



Immobilization of *Trichoderma* spp. in alginate and viability under different storage conditions

Imobilização de *Trichoderma* spp. em alginato e viabilidade sob diferentes condições de armazenamento

SILVA, Maria Clariana da ⁽¹⁾; SILVA, Lívia Ribeiro da ⁽²⁾; ALVES, Heberth Gustavo Ferreira ⁽³⁾; JESUS, Évelly Vitória Oliveira de ⁽⁴⁾; SILVA, Paula Cibelly Vilela da ⁽⁵⁾; SANTOS, Tania Marta Carvalho dos ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ 0009-0001-7405-7830; Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Brazil, E-mail: maria.clariana@ceca.ufal.br

⁽²⁾ 0009-0000-6850-7383; Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Brazil, E-mail: livia.silva@ceca.ufal.br

⁽³⁾ 0009-0002-8799-5970; Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisador, Brazil, E-mail: zootec18.gustavo@gmail.com

⁽⁴⁾ 0009-0009-4115-0420; Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Brazil, E-mail: vitoriaevelly61@gmail.com

⁽⁵⁾ 0000-0003-2157-4698; Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Brazil, E-mail: paulacibelly17@gmail.com

⁽⁶⁾ 0000-0002-1816-7840; Universidade Federal de Alagoas, docente e pesquisadora, Brazil, E-mail: tmcs@ceca.ufal.br

ABSTRACT

The cell immobilization approach by microencapsulation stands out as a highly effective alternative in conducting bioprocesses. By encapsulating cells in microcapsules, a three-dimensional matrix is created that provides prolonged cell retention. Based on this context, the objective was to evaluate the immobilization of *Trichoderma* isolates in calcium alginate and to evaluate the viability and determine the ideal temperature to store the immobilized fungi. Starch and sodium alginate were used to produce the granules, which together with each isolate was dripped in a calcium chloride solution. To evaluate the viability of the encapsulated fungi and the best storage conditions, tests were carried out with the granules stored at ambient, refrigerator and freezer temperatures. It was possible to obtain intact alginate capsules, and the evaluation of conidia concentration during 21 days of storage in different environments showed that they remained viable (107 conidia g⁻¹).

RESUMO

A abordagem de Imobilização celular por microencapsulação se destaca como uma alternativa altamente eficaz na condução de bioprocessos. Ao encapsular as células em microcápsulas, cria-se uma matriz tridimensional que proporciona retenção celular prolongada. Com base nesse contexto, objetivou-se avaliar a imobilização de isolados de *Trichoderma* em alginato de cálcio, a viabilidade e determinar a temperatura ideal para armazenar os fungos imobilizados. Para produção dos grânulos foram utilizados amido e alginato de sódio, que juntamente com cada isolado foi gotejado em solução de cloreto de cálcio. Para avaliar a viabilidade dos fungos encapsulados e a melhor condição de armazenamento, foram realizados testes com os grânulos armazenados nas temperaturas ambiente, geladeira e freezer. Foi possível obter cápsulas de alginato íntegras, e a avaliação da concentração dos conídios durante 21 dias de armazenamento em diferentes ambientes mostrou que os mesmos se mantiveram viáveis (107 conídios g⁻¹).

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Histórico do Artigo:

Submetido: 01/11/2023

Aprovado: 06/12/2023

Publicação: 23/02/2024



Keywords:

biosolubilization, biofertilizers, growth promoting microorganisms.

Palavras-Chave:

biossolubilização, biofertilizantes, microorganismos promotores de crescimento

Introdução

Trichoderma spp. são espécies de fungos de vida livre habitantes de solos tropicais e temperados, é um dos principais micro-organismos de importância para o aumento do crescimento vegetal. Este fungo pode influenciar positivamente na germinação de sementes, no desenvolvimento e rendimento da cultura devido à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas, principalmente pela solubilização de fósforo (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; GUZMAN et al., 2019; SÁNCHEZ-MONTESINOS et al., 2019) e síntese de ácido indol-acético (OLIVEIRA et al., 2012; CHAGAS et al., 2016;), tendo grande importância econômica para a agricultura por serem capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas e indutores de resistência de doenças nas plantas (CHAGAS et al., 2016; CHAGAS et al., 2017).

A microencapsulação de agentes biológicos tem sido apontada como uma alternativa valiosa para produzir bioformulações eficazes na agricultura, que garantam principalmente maior vida de prateleira e estabilidade dos produtos (BRAGA et al., 2019; BRAGA et al., 2022). A microencapsulação consiste em um processo que pode fornecer uma barreira física entre o composto do núcleo e os outros componentes do produto ou do meio externo. É uma técnica em que gotículas líquidas, partículas sólidas ou compostos de gás são presos em filmes finos, que podem apresentar uma matriz homogênea ou heterogênea (GHARSALLAOUI et al., 2007). O núcleo e o material de parede podem ser compostos de apenas um ou vários ingredientes e a retenção desses núcleos é determinada por sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade (FAVARO-TRINDADE, 2008).

O objetivo do processo de encapsulamento ou microencapsulamento é fornecer proteção ao agente biológico contra o estresse abiótico e biótico, prolongando sua viabilidade e promovendo uma liberação lenta de esporos à medida que avança degradando a microcápsula (VEMMER; PATEL 2013).

A gelificação iônica envolve uma solução polimérica aquosa, com íons de baixa massa molecular, em que polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Cápsulas de alginato ou pectina de baixo teor de metoxilação são muito utilizadas como material de cobertura, sendo os íons cálcio o agente de reticulação mais utilizado (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética de formação de gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

O método consiste no processo físico-químico, suspendendo o princípio ativo em uma solução de alginato de sódio (inserir a fórmula química do produto) para 1,5%, incluindo uma concentração ideal do organismo biológico, suspensão que é pulverizada em uma solução

líquida de acetato de cálcio a 2%, como resultado obtêm-se partículas peroladas ou encapsuladas, que solidificam em segundos quando os cátions reagem com cadeias biopoliméricas e formam estruturas rígidas (VEMMER & PATEL 2013).

Segundo Batista et al. (2013), o uso de biopolímeros, particularmente os alginatos, justifica-se por serem de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e não tóxicos ao meio ambiente. O alginato tem a capacidade de formar géis insolúveis em água, embora os géis apresentem alta porosidade, o que eleva os níveis de difusão do princípio ativo contido no gel, sem que haja dissolução.

Diante disso, objetivou-se promover a imobilização das células dos isolados de *Trichoderma* spp. em alginato de cálcio e avaliar a viabilidade e segurança desses fungos e determinar a melhor temperatura para armazenamento.

Procedimentos Metodológicos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA) na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em Rio Largo- AL. Foram utilizados isolados B1, B2 e M2 de *Trichoderma* spp. obtidos a partir de amostras de solos cultivados com hortaliças, com capacidade para solubilizar fosfato e sintetizar fitormônios, e selecionados para tolerância a fatores abióticos (salinidade, temperatura e estresse hídrico) pertencentes ao repositório do Laboratório de Microbiologia do CECA-UFAL.

Para a produção massal do *Trichoderma*, discos de cultivo em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) foram repicados para Erlenmeyers de 500 ml, contendo 250 ml de meio líquido de batata-dextrose (BD), seguindo-se a incubação em temperatura ambiente (± 28 °C), sob agitação rotativa, a 120 rpm por 10min. A massa de micélio foi armazenada a 4°C por 24h, antes de seu uso.

Para a formulação granulada e imobilização dos isolados de *Trichoderma* spp., foi adotada a metodologia adaptada de Lewis e Papavizas (1985). No preparo das matrizes de aprisionamento foram adicionados 4g de alginato e 20g de amido solúvel à 200 ml de água destilada esterilizada. Tal formulação foi homogeneizada por 20 minutos em agitador mecânico e em seguida foram incluídos 35 ml da suspensão de esporos de *Trichoderma* padronizados para 10^6 UFC mL⁻¹, e homogeneizou-se por mais 10 minutos. A mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (2%) sob leve agitação, que permitiu a formação de grânulos esféricos de diâmetro regular (Figura 1).

Figura 1.

Isolados de *Trichoderma* spp. imobilizados em alginato de cálcio.



Fonte: Autores (2022).

Após o término do gotejamento, o material permaneceu por mais 30 minutos sob agitação e então foi peneirado e lavado com água destilada esterilizada para a retirada de resíduos da solução de cloreto de cálcio. As cápsulas formadas foram armazenadas em água destilada esterilizada na geladeira.

Para avaliação da viabilidade dos fungos encapsulados e a melhor condição de armazenamento, foram realizados testes com os grânulos armazenados nas temperaturas ambiente (entre 18 a 27 °C), geladeira (entre 4 a 7 °C) e freezer (entre -3 a -6 °C), onde foram feitos plaqueamentos aos 7, 14 e 21 dias em meio de cultura BDA. Após 6 dias do plaqueamento, foi realizada a medição do diâmetro das colônias (mm) com uma régua e contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Para controle foi utilizada cultura sem imobilização.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, em desenho fatorial na seguinte disposição: três tratamentos (isolados de *Trichoderma*), três tempo de conservação (7, 14 e 21 dias) e três condições de conservação (ambiente, geladeira e freezer). Foram verificadas as pressuposições para a realização de ANOVA, avaliando-se a normalidade e homogeneidade pelos testes de Lilliefors e Cochran respectivamente e os dados foram submetidos à análise de variância com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000) aplicando-se o teste F ($p \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) ou regressão polinomial.

Resultados e Discussão

Após a preparação das matrizes de alginato de sódio com adição de amido solúvel e inclusão do *Trichoderma* spp. obtiveram-se cápsulas com tamanho médio de 5mm e consistência viável para o estudo de viabilidade do material encapsulado.

Não foram identificadas diferenças significativas (teste F, $p \leq 0,05$) no crescimento micelial entre os isolados, independentemente da temperatura e do período de conservação que foram submetidos. Na semeadura em placas de Petri com meio BDA das cápsulas de alginato foi possível verificar o crescimento radial dos fungos presentes nas mesmas, para os ambientes de armazenamento testados, no entanto para geladeira o crescimento micelial foi mais vigoroso.

Na superfície do grânulo, não foi possível visualizar hifas nem esporos dos fungos imobilizados, mostrando assim que a imobilização de células microbianas em alginato é uma forma segura de preservação das estruturas microbianas, evitando contaminações, visto que as mesmas permanecem apenas no interior da cápsula.

Com relação ao número de conídios, a análise de variância detectou diferenças significativas (teste F, $p \leq 0,05$) entre os isolados. Não foi observada interação significativa entre a temperatura o tempo de armazenamento, demonstrando que a temperatura não influenciou a esporulação. No desdobramento das médias dos valores das condições de armazenamento, obtiveram-se maiores valores em geladeira e freezer que diferiram significativamente do ambiente. A média só foi diferente para o isolado B1, com 7 e 14 dias de armazenamento e para M2 com 21 dias. (Tukey $P \geq 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1.

Viabilidade de conídios (Log do número de UFC) dos isolados de *Trichoderma* spp. imobilizados em alginato de sódio sob diferentes condições de armazenamento.

Isolados	Tempo (dias)	Incubação		
		Ambiente	Geladeira	Freezer
B1	7	7,80b	7,84a	7,80a
B2	7	7,84a	7,85a	7,84a
M2	7	7,88a	7,86a	7,85a
B1	14	7,73b	7,84a	7,84a
B2	14	7,83a	7,85a	7,83a
M2	14	7,83a	7,87a	7,88
B1	21	7,83a	7,80a	7,82a
B2	21	7,84a	7,84a	7,84a
M2	21	7,75b	7,83a	7,86a
Média		7,82b	7,85a	7,84a

*Médias seguidas de mesma letra não difere entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Fonte: Autores (2023).

Os resultados observados mostram que as temperaturas dos ambientes de armazenamento não interferiram na viabilidade dos isolados, mantendo os índices de velocidade de crescimento do fungo, indicando que a imobilização conferiu proteção aos mesmos. No entanto, os isolados apresentaram melhor desenvolvimento quando armazenados em temperaturas mais baixas, a redução da quantidade de água associada a temperaturas baixas torna o metabolismo fúngico mais lento, o que resulta na viabilidade das células microbianas por longos períodos.

A quantidade de conídios não expressa necessariamente a viabilidade dos conídios, pois durante o processo de confecção das formulações os conídios passaram por diversas etapas de processamento, incluindo variação de temperatura, os resultados apenas da quantidade de conídios, não puderam refletir a viabilidade dos conídios após cada etapa (LOCATELLI et al, 2018). Assim, a unidade formadora de colônia (UFC/g) é um método mais apropriado para demonstrar a viabilidade dos conídios.

Locatelli et al. (2018) estudaram o desenvolvimento de formulações de *Trichoderma* sp. em grânulos encapsulados contendo alginato de sódio modificado com diferentes polímeros e avaliaram a viabilidade de conídios durante a estocagem. Os autores verificaram que, partindo de uma concentração inicial de 10^{10} UFCg⁻¹, foi possível manter a viabilidade dos conídios armazenados a 28 °C por até 14 meses em concentrações celulares acima de 10^6 UFC/g para grânulos contendo alginato, polifosfato de sódio, pectina e glicerol.

Para o tempo de armazenamento não foram detectadas diferenças significativas, observa-se que, após 21 dias, os conídios mantiveram-se viáveis (10^7 conídios/g) (Tabela 1) não se observando redução da viabilidade dos mesmos durante o período de avaliação do ensaio.

A eficácia, praticidade e segurança dos métodos para a aplicação e manutenção de fungos, são fundamentais, tanto para o sucesso do biocontrole nos sistemas de cultivo, quanto para a aceitação do biocontrole pelos agricultores e sociedade (MACHADO et al., 2012).

Dentre as matrizes poliméricas utilizadas no encapsulamento de fungos, o alginato de sódio tem sido mais frequentemente empregado. Esse polímero permite a formação de géis rapidamente em presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, preservando a atividade e a viabilidade dos micro-organismos micro encapsulados (CARVALHO et al., 2006).

O processo de imobilização ocorre através do método de coacervação simples, no qual uma solução homogênea de macromoléculas carregadas sofre uma separação de fases líquidas, dando origem a uma fase rica em coloide e densa e outra pouco densa, pobre em coloide; ambas se mantêm em equilíbrio e são imiscíveis (MOURA, 2011).

O mecanismo de proteção ocorre por causa da formação da cápsula, cobertura ou parede pelo material encapsulante, que envolvem o material encapsulado denominado de recheio ou núcleo (BARRETO et al., 2015; XING et al., 2014).

Na avaliação do aspecto visual das cápsulas de alginato, armazenadas nos três ambientes observou-se que as cápsulas se mantiveram íntegras, esféricas, opacas, sendo que as partículas contendo os isolados fúngicos apresentaram vasto número de “núcleos” (conídios dos isolados) em todas as amostras, demonstrando alta eficiência de encapsulação.

Produtos formulados à base de *Trichoderma* spp. contêm esporos vivos, tornando crucial a observância das condições de armazenamento, como refrigeração a temperaturas abaixo de 28 °C. Além disso, as aplicações em campo devem ser realizadas em condições de elevada umidade relativa (MACHADO et al., 2012). Conforme se observa nas condições do presente trabalho, os conídios mantiveram a viabilidade, indicando que o fungo presente nas cápsulas pode ainda ser capaz de crescer por um período maior que o avaliado.

Os métodos de imobilização possuem tanto vantagens quanto desvantagens. Embora a estabilidade das células não seja assegurada, algumas vantagens notáveis incluem: a retenção do inóculo no suporte, permitindo um controle mais efetivo das propriedades reais do meio, maior pureza e aumento do rendimento (PRADELLA, 2001). Além disso, apresenta a possibilidade de utilização contínua das células e a proteção do alginato (VILELA et al., 2012).

Locatelli et al. (2018) estudaram o desenvolvimento de formulações de *Trichoderma* spp. em grânulos encapsulados contendo alginato de sódio modificado com diferentes polímeros e avaliaram a viabilidade de conídios durante a estocagem. Os autores verificaram que, partindo de uma concentração inicial de 10^{10} UFC/g, foi possível manter a viabilidade dos conídios armazenados a 28 °C por até 14 meses em concentrações celulares acima de 10^6 UFC/g para grânulos contendo alginato, polifosfato de sódio, pectina e glicerol.

Conclusão

Nas condições em que o ensaio foi conduzido, a técnica empregada para imobilização dos isolados de *Trichoderma* em alginato de cálcio foi adequada para os isolados estudados.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L.G.; ETCHEPARE, M.A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C.R. Materiais de revestimento usados na microencapsulação de probióticos. *Ciência e Natura*, v. 37, p. 164-174, 2015. <http://dx.doi.org/10.5902/2179-460X19747>
- BRAGA, A.B.A.C, COSTA, C.J.M.; POMELLA, A. W. V; RIBEIRO, E.J; SANTOS, L, D; ZOTARELLI, M.F. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidias by spray drying. *Powder Technol*, v.347, p.199–206, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>
- BRAGA A. B. A. C.; COSTA C.J.M; RIBEIRO, E. J; ZOTARELLI, M. F; SANTOS, L. D. Evaluation of the microencapsulation process of conidia of *Trichoderma asperellum*

by spray drying. Braz Journal Microbiol v. 53, 1871–1880, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00832-z>

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. D. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. Revista Analytica, v.23, pp. 60-70, 2006.

https://www.researchgate.net/publication/334330145_Uso_de_biocatalisadores_imobilizados_Uma_alternativa_para_a_conducao_de_bioprocessos

CHAGAS, L. F. B.; CASTRO, H. G.; COLONIA, B. S. O.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. Brazilian Journal of Botany, São Paulo-SP, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s40415-015-0247-6>

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. Revista de Agricultura Neotropical, v. 4, p. 97-102, 2017.

<https://doi.org/10.32404/rean.v4i3.1529>

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentares. Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos, v. 11, n. 2, pág. 103-112, 2008.

https://www.researchgate.net/publication/237521407_Revisao_Microencapsulacao_de_ingredientes_alimenticios

FAVARO-TRINDADE, CS; SANTANA, AS; MONTERREY-QUINTERO, ES; TRINDADE, FM NETTO, MA Uso da tecnologia de secagem por pulverização para redução do sabor amargo do hidrolisado de caseína. Food Hydrocolloids, v. 24, p. 336-340, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. Programas e Resumos... São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Aplicações da secagem por atomização na microencapsulação de ingredientes alimentícios: uma visão geral. Food Research International, 40, p. 1107–1121, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Guzmán-Guzmán P, Porrás-Troncoso MD, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A.

Trichoderma Species: Versatile Plant Symbionts. Phytopathology. V.1, p. 6-16, 2019.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>

LEWIS, J.A.; PAPAIVAS, G.C. Características de pellets de alginato formulados com *Trichoderma* e *Gliocladium* e seu efeito na proliferação de fungos no solo. Plant Pathology, London, v.34, n.6, p.571-577, June 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01409.x>

- LOCATELLI, G. O.; SANTOS, G. F.; BOTELHO, P. S.; FINKLER, C. L. L.; BUENO, L. A.
Desenvolvimento de *Trichoderma* sp. formulações em grânulos encapsulados (GC) e avaliação da vida útil dos conídios. Controle biológico, v. 117, p. 21-29, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
<https://doi.org/10.19084/rca.16182>
- MESTDAGH, M. M.; ANEXELOS, M. A. V. Physic-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. Biopolymer science: Food and Non-food Applications, p. 303-314, 1998.
- MOURA, D. S.; Estudo espectroscópico de esferas à base de alginato contendo *Trichoderma harzianum* visando o controle de fitopatógenos. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Física, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.
<https://oasisbr.ibict.br/vufind/Search/Results?lookfor=Estudo+espectrosc%C3%B3pico+de+esferas+%C3%A0+base+de+alginato+contendo+Trichoderma+harzianum+visando+o+controle+de+fitopat%C3%B3genos&type=AllFields>
- OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 7, p. 149-155, 2012.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7419841>
- PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA U. A. ; Aquarone E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo. 2001. P 355-371. 355-371.
- SÁNCHEZ-MONTESINOS B, DIÁNEZ F, MORENO-GAVIRA A, GEA FJ, SANTOS M. Plant Growth Promotion and Biocontrol of *Pythium ultimum* by Saline Tolerant *Trichoderma* Isolates under Salinity Stress. Int J Environ Res Public Health, v. 16, p. 2053 2019. doi: 10.3390/ijerph16112053.
- VEMMER, M.; PATEL, A.V. Revisão de métodos de encapsulamento adequados para agentes de controle biológico microbiano. Biological Control, v.67, p. 380-389, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- VILELA, A.; SCHULLER, D.; MENDES-FARIA, A.; CÔRTEZ-REAL, M. Redução da acidez volátil de vinho por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato-quitosano. Revista Enologia, p.38-42, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4719-y>
- XING, Y.; XU, Q.; MA, Y.; CHE, Z.; CAI, Y.; JIANG, L. Efeito das concentrações de amido poroso nas características microbiológicas de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado. Comida e função, v.5, n. 5, p.972-983, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3FO60438A>.