melhorada espelhada, com área individual de 0,0025 mm², profundidade de 0,100 mm, contendo uma câmara e duas lamínulas por caixa.

Assim como nas análises microscópicas descrita por Bentes (2023), a formulação foi homogeneizada manualmente por agitação suave e, em seguida, coletou-se 10 µL da amostra com auxílio de uma micropipeta estéril. Essa alíquota foi cuidadosamente depositada sobre a câmara de Neubauer previamente montada com a lamínula. Após a sedimentação por cerca de 1 minuto, a amostra foi analisada sob luz branca incidente, sem coloração, a fim de preservar a estrutura original dos coacervados.

4.5. Teste Biológicos

4.5.1. Análise de Concentração

Para avaliar a concentração de produtos formulados com Trichoderma sp. o protocolo foi adaptado do Manual de Análises de Bioinsumos Para Uso Agrícola: Inoculantes descrito por Ferreira (2024). Foi realizado a diluição seriada das amostras

em uma solução estéril de Tween 80 a 0,05% por diluições decimais sucessivas, até alcançar a diluição 10^{-7}. Em seguida, 100 µL das duas últimas diluições (10^{-6} e 10^{-7}) foram semeadas em duplicata no meio cultivo seletivo Ágar Base Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), com 0,1% de antibiótico Cloranfenicol e 0,002% de Dicloran conforme indicado nas especificações do fabricante (Kasv), para inibir o crescimento bacteriano e diminuir o crescimento fúngico para facilitar a contagem respectivamente. As placas foram então levadas a incubadora BOD a 27 $\pm$ 3°C por 4 dias. Após esse período, as colônias com características morfológicas típicas de Trichoderma sp. foram contadas e se obteve o resultado de unidades formadoras de colônias (UFC) através da seguinte equação.

Equação 1:

$$\mathbf{C = \frac{N}{A}\ x\frac{1}{F}}$$

Sendo:

C – Concentração em UFC/mL.

N – Média do número de colônias contadas nas placas.

A – A alíquota (quantidade da amostra diluída). Ou seja: 100/1000 = 0,1mL.

F – Fator de diluição.

4.5.2. Teste de Antagonismo *in vitro*.

Com o objetivo de avaliar a eficácia das formulações frente ao agente biológico causador da podridão do caule, foi conduzido dois testes de antagonismo em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). O protocolo deste teste foi adaptado de protocolos convencionais para teste de antagonismo entre espécies de fungos, como apresentado por De Conto et al. (2021), onde foram pipetados 10 µL diluída cem vezes (10^{-2}) conforme descrito no tópico 4.5.1, e uniformemente espalhado com o auxílio de uma alça de espalhamento estéril. Em uma outra placa foi pipetado 10 µL da formulação pura no centro da placa de petri, sem a realização de espalhamento. Sob ambas as condições de tratamento, foram então dispostos cinco escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* cuidadosamente posicionados sobre a superfície do meio

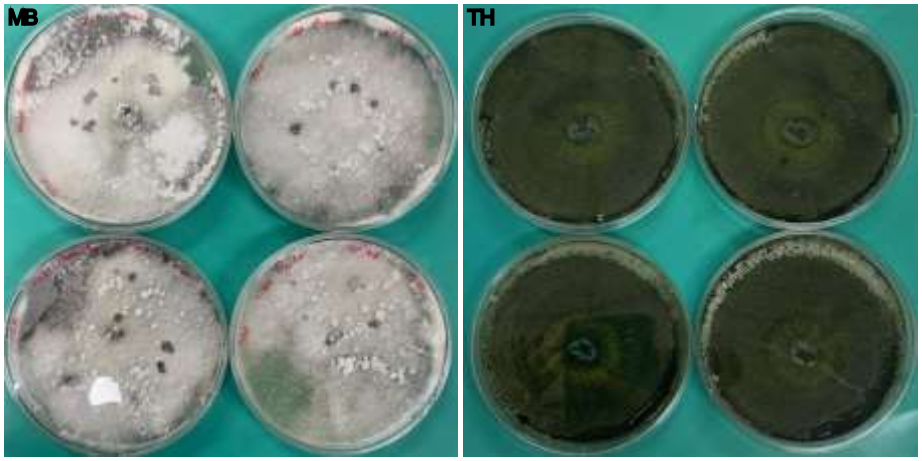
tratado. Uma suspenção de conídios do fungo foi preparada com solução de 0,05% de Tween para servir como controle, inspeções visuais foram realizadas após o período de 10 dias de crescimento dos fungos, com base nos testes de avaliação de desenvolvimento micelial citado neste trabalho (tópico 4.2.1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Repique dos microrganismos

Na fase inicial do experimento, tanto o patógeno (*Sclerotinia sclerotiorum*) quanto o fungo antagonista (*Trichoderma* sp.) apresentaram bom desenvolvimento em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), sob condições controladas de 27 ± 3 °C.

Figura 1 - Repique dos microrganismos alvos do estudo em meio BDA. Sendo: MB – Mofo branco; e TH – Trichorderma sp.



Fonte: Elaboração própria.

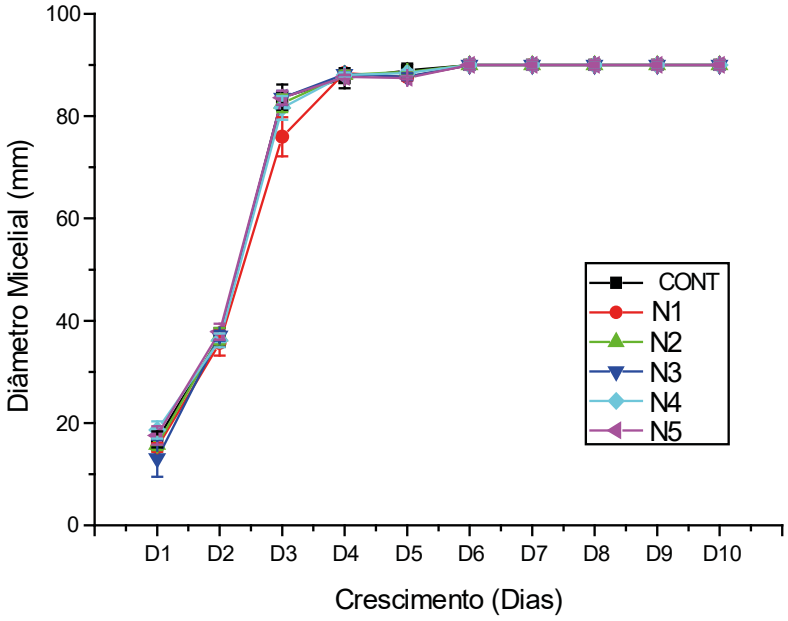
Os escleródios do patógeno germinaram de forma consistente, com desenvolvimento completo sobre a superfície da placa e de novos escleródios após o décimo dia de incubação, enquanto o repique da cepa IB19/17 foi realizado com sucesso por meio da técnica de picada central, obteve desenvolvimento completo de forma vigorosa ao longo dos 7 dias de incubação, o que evidencia a alta atividade metabólica e a vitalidade da cepa. Esses resultados confirmam a estabilidade das condições de cultivo e a capacidade competitiva do antagonista frente a outros microrganismos, o que é fundamental para sua aplicação como agente de biocontrole.

5.2. Avaliação Biológica na presença do óleo de Neem

O experimento realizado serviu para avaliar os efeitos do óleo de neem sobre o crescimento da cepa IB 19/17, demonstrando a biocompatibilidade entre ambos. Ao

longo do ensaio, as colônias dos tratamentos e do controle apresentaram crescimento micelial moderado e uniforme, alcançando a ocupação total da área da placa (9 cm de diâmetro) entre o terceiro e o quarto dia de incubação (Gráfico 1). Embora o tratamento N1 tenha exibido uma leve variação no crescimento no terceiro dia, os resultados indicam que o óleo de neem não exerceu efeitos inibitórios significativos sobre a cepa avaliada, consistente com os achados de Budha et al., (2022).

Gráfico 1 - Crescimento micelial do Trichoderma sp. Sendo: Controle: cultivo em meio BDA sem a adição do óleo de neem; N1: meio com 5% de óleo; N2: meio com 2,5% de óleo; N3: meio com 1,25% de óleo; N4: meio com 0,625% de óleo; e N5: meio com,312% de óleo.



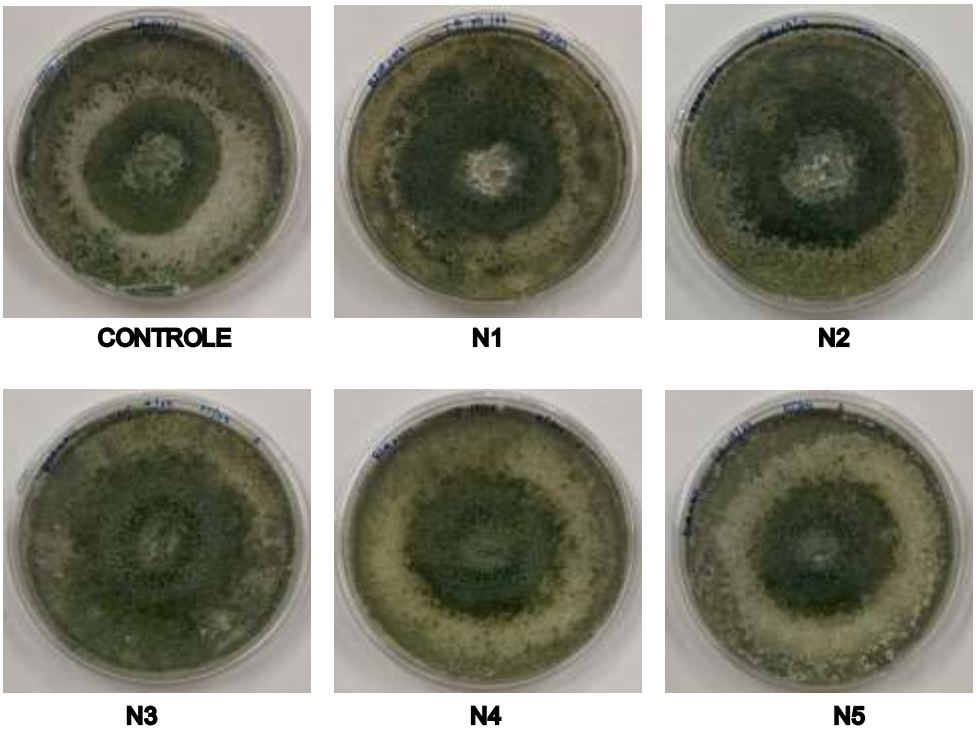
Fonte: Elaboração própria

Inspeções visuais realizadas após o crescimento completo da cepa IB19/17 indicaram que a esporulação do fungo, caracterizada pela coloração verde intensa, embora visível no grupo controle, foi levemente inferior à observada em alguns dos tratamentos testados. Dessa forma, o controle serve como parâmetro basal para a formulação do produto e comparação da eficiência dos demais tratamentos (Figura 2). A capacidade esporogênica do *Trichoderma* spp. está diretamente relacionada à sua eficácia como agente de biocontrole em condições naturais, visto que a dispersão e colonização dependem essencialmente da produção eficiente de conídios. De acordo com Gazola et al. (2024), a esporulação é um dos principais fatores que determinam

o sucesso do fungo na ocupação e na competição com fitopatógenos, sendo influenciada tanto por fatores genéticos quanto pelas condições ambientais e nutricionais presentes no meio de cultivo.

Os estudos conduzidos por Mukherjee et al. (2022) destacam que as interações planta-fungo em períodos prolongados de tempo, pode desencadear fatores estressores leves, intensificando a expressão de genes relacionados ao micoparasitismo e a reprodução fúngica. Portanto, a maior intensidade de esporulação observada em determinados tratamentos pode indicar uma resposta adaptativa favorável aos compostos terpenoides presentes no óleo de neem, refletindo um potencial incremento na performance do biocontrole.

Figura 2 - Desenvolvimento de Trichoderma sp. após 10 dias de crescimento. Sendo: Controle: cultivo em meio BDA sem a adição do óleo de neem; N1: meio com 5% de óleo; N2: meio com 2,5% de óleo; N3: meio com 1,25% de óleo; N4: meio com 0,625% de óleo; e N5: meio com 0,312% de óleo.



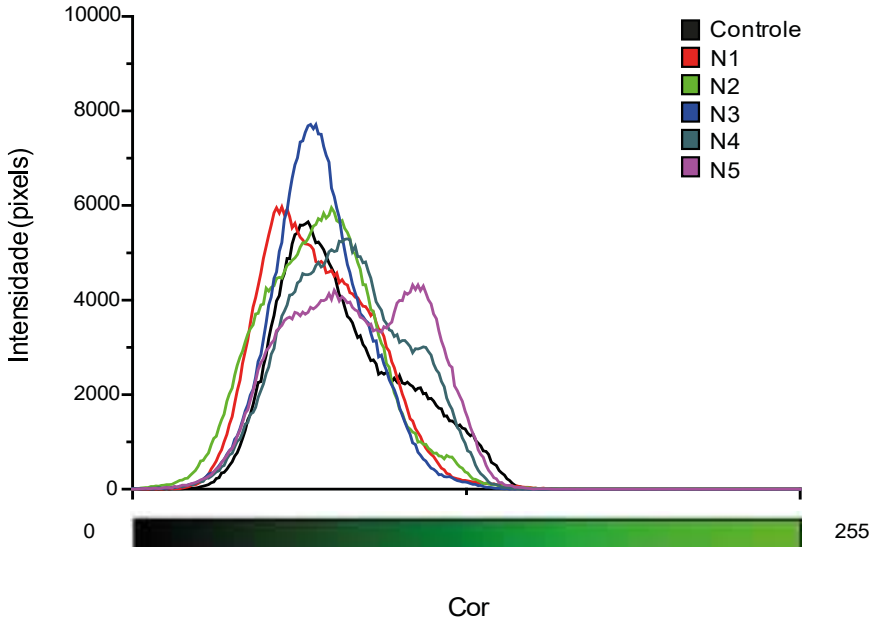
Fonte: Elaboração própria.

Nos tratamentos N1, N2 e N3, observou-se uma coloração mais intensa na região central (Gráfico 2), com zonas concêntricas de esporulação densa, sendo o N3 com a maior delas. O diâmetro das colônias aparenta ser semelhante ou levemente

superior ao do controle, o que sugere que esses tratamentos estimularam a esporulação sem necessariamente acelerar significativamente o crescimento radial. Esse comportamento pode estar associado à ativação de mecanismos fisiológicos e respostas adaptativas voltados à reprodução fúngica, possivelmente em resposta a componentes nutricionais, metabólitos secundários ou estresses leves que favorecem a esporogênese (Bansal et al., 2019).

Já no tratamento N4 e N5, a colônia apresenta características morfológicas muito próximas às do controle, tanto em termos de coloração quanto de diâmetro. Isso sugere que esse tratamento teve efeito neutro sobre o desenvolvimento fúngico, sem promover nem inibir o crescimento ou a esporulação.

Gráfico 2 – Histograma de intensidade de cor das placas de Trichoderna sp.

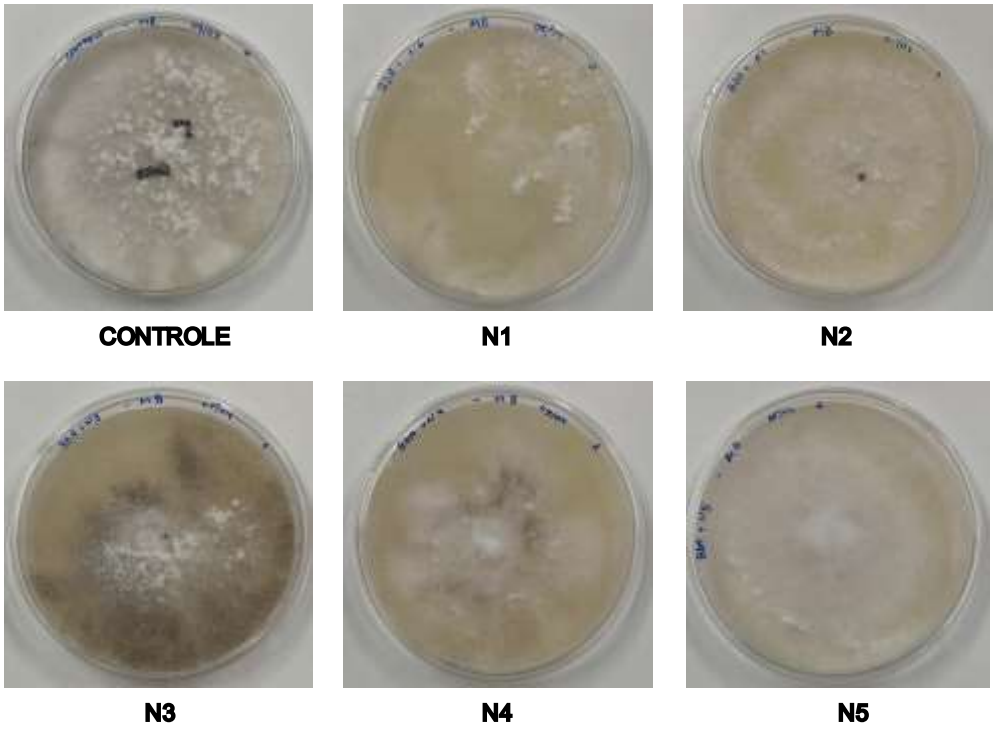


Fonte: Elaboração própria.

Durante os testes não foi possível mensurar com precisão o crescimento micelial diário do mofo branco como foi realizado para o IB 19/17. Essa limitação foi atribuída, principalmente, à morfologia do próprio fungo, cujas hifas apresentam espessura extremamente fina e pouco pigmentada, dificultando a delimitação clara das bordas da colônia. Além da turbidez característica do meio BDA emulsionado com óleo de neem que contribuiu para uma visibilidade reduzida, dificultando a diferenciação entre o micélio do patógeno e o fundo do meio de cultura. Diante disso,

inspeção visual após o decimo dia de crescimento foi realizada comparando os tratamentos com o grupo controle (Figura 3).

Figura 3 - Desenvolvimento de *Scleotinia sclerotiorum* após 10 dias de crescimento. Sendo: Controle: cultivo em meio BDA sem a adição do óleo de neem; N1: meio com 5% de óleo; N2: meio com 2,5% de óleo; N3: meio com 1,25% de óleo; N4: meio com 0,625% de óleo; e N5: meio com 0,312% de óleo.



Fonte: Elaboração própria.

A avaliação visual realizada no décimo dia de incubação demonstrou uma inibição significativa no desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, especialmente no tratamento com maior concentração de óleo de neem (N1), em comparação ao grupo controle. No entanto, observações realizadas entre o décimo primeiro e o décimo quinto dia indicaram que, apesar da inibição inicial, houve desenvolvimento completo do fitopatógeno, incluindo a formação de novos escleródios. Esses achados corroboram os resultados apresentados por Queiroz et al. (2020), os quais demonstraram que extratos e óleos essenciais, incluindo o de neem, possuem ação antifúngica variável sobre *S. sclerotiorum*. Contudo, a recuperação do crescimento do patógeno após 10 dias evidencia a limitação da ação direta do óleo, reforçando a

importância da associação com agentes biológicos como Trichoderma sp., que atuam de forma complementar através de micoparasitismo ativo.

5.3. Produtos Formulados

As formulações avaliadas, com e sem a adição de óleo de neem, apresentaram boa estabilidade física ao longo do período de observação. Em temperatura ambiente, ambas permaneceram estáveis por mais de 30 dias, sem apresentar separação de fases, o que indica uma emulsificação eficiente e potencial viabilidade para aplicações em condições reais de armazenamento e uso.

Figura 3 - Imagem das formulações com e sem óleo de neem, acondicionadas em frascos de 250mL de polietileno branco.

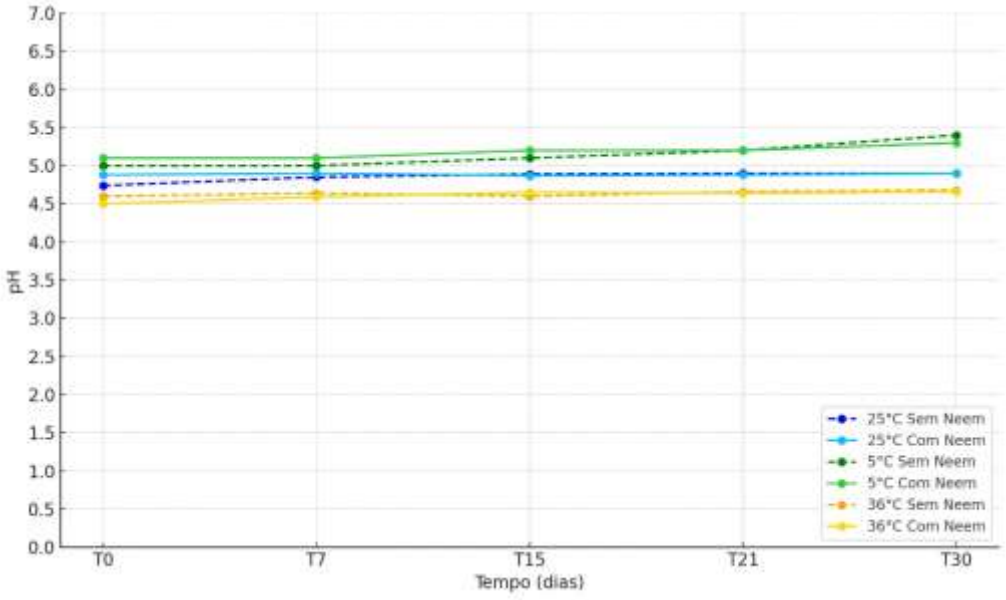
Fonte: Elaboração própria.

Contudo, foi identificada a formação de pequenos aglutinados no período de repouso logo após a produção. Essa aglutinação pode estar relacionada à interação entre os polímeros empregados na formação dos coacervados, o que indica a necessidade de alguns ajustes na formulação como a concentração dos polímeros, ou no processo de produção com o aumento da agitação e do tempo homogenização. Apesar disso, dispersão dos constituintes também se manteve estável, sugerindo uma boa compatibilidade entre os componentes da mistura e reforçando o potencial dessa substância como adjuvante natural em formulações biotecnológicas.

5.4. Avaliação Físico-química das Formulações

A avaliação do pH nas formulações com óleo de neem evidenciou estabilidade ao longo dos 30 dias, mantendo-se predominantemente em uma faixa levemente ácida, entre 4,5 e 5,4, dependendo da condição de armazenamento e presença do óleo (Gráfico 3). Este resultado é considerado satisfatório para formulações agrícolas, uma vez que o pH entre 4,0 e 6,0 é recomendado para aplicações em culturas suscetíveis a doenças fúngicas, pois inibe o desenvolvimento de fitopatógenos como o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), que apresenta maior agressividade em ambientes com pH próximo da neutralidade (Gomes et al., 2020). Segundo Costa, Santos e Ricci Júnior (2023), a manutenção do pH em emulsões contendo óleo de neem contribui diretamente para a preservação da estabilidade da formulação e da integridade química de compostos bioativos como a azadiractina, sensível a pH extremos.

Gráfico 3 – Estabilidade do pH dos formulados em diferentes temperaturas ao longo de 30 dias.



Fonte: Elaboração própria.

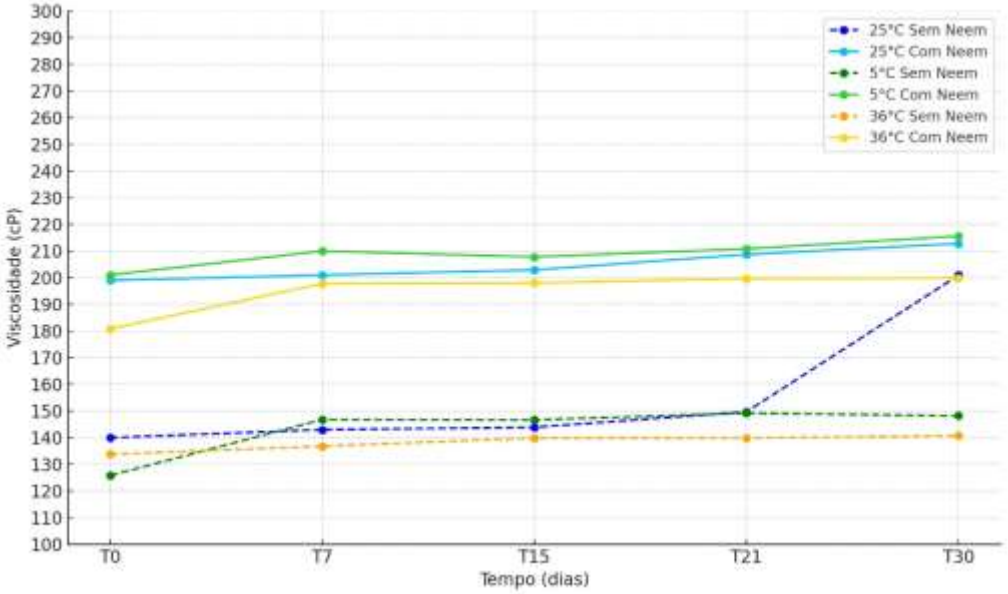
Além disso, estudos de Frange e Garcia (2009) demonstraram que emulsões óleo/água, ao manterem pH próximo a 5,0 favorecem a compatibilidade com bioinsumos microbiológicos, como Trichoderma spp., que possui ótimo desempenho

em meios levemente ácidos, com pH entre 4,5 e 6,0 (Freitas et al., 2020). Dessa forma, as formulações avaliadas neste estudo apresentam potencial de aplicação conjunta de óleo de neem e Trichoderma, ampliando seu espectro de ação e mantendo condições ideais tanto para o controle direto do mofo branco quanto para o estabelecimento do agente biológico.

Por fim, a estabilidade do pH observada, especialmente em ambientes refrigerados e à temperatura ambiente, reforça a robustez das formulações frente às variações de armazenamento. Esse comportamento também foi descrito por Frange e Garcia (2009) ao avaliar emulsões óleo/água, destacando que a manutenção do pH em faixas levemente ácidas contribui para a estabilidade físico-química e performance do produto em diferentes condições de armazenamento.

A avaliação da viscosidade nas formulações contendo óleo de neem demonstrou um comportamento consistente ao longo dos 30 dias de análise. De forma geral, as formulações com neem apresentaram maior viscosidade em comparação com aquelas sem o óleo, com destaque para os armazenamentos a 5 °C e 25 °C (Gráfico 4). Esse resultado está em consonância com estudos como o de Costa, Santos e Ricci Júnior (2023), que relataram que emulsões contendo extrato de *Azadirachta indica* mostraram viscosidade elevada e estável em diferentes faixas de temperatura, conferindo maior consistência ao sistema. A viscosidade elevada pode estar associada à interação entre os compostos bioativos do neem (como azadiractina e nimbina) com os tensoativos e estabilizantes presentes na formulação, conforme sugerido por Santos (2022).

Gráfico 4 - Estabilidade da viscosidade dos formulados em diferentes temperaturas ao longo de 30 dias.



Fonte: Elaboração própria.

Outro aspecto relevante é a estabilidade da viscosidade ao longo do tempo. Mesmo após 30 dias, as formulações com neem mantiveram valores próximos dos iniciais, especialmente nas condições de 5 °C, o que pode indicar baixa taxa de degradação físico-química da emulsão e uma boa performance de estabilização promovida pelo óleo. Essa tendência foi também observada por Frange e Garcia (2009), que destacaram a importância do controle viscosimétrico em emulsões óleo/água, evidenciando estabilidade e resistência a processos físicos de degradação.

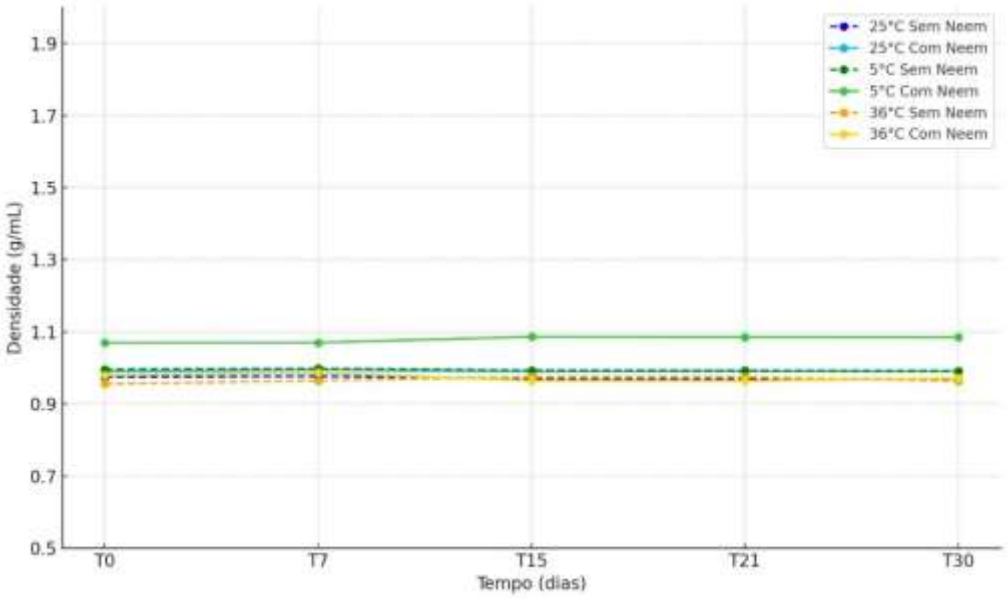
Além disso, a elevação da viscosidade nas amostras armazenadas a 36 °C com neem sugere que, mesmo em condições desfavoráveis, o sistema apresentou uma resposta compatível com estabilidade termorresistente. Rheonics (2020) destaca que a viscosidade é uma propriedade crucial em emulsões agrícolas, influenciando diretamente a adesão, a cobertura e a estabilidade do produto no campo. Portanto, os dados deste estudo reforçam a aplicabilidade do óleo de neem como componente funcional não apenas ativo, mas também estrutural em formulações emulsificadas de base aquosa e oleosa, conforme também discutido por Costa, Santos e Ricci Júnior (2023) e Santos (2022).

A análise da densidade das formulações contendo óleo de neem ao longo de 30 dias também demonstrou estabilidade consistente, com variações mínimas mesmo

sob diferentes condições de armazenamento. As formulações com neem apresentaram densidades consistentemente superiores às sem o óleo, indicando uma influência notável do neem na estrutura da emulsão (Gráfico 5). Esse comportamento está alinhado com os achados de Costa, Santos e Ricci Júnior (2023), que observaram que emulsões contendo extrato de *Azadirachta indica* mantiveram características físico-químicas estáveis ao longo do tempo, sugerindo uma contribuição do óleo de neem para a estabilidade do sistema.

Além disso, a densidade das formulações com neem permaneceu dentro de uma faixa adequada para produtos agrícolas de base aquosa, cuja densidade ideal varia entre 0,95 a 1,10 g/cm³, segundo Frange e Garcia (2009), o que é importante para garantir a uniformidade de aplicação e evitar sedimentação ou separação de fases durante o armazenamento e uso em campo.

Gráfico 5 - Estabilidade da densidade dos formulados em diferentes temperaturas ao longo de 30 dias.



Fonte: Elaboração própria.

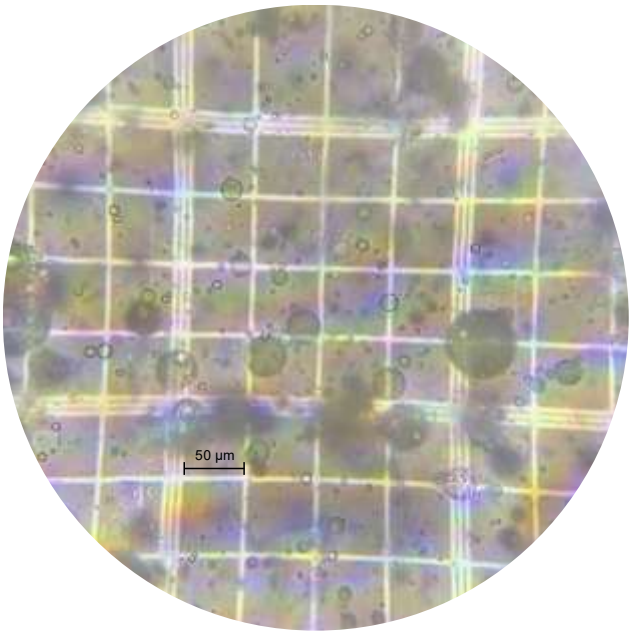
Por fim, os resultados obtidos corroboram a literatura existente, indicando que o óleo de neem é um componente valioso na formulação de emulsões estáveis. Sua presença contribui para a manutenção da densidade e, consequentemente, para a estabilidade geral do produto reforçando seu potencial como ingrediente funcional em

formulações agrícolas emulsificadas, conforme também discutido por Costa; Santos e Ricci Júnior (2023) e Rheonics (2020).

A análise microscópica revelou uma distribuição heterogênea de microgotículas com formato predominantemente esférico e tamanhos variados, majoritariamente entre 10 a 50 µm, o que é característico de sistemas coacervados obtidos por complexação entre polímeros naturais e compostos hidrofóbicos como o óleo vegetal (Figura 4).

A presença de estruturas dispersas, com agrupamentos localizados, sugere uma emulsificação eficiente, porém com indícios de instabilidade parcial, possivelmente relacionada à interação entre os polímeros encapsulantes e o óleo, que pode ser atribuída à complexidade química do óleo de neem, que interfere nas interações eletrostáticas entre os polissacarídeos coacervantes (Saberi-Riseh et al., 2021). Isso reforça os achados do tópico 5.3, que destaca a necessidade de ajustes nas proporções de xantana, pectina e quitosana, bem como na velocidade e tempo de agitação, podem melhorar a estabilidade da formulação.

Figura 4 - Análise microscópica da formação de coacervados da formulação PXQN, na câmara de Neubauer com aumento de 400X.

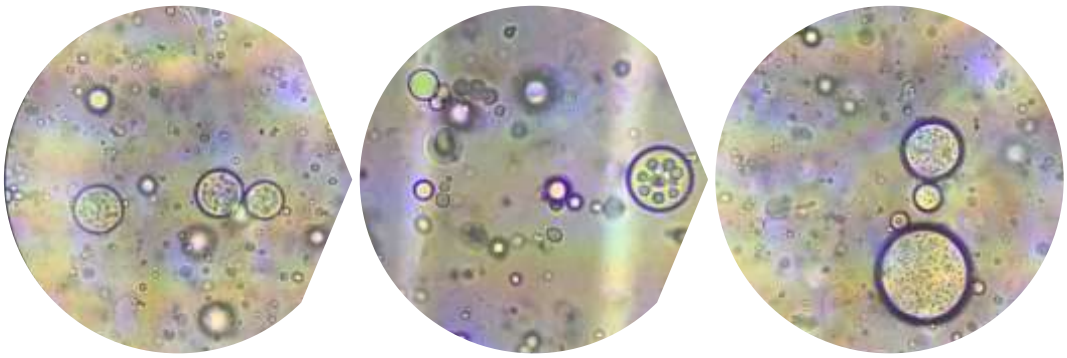


Fonte: Elaboração própria.

Os coacervados apresentam principalmente estruturas multinucleadas (Figura 5), os núcleos apresentam formato de estruturas esféricas, contendo em seu interior

tanto o óleo de neem como os conídios, protegendo-os contra degradação e promovendo liberação sustentada assim como descrito por Saberi-Riseh et al., 2022.

Figura 5 - Análise microscópica da formação de coacervados da formulação PXQN, aumento de 1000X.



Fonte: Elaboração própria.

5.5. Testes Biológicos

A concentração de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) dos diferentes formulados de Trichoderma sp. apresentaram uma pequena variação, porém consistente com o método de produção (Tabela 1). Observa-se que a suspensão de conídios (C), utilizada como parâmetro basal de controle em relação aos formulados, apresentou a maior concentração, com 1,85 x 10^8 UFC/mL, seguida pela formulação sem óleo de neem (PQX), com 9,50 x 10^7 UFC/mL, e pela formulação encapsulada contendo óleo de neem (PQXN), com 5,50 x 10^7 UFC/mL.

Rembinski et al. (2022) destacam que concentrações adequadas de conídios viáveis são essenciais para a eficácia do controle biológico, uma vez que o sucesso da colonização do solo e a supressão de patógenos dependem diretamente da densidade inicial de propagação. Em seus experimentos de campo, o *Trichoderma* foi aplicado à taxa de 10^9 UFC/ha, demonstrando redução no progresso da doença e aumento da colonização do solo, mesmo sem detalhamento da concentração em UFC/mL. Da mesma forma, Chagas et al. (2022) utilizaram o produto comercial TrichoPlus, formulado em pó com *Trichoderma asperellum* a uma concentração mínima de 2 × 10^8 UFC/g, aplicado diretamente nas sementes antes do plantio.

Tabela 1 - Concentração dos formulados em unidades formadoras de colonia por mL. Sendo: C – Suspenção de conídios de Trichoderma sp.; PQXN – Formulação de encapsulados com óleo de neem; PQX – Formulação sem óleo de neem.

Amostras	Concentração
C	$1,85 \times 10^8$ UFC/mL
PQXN	$5,50 \times 10^7$ UFC/mL
PQX	$9,50 \times 10^7$ UFC/mL

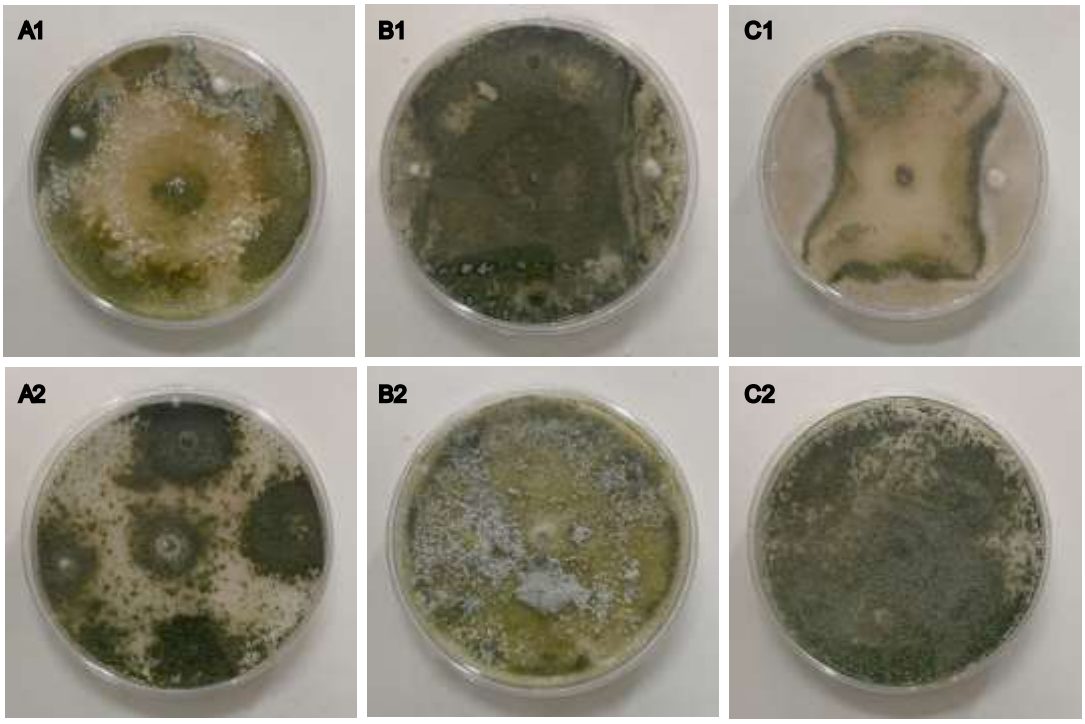
Fonte: Elaboração própria.

Os testes realizados com a formulação contendo Trichoderma spp. microencapsulado associada ao óleo de neem demonstraram efeito positivo na inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco (Figura 6). Para o tratamento C1, utilizado como parâmetro de controle, demonstra a capacidade já conhecida de antagonismo do IB 19/17 contra patógeno.

Contudo, os tratamentos A1 (com óleo de neem) e A2 (sem óleo de neem) apresentaram resultados significativamente superior em relação ao controle, indicando que a microencapsulação potencializa a ação do agente biológico. Este fato, possivelmente está associado com presença dos polissacarídeos poliméricos xantana, pectina e quitosana constituintes da formulação, que além de contribuir para a proteção e liberação sustentada dos esporos, pode ter auxiliado positivamente o Trichoderma sp. na produção de enzimas hidrolíticas e em mecanismo de micoparasitismo, como descrito por Rembinski et al. (2022).

Figura 6 – Avaliação do antagonismo e das propriedades de micoparasitismo de produtos formulados com Trichoderma sp., em comparação ao controle contendo apenas a suspensão de conídios do antagonista. Sendo: A1 – Inoculação por picada central com 10 µL da formulação contendo óleo de neem puro; A2 – Inoculação por espalhamento com 10 µL da formulação contendo óleo de neem diluído a 10^{-2}; B1 – Inoculação por picada central com 10 µL da formulação sem óleo de neem (pura); B2 – Inoculação por espalhamento com 10 µL da formulação sem óleo de neem,

diluída a 10^{-2}; C1 – Controle: picada central com 10 µL da suspensão de conídios; C2 – Controle: espalhamento com 10 µL da suspensão de conídios diluída a 10^{-2}.



Fonte: Elaboração própria.

Os tratamentos A2, B2 e C2 permitiram avaliar o desempenho do Trichoderma sp. em condições menor concentração (diluição 10^{-2}) e aplicação por espalhamento. O tratamento A2, que continha óleo de neem, demonstrou o melhor desempenho micoparasítico, evidenciado por regiões concêntricas de germinação e esporulação ao redor dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Essa organização sugere uma possível interação entre o óleo de neem com metabolismo secundário ainda em estudo do Trichoderma sp. envolvidos nos mecanismos de ação contra patógenos do antagonista conforme descrito por Dutta et al. (2023). Além de corroborar estudos citados por Zabot et al. (2022), que descreve uma resposta adaptativa do antagonista encapsulado em lignina, onde a germinação do fungo é desencadeada pelo próprio em condições favoráveis.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a microencapsulação de Trichoderma sp. em emulsão de óleo de neem, utilizando a técnica de coacervação complexa, é uma estratégia viável e potencialmente promissora para a prorrogação da vida útil de produtos líquidos formulados e para o controle biológico de fitopatógenos de grande significância para a agricultura. A formulação desenvolvida apresentou estabilidade físico-química satisfatória e a análise microscópica revelou que as características morfológicas dos coacervados foram adequadas, com dimensões semelhantes às observadas em formulações à base de emulsões com óleos.

Os testes biológicos demonstraram que ambas as formulações apresentaram alta eficiência no controle biológico do modelo patogênico estudado (*Sclerotinia sclerotiorum)*, reforçando a eficácia dos biopolímeros constituintes da formulação, assim como o óleo de neem, em promover uma melhora na eficiência do antagonista frente ao fitopatógeno. Contudo, apesar da formulação desenvolvida representar uma alternativa sustentável aos métodos convencionais de controle químico, potencializando os efeitos do agente biológico, é necessário realizar mais estudos para verificar a replicabilidade dos resultados em condições de campo e avaliar os efeitos da exposição prolongada à azadiractina na viabilidade dos conídios, a fim de confirmar a eficácia e estabilidade da formulação em ambientes agrícolas reais.

REFERÊNCIAS

AJIBOYE, T. O. et al. Recent strategies for controlling the white mould fungal pathogen (*Sclerotinia sclerotiorum*) using gene silencing, botanical fungicides and nanomaterials. **RSC Food & Function**, 2025. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/fb/d4fb00348a. Acesso em: 14 maio 2025.

ANTON PAAR. Densímetro Digital. Disponível em: https://www.anton-paar.com. Acesso em: 14 maio 2025.

ARICO-ORGANICS. Azadirachtin Sprays For Broad Spectrum Insect Control. 2024. Disponível em: https://www.arbico-organics.com/category/azadirachtin-insecticides. Acesso em: 14 maio 2025.

ATLAS SCIENTIFIC. *How to calibrate a pH meter?* 2023. Disponível em: https://atlas-scientific.com/blog/how-to-calibrate-ph-meter/. Acesso em: 20 maio 2025.

BARROSO, T. L. C. T. et al. Microencapsulamento de óleos fixos e voláteis por coacervação complexa: uma revisão. **ResearchGate**, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/364309737_MICROENCAPSULAMENTO_DE_OLEOS_FIXOS_E_VOLATEIS_POR_COACERVACAO_COMPLEXA_UMA_REVISAO. Acesso em: 16 maio 2025.

BANSAL, Ravindra et al. Regulation of conidiation and antagonistic properties of the soil-borne plant beneficial fungus Trichoderma virens by a novel proline-, glycine-, tyrosine-rich protein and a GPI-anchored cell wall protein. **Current Genetics**. 2019. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00294-019-00948-0. Acessado em: 14 maio 2025.

BAYER. Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Agro Bayer Brasil**, 2023. Disponível em: https://www.agro.bayer.com.br/doencas/mofo-branco. Acesso em: 14 maio 2025.

BENTES, V. S; et al. Atividade antimicrobiana produzida por fungos filamentosos isolados das águas do Baixo Rio Tapajós, Pará, Brasil. **Scientia Plena**, 2023. Disponível em: https://scientiaplena.org.br/sp/article/view/7082. Acesso em: 19 maio. 2025.

BERNINGER, T.; DIETZ, N.; GONZÁLEZ LÓPEZ, O. Water-soluble polymers in agriculture: xanthan gum as eco-friendly alternative to synthetics. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 1881–1896, 2021. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.13867. Acesso em: 14 maio 2025.

BROOKFIELD AMETEK. DV2T Viscometer. Disponível em: https://www.brookfieldengineering.com. Acesso em: 14 maio 2025.

BUDHA, C. B.; SHRESTHA, S. M.; MANANDHAR, H. K.; BAIDYA, S. Compatibilidade in vitro de alguns isolados nativos de Trichoderma spp. com pesticidas comumente usados. **Journal of the Plant Protection Society**, v. 7, n. 1, p. 114–122, 2022. DOI: 10.3126/jpps.v7i01.47295. Disponível em: https://nepjol.info/index.php/jpps/article/view/47295. Acesso em: 14 maio 2025.

CAMPOS, Estefânia V. R. et al. Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: Nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants. **Plant Science**, v. 331, p. 111688, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111688. Acesso em: 15 maio 2025.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOUZA, M. C. .; MARTINS, A. L. L. .; LIMA, C. A. .; SOUSA, K. Ângela O. de .; SANTANA, P. A. A. C. P. .; LOPES, M. B.; CHAGAS, L. F. B. . Efficiency of Trichoplus (Trichoderma asperellum) as a plant growth promoter in soybean in the Cerrado field. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. e16111527970, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i5.27970. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27970. Acesso em: 16 may. 2025.

CHEM-IMPEX INTERNATIONAL. Polysorbate 80 (Tween 80). **Chem-Impex**, 2023. Disponível em: https://www.chemimpex.com/products/01516. Acesso em: 14 maio 2025.

CHOUHAN, Divya et al. Application of nickel chitosan nanoconjugate as an antifungal agent for combating Fusarium rot of wheat. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14518, 2022. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-022-18670-2. Acesso em: 14 maio 2025.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. Ecological functions of Trichoderma spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, fiw036, 2016. Disponível em: https://academic.oup.com/femsec/article/92/4/fiw036/2197739. Acesso em: 14 maio 2025.

COSTA, M. C. P.; SANTOS, E. P.; RICCI JÚNIOR, E. Estudo da estabilidade de emulsão cosmética de uso externo à base de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 9, p. 26908–26923, 2023. Disponível em: https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/63358. Acesso em: 14 maio 2025.

DE CONTO, L. M.; COSTA, F. A.; DA COSTA, A. C.; ULHOA, C. J. Potencial de isolados de Trichoderma spp. nativos em controlar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e como promotor de crescimento na cultura da soja / Potential of natives Trichoderma spp isolates to control the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and as a growth promoter in soybean. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 30616–30632, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-673. Disponível em: https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/27037. Acesso em: 16 maio. 2025.

DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polyelectrolyte complex coacervation. Advances in Colloid and **Interface Science**, v. 171-172, p. 36-52, 2012. DOI: htt ps://doi.org/10.1016/j.cis.2011.12.003. Acesso em: 14 maio 2025.

DUTTA, Pranab et al. Molecular interaction between plants and Trichoderma species against soil-borne plant pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1145715, 2023. Disponivel em: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1145715/full. Acessado em: 16 maio 2025.

FENG, Y. et al. Xanthan gum-based hydrogels with Fe^{3+} ions coordination and their reversible sol–gel conversion. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 292–299, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861718311184. Acesso em: 14 maio 2025.

FERREIRA, Eduara; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes. Brasília, DF: **Embrapa**, 2024. 164 p. ISBN 978-65-5467-029-6. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1163171/manual-de-analises-de-bioinsumos-para-uso-agricola-inoculantes. Acesso em: 14 maio 2025.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF: **Embrapa**, 2020. 510 p. ISBN 978-65-86056-01-3. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1121825. Acesso em: 14 maio 2025.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263–271, 2009. Disponível em: https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/454. Acesso em: 14 maio 2025.

FREITAS, M. A. et al. Compatibilidade de Trichoderma spp. com diferentes pH em meios de cultura. **Revista de Microbiologia Aplicada**, v. 51, n. 2, p. 123–130, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rma/a/3v57n3zQvpy9gqgqh. Acesso em: 14 maio 2025.

GALARZA, L. A. et al. Characterization of Trichoderma species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. **Biological Control**, v. 89, p. 1–10, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/276421526. Acesso em: 14 maio 2025.

GAZOLA, Vitor Dib et al. Importância de fungos do gênero Trichoderma para a agricultura: mecanismos de ação e melhoramento genético. **Peer Review**, v. 4, n. 10, p. 63–78, 2024. Disponível em: https://peerw.org/index.php/journals/article/view/2592. Acesso em: 15 maio 2025.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1185383. Acesso em: 14 maio 2025.

GOMES, Hiago de O. et al. A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 197, p. 110627,

2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110627. Acesso em: 15 maio 2025.

GOMES, M. P. et al. Impacto dos pesticidas na saúde humana e ambiental. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, p. 1–10, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rsp/a/9qrwhf38m. Acesso em: 14 maio 2025.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BASTIDAS, C. Growth stimulation in bean (Phaseolus vulgaris L.) by Trichoderma. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964409001960. Acesso em: 14 maio 2025.

JOHN, R. P. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877412006103. Acesso em: 14 maio 2025.

JOHN, Rojan P. et al. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 211–226, 2011. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2010.513327. Acesso em: 15 maio 2025.

KUMAR, S. et al. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Disease Prevention and Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, art. 7382506, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791507/. Acesso em: 14 maio 2025.

LAMEIRO, M. G. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causes root rot and necrosis in sugar beet in Brazil. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, n. 1, p. 1–6, 2020. Disponível em: https://www.plantprotection.pl/Sclerotinia-sclerotiorum-Lib-deBary-causes-root-rot-and-necrosis-in-sugar-beet-in,142211,0,2.html. Acesso em: 14 maio 2025.

LEITE, Francisca Simone Lopes da Silva et al. Agrotóxico e saúde: realidade e desafios para mudanças de práticas na agricultura. **Biblioteca Digital de Teses e**

Dissertações da UFCG. 2022. Disponível em: https://bdtd.ufcg.edu.br/jspui/handle/riufcg/30716. Acesso em: 15 maio 2025.

LI, X. et al. Modification of pectin/starch-based beads with additives to improve encapsulation of Bacillus subtilis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 205, p. 1–10, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37394222/. Acesso em: 14 maio 2025.

LUDGERO, M.; CAMPOS, R. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido para o desenvolvimento de emulsões contendo óleo de terebintina. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 8, e10913846639, 2024. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/46639/36985/483170. Acesso em: 14 maio 2025.

MAJEED, A. et al., (2017). Practical and Plausible Implications of Chitin- and Chitosan-Based Nanocomposites in Agriculture: Derivatives, Composites, and Applications. **ResearchGate**, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319889771_Practical_and_Plausible_Implications_of_Chitin-_and_Chitosan-Based_Nanocomposites_in_Agriculture_Derivatives_Composites_and_Applications. Acesso em: 14 maio 2025.

MARTÍNEZ-ROMERO, D. et al. Application of Neem tree in agriculture, industry, medicine and environment: A review. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 5, p. 113–122, 2016. Disponível em: https://www.bioline.org.br/pdf?tc16046=. Acesso em: 14 maio 2025.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Trichoderma harzianum enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 9, p. 1264–1271, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22512380/. Acesso em: 14 maio 2025.

MELTON, L. D. et al. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 1–13, 2013. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6404037/. Acesso em: 14 maio 2025.

METTLER TOLEDO. Medidores de Densidade Digitais. Disponível em: https://www.mt.com/br/pt/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/digital-density.html. Acesso em: 20 maio 2025.

METTLER TOLEDO. SevenCompact Duo pH/Ion Meter. Disponível em: https://www.mt.com. Acesso em: 14 maio 2025.

MEYER, M. C. et al. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and biostimulant of cotton plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 983127, 2021. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.983127/full. Acesso em: 14 maio 2025.

MUKHERJEE, P. K. et al. Molecular intricacies of Trichoderma-plant-pathogen interactions. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, art. 892228, 2022. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ffunb.2022.892228/full. Acesso em: 14 maio 2025.

MURILLO-WILLIAMS, A**.** Did We Underestimate White Mold in 2023? **Penn State Extension**, 2023. Disponível em: https://extension.psu.edu/did-we-underestimate-white-mold-in-2023. Acesso em: 14 maio 2025.

NAPIÓRKOWSKA, A.; KUREK, M. Coacervation as a novel method of microencapsulation of essential oils—A review. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5142, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27165142. Acesso em: 14 maio 2025.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (**NPIC**). Neem Oil General Fact Sheet. 2023. Disponível em: https://www.npic.orst.edu/factsheets/neemgen.html. Acesso em: 14 maio 2025.

NIM BRASIL. Óleo de Neem: uma alternativa sustentável no manejo de pragas. 2024. Disponível em: https://www.nimbrasil.com.br/blog/oleo-de-neem-uma-alternativa-sustentavel-no-manejo-de-pragas. Acesso em: 14 maio 2025.

OYEGUE, I. et al. Green synthesis of neem extract and neem oil-based azadirachtin nanopesticides for fall Armyworm control and management. **ResearchGate**, 2025. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/390699293_Green_

synthesis_of_neem_extract_and_neem_oil-based_azadirachtin_nanopesticides_for_fall_Armyworm_control_and_management. Acesso em: 14 maio 2025.

PAGIN, Everton Bruno et al. Antagonismo in vitro de diferentes isolados de Trichoderma spp. frente ao agente causador da gomose dos citros Phytophthora nicotianae. **Revista VIDA: Exatas e Ciências da Terra (VIECIT)**, v. 1, n. 2, p. 21–33, 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/380611006_Antagonismo_in_vitro_de_diferentes_isolados_de_Trichoderma_spp_frente_ao_agente_causador_da_gomose_dos_citros_Phytophtora_nicotianae. Acesso em: 15 maio 2025.

PENG, Qiongyao et al. Recent advances in coacervation and underlying noncovalent molecular interaction mechanisms. **Progress in Polymer Science**, p. 101827, 2024. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670024000443. Acesso em: 20 maio 2025.

POMELLA, Alan William Vilela; RIBEIRO, R. T. da S. Controle biológico com Trichoderma em grandes culturas – uma visão empresarial. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (org.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. p. 239–244. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/572487/1/239244.pdf. Acesso em: 15 maio 2025.

QUEIROZ, Talita Neres et al. Extratos e óleos essenciais como alternativa no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* isolados de soja (Glycine max L.). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 737–753, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/340993672_Extratos_e_oleos_essenciais_como_alternativa_no_controle_de_Sclerotinia_sclerotiorum_e_Sclerotium_rolfsii_isolados_de_soja_Glycine_max_L. Acesso em: 15 maio 2025.

REMBINSKI, Jéssica et al. Using Trichoderma to manage sclerotia-producing phytopathogenic fungi. In: **Trichoderma – Technology and Uses**. London: IntechOpen, 2022. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/82650. Acesso em: 15 maio 2025.

RHEONICS. O que são emulsões: exemplos, recursos, preparação e medição. 2020. Disponível em: https://pt.rheonics.com/o-que-s%C3%A3o-emuls%C3%B5es-exemplos-recursos-prepara%C3%A7%C3%A3o/. Acesso em: 14 maio 2025.

SABERI-RISEH, R. et al. Chitosan microencapsulation of rhizobacteria for biological control of Fusarium wilt and growth promotion of tomato. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 101981, 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2452219822000957. Acesso em: 14 maio 2025.

SABERI-RISEH, Roohallah et al. Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. **Polymers**, v. 13, n. 12, p. 1938, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/polym13121938. Acesso em: 15 maio 2025.

SANTOS, C. D. Desenvolvimento e caracterização de emulsões contendo óleo de neem para aplicação agrícola. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agronômica) – **Universidade de Brasília**, Brasília, 2022. Disponível em: https://bdm.unb.br/handle/10483/30547. Acesso em: 14 maio 2025.

SINGH, A.; YE, A.; HARCHE, M. Complex coacervation of plant-based proteins and polysaccharides: A comprehensive review. **Food Biophysics**, v. 19, n. 1, p. 45-60, 2024. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-025-09408-7. Acesso em: 14 maio 2025.

TANASSI, M. A. et al. Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. **Polymers**, v. 14, n. 19, art. 4194, 2022. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4360/14/19/4194. Acesso em: 14 maio 2025.

TUDI, M. et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/1660-4601/18/3/1112. Acesso em: 14 maio 2025.

VALENCIA-GÓMEZ, Laura-Elizabeth et al. Estudo comparativo das propriedades antibacterianas, biodegradáveis e de biocompatibilidade de filmes compósitos e bicamadas de quitosana/gelatina revestidos com partículas de prata. **Materials**, v.

16, n. 8, p. 3000, 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/1996-1944/16/8/3000. Acesso em: 20 maio 2025.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: panoply of biological control. **Current Science**, v. 93, n. 7, p. 986–1001, 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07001994. Acesso em: 14 maio 2025.

VINALE, F. et al. Trichoderma–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071707002908. Acesso em: 14 maio 2025.

WYLIE MR, MERRELL DS. The Antimicrobial Potential of the Neem Tree *Azadirachta indica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 919586, 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9195866/. Acesso em: 14 maio 2025.

XIANG, Y. et al. Research progress and application of pectin: A review. **Journal of Food Science**, v. 89, n. 1, p. 1–15, 2023. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39394044/. Acesso em: 14 maio 2025.

YANG, Y. et al. Foliage-Sprayed Nano-Chitosan-Loaded Nitrogen Boosts Yield Potentials, Competitive Ability, and Profitability of Intercropped Maize-Soybean. **International Journal of Plant Production**, v. 17, p. 517–542, 2023. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s42106-023-00253-4. Acesso em: 14 maio 2025.

ZABOT, G. L. et al. Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. **Polymers**, v. 14, n. 4194, p. 1-37, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/polym14194194. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4360/14/19/4194. Acesso em: 16 maio 2025.

ZAKARI, A. I. et al. Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. **ResearchGate**, 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317093544_Progress_on_Azadirachta_indi

ca_Based_Biopesticides_in_Replacing_Synthetic_Toxic_Pesticides. Acesso em: 14 maio 2025.

ZHANG, Z. et al. Microencapsulation of green coffee oil by complex coacervation of soy protein isolate and polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 239, p. 128064, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128064. Acesso em: 14 maio 2025.

ZHU, Y. et al. Recent advances in virulence of a broad host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a mini-review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, art. 1424130, 2024. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1424130/pdf. Acesso em: 14 maio 2025.