

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Encapsulamento de conídios de *Metarhizium anisopliae*: avaliação da estabilidade e potencial no controle de *Rhipicephalus microplus*.**

**Laura Nobrega Meirelles**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Encapsulamento de conídios de *Metarhizium anisopliae*: avaliação da  
estabilidade e potencial no controle de *Rhipicephalus microplus*.**

**LAURA NOBREGA MEIRELLES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*E coorientação da Doutora*  
**Mariana Guedes Camargo**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre** em Ciências no Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica – RJ  
Agosto de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

M499e Meirelles , Laura Nobrega, 1994-  
Encapsulamento de conídios de *Metarhizium*  
*anisopliae*: avaliação da estabilidade e potencial no  
controle de *Rhipicephalus microplus* / Laura Nobrega  
Meirelles . - Barra do Pirai, 2021.  
58 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.  
Coorientadora: Mariana Guedes Camargo.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2021.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Alginato de sódio.  
3. Gelificação iônica. I. Elias Pinheiro Bittencourt,  
Vânia Rita, 1959-, orient. II. Guedes Camargo,  
Mariana, 1985-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3743 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.061105/2021-09

Seropédica-RJ, 26 de agosto de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LAURA NOBREGA MEIRELLES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/08/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

*(Assinado digitalmente em 26/08/2021 11:33 )*  
PATRICIA SILVA GOLO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 2221855

*(Assinado digitalmente em 26/08/2021 11:34 )*  
VANIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 387922

*(Assinado digitalmente em 26/08/2021 14:52 )*  
CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 058.965.206-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3743**, ano:  
**2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **26/08/2021** e o código de verificação: **4938ea4bd0**

**“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”  
(Eleanor Roosevelt)**

**“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas aqueles que os descobriram.”  
(Albert Schweitzer)**

**“A persistência é o menor caminho do êxito.”  
(Charles Chaplin)**

**Dedico este trabalho a Deus,  
aos meus pais e aos meus amigos...**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força e saúde para seguir em frente quando passei, em 2015, pelo momento mais difícil da minha vida, assim como por todas as bênçãos recebidas para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais Paulo e Dorvânia por se sacrificarem, se dedicarem e abdicarem de tempo e de muitos projetos para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional e pessoal. Por me incentivarem a ingressar no curso desejado desde criança e por estarem sempre presentes vivendo este sonho ao meu lado. Por todas as visitas e festas surpresas em Seropédica, momentos que aqueciam meu coração, principalmente nas semanas de provas. Vocês são tudo para mim! Sem vocês nada disso seria possível! Eu amo muito vocês!

Ao meu tio Oswaldo por estar presente na minha vida, sempre disposto a ajudar e pelas inúmeras caronas até Seropédica.

Ao meu noivo Danilo que acompanhou toda esta trajetória, desde o curso pré-vestibular até agora. Muito obrigada por toda compreensão, companheirismo, amor e amizade durante estes nove anos. Pelos feriados e finais de semana que me fez companhia no laboratório. Eu amo você!

Aos meus filhos de quatro patas Thor, Mell, Nininha, Vira, Paralisia, Irmão do Paralisia, Lassie e Estopa... por tornarem meus finais de semana tão acolhedores e cheios de amor e carinho.

Ao melhor laboratório do mundo, minha segunda família, obrigada por me acolherem com tanto carinho. Aos membros do laboratório Emily (preciosa), Mariana (reitora do lab), Jéssica (Jessiquinha), Thaís (Thata), Adriani (Adrielle), Allan (Allanzinho), Caio (vô), Amanda (Amandinha), Victória (Vic Bório), Lucas (Caju), Pamella... agradeço por todas as risadas, conselhos e pela companhia nos Congressos. Às minhas queridas amigas Emily, Jéssica, Adriani e Thaís, por tonarem meus dias mais leves e divertidos. Vocês me inspiram e serão para a vida toda!

À todos os professores, os que já fizeram parte da minha trajetória e aos que continuam caminhando ao meu lado, obrigada por se dedicarem incansavelmente na transmissão não só de conhecimentos, mas de ensinamentos para a vida toda. Em especial, à minha orientadora Professora Vânia Bittencourt por me apresentar o mundo científico, pelas oportunidades concedidas, dedicação e carinho. À Mariana Camargo, minha coorientadora, colega de quarto e socorrista nas horas vagas, só tenho a agradecer pela amizade construída, por ter embarcado comigo neste projeto e por nunca soltar minha mão.

À banca avaliadora Patricia Golo e Caio Monteiro, assim como os membros suplentes Isabele Angelo e Wendell Perinotto pela participação e contribuição para o aprimoramento deste estudo.

À Universidade Rural por todo o acolhimento e por me proporcionar, com toda a sua beleza, finais de tarde deslumbrantes. Aos funcionários da Estação, principalmente ao Zeca e Sr. Onofre que cuidam do nosso ambiente de trabalho e dos bezerros com muita dedicação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

Laura Nóbrega Meirelles, filha de Paulo Jasmin Meirelles e Dorvânia Nóbrega Meirelles, nasceu em 23 de Setembro de 1994 no município de Barra do Piraí, RJ.

Estudou de 2011 a 2012 no Centro de Estudos Integrados, localizado no município de Barra do Piraí, onde concluiu o Ensino Médio.

Em Março de 2014 iniciou a graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo a mesma em Dezembro de 2018.

Em 2015 ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Ártropodes de Importância Médica Veterinária, sob orientação da Professora Dra. Vânia Rita E. P. Bittencourt, como bolsista PIBIC de iniciação científica, permanecendo até o final da graduação.

Em 2019 foi aprovada no processo de seleção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UFRRJ.

Durante a vida acadêmica participou de cursos de aperfeiçoamento, congressos e simpósios, tendo publicado em anais de eventos científicos.



## RESUMO

MEIRELLES, Laura Nobrega. **Encapsulamento de conídios de *Metarhizium anisopliae*: avaliação da estabilidade e potencial no controle de *Rhipicephalus microplus***. 2021. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Devido aos problemas gerados pelo uso indiscriminado de acaricidas químicos para o controle de carrapatos, métodos alternativos vem sendo desenvolvidos, como o uso de fungos entomopatogênicos. No entanto, estes entomopatógenos têm sua viabilidade comprometida quando aplicados em condições naturais, sendo indispensável o desenvolvimento de formulações. Neste contexto, as tecnologias de microencapsulamento de agentes de biocontrole são promissoras, pois além de propiciar proteção contra fatores ambientais, aumentam a vida útil do microrganismo encapsulado. A gelificação iônica é uma técnica simples e financeiramente viável que vem sendo estudada para o encapsulamento de fungos entomopatogênicos. Assim, o objetivo do presente estudo foi encapsular os conídios de *Metarhizium anisopliae* (LCM S01) em alginato de sódio a 2 e 3%, utilizando a técnica de gelificação iônica e avaliar as micropartículas quanto a morfologia externa, concentração, viabilidade, tempo de prateleira, tolerância à irradiação UV-B, termotolerância e eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A morfologia externa das partículas foi caracterizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura e a viabilidade dos conídios encapsulados (EC) foi determinada pelo percentual de germinação. Para o tempo de prateleira, os conídios encapsulados em 2 (EC 2%) ou 3% (EC 3%) de alginato de sódio e os não encapsulados (NEC), foram armazenados por 1, 3, 5, 7, 9 e 11 meses em condição ambiente e em freezer. Quanto à tolerância à UV-B, os conídios EC e NEC foram expostos a dose total de 6.0 ou 8.0 kJ m<sup>-2</sup>, enquanto que para termotolerância foram submetidos a 42 °C em banho maria por 2, 4 e 6 horas. Ainda, foram avaliados os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas expostas a 30, 60 ou 90 mg de micropartículas em condições laboratoriais. As partículas fúngicas de alginato de sódio a 2 e 3% apresentaram-se esféricas com superfície mais homogênea e heterogênea, respectivamente. O encapsulamento reduziu, cerca de 5× a concentração inicial de conídios e não afetou sua viabilidade. O encapsulamento aumentou a vida útil dos conídios armazenados em ambiente por 1, 3 e 5 meses em relação aos conídios NEC. Em freezer, os conídios NEC germinaram mais do que os EC. Os conídios EC e NEC apresentaram maior viabilidade em freezer do que em ambiente. A exposição ao calor por 6 horas reduziu a germinação de conídios NEC comparados com os EC 2 e 3%. A exposição às diferentes doses de UV-B também reduziu significativamente a germinação dos conídios NEC em relação aos EC. As partículas foram capazes de reduzir significativamente os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas quando comparado aos conídios NEC e ao grupo controle, no entanto não houve diferença significativa entre as diferentes quantidades de partículas avaliadas. De forma geral, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de alginato de sódio utilizadas. Assim, as formulações desenvolvidas no presente estudo aumentaram o tempo de prateleira, a termotolerância e a tolerância à UV-B dos conídios de LCM S01 de *M. anisopliae*, e foram eficazes no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, apresentando potencial promissor no controle deste carrapato.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, alginato de sódio, gelificação iônica

## ABSTRACT

MEIRELLES, Laura Nobrega. ***Metarhizium anisopliae* conidial encapsulation: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus***. 2021. 57 p. Dissertation (Master Science in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Due to the problems generated by the indiscriminate use of chemical acaricides to control ticks, alternative methods have been developed, such as the use of entomopathogenic fungi. However, these entomopathogens have their viability compromised when applied under natural conditions, being indispensable the development of formulations. In this context, microencapsulation technologies for biocontrol agents are promising; since it provides protection against environmental factors as well as increased the encapsulated microorganism shelf life. Ionic gelation is a simple and financially viable technique when employed for the entomopathogenic fungi encapsulation. Thus, the aim of the present study was encapsulate the *Metarhizium anisopliae* conidia (LCM S01) in 2 and 3% sodium alginate, using the ionic gelation technique and, evaluate the external morphology, concentration, viability, shelf life, tolerance of UV-B irradiation, thermotolerance and efficacy of these microparticles in the control of *Rhipicephalus microplus* engorged females. The external morphology was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the encapsulated conidia (EC) viability was determined by the germination percentage. For shelf life, conidia encapsulated in 2 (EC 2%) or 3% (EC 3%) of sodium alginate and unencapsulated (NEC) were stored for 1, 3, 5, 7, 9 and 11 months at room temperature and in a freezer. For UV-B tolerance assay, EC and NEC were exposed to 6.0 or 8.0 kJ m<sup>-2</sup>, while for thermotolerance, they were submitted to 42 °C in a water bath for 2, 4 and 6 hours. Furthermore, the biological parameters of engorged females exposed to 30, 60 or 90 mg of microparticles under laboratory conditions were evaluated. 2 and 3% sodium alginate fungal particles were spherical with a more homogeneous and heterogeneous surface, respectively. Encapsulation did not cause severe conidia losses and did not affect their viability. Encapsulation increased the conidia shelf life stored at room temperature for 1, 3 and 5 months compared to NEC. In the freezer, NEC germinated more than EC. The EC and NEC showed greater viability in the freezer when compared to room temperature. Heat exposure for 6 hours reduced the NEC germination compared to EC 2 and 3%. Different UV-B doses exposure also significantly reduced the NEC germination compared to EC. The particles were able to reduce significantly the engorged females' biological parameters when compared to NEC and the control group, however, there was no significant difference between the particles evaluated. In general, no significant differences were observed between the sodium alginate concentrations used. Thus, the formulations developed in the present study increased *M. anisopliae* (LCM S01) shelf life, thermotolerance and UV-B tolerance, and were effective in *R. microplus* engorged females control, showing promising potential to control this tick.

Keywords: entomopathogenic fungus, ionic gelation, sodium alginate

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. utilizado nos experimentos. .... 10
- Tabela 2.** Concentração fúngica de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com 2 e 3% de alginato de sódio, por meio de gelificação iônica. .... 20
- Tabela 3.** Média e desvio padrão do percentual de germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 não encapsulados ou encapsulados em 2 ou 3% de alginato de sódio, após armazenamento por diferentes períodos de tempo. .... 23
- Tabela 4.** Média e desvio padrão do percentual de germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (LCM S01) não encapsulados ou encapsulados em 2 ou 3% de alginato de sódio, após o armazenamento em temperatura ambiente ou freezer..... 24
- Tabela 5.** Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas às diferentes doses dos conídios de *Metarhizium anisoplie* LCM S01 encapsulados ou não em 2 ou 3% de alginato de sódio. .... 28

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrativo da elaboração de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados, através do método de gelificação iônica. Fonte: Acervo pessoal. .... 12
- Figura 2:** Placas de Petri contendo solo com micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2% (A) e 3% (B), após incubação durante 7 dias a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ . .... 16
- Figura 3:** Micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B), visualizadas em microscópio estereoscópio ( $\times 25$ ). . 18
- Figura 4:** Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio. A e B: micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2%, A não germinada e B geminada; C e D micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 3%, C não germinada e D germinada. Hifas apontadas pelas setas pretas. .... 19
- Figura 5:** Conídios germinados de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B), incubados por 24 h a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  e corados com azul de metila. Ampliação de  $40\times$ . .... 21
- Figura 6:** Temperaturas máxima, média e mínima monitoradas durante os 11 meses de armazenamento das micropartículas fúngicas. As medições foram realizadas semanalmente. 21
- Figura 7:** Média e desvio padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados ou não após exposição à UV-B (6.0 ou 8.0 kJ/m<sup>2</sup>). O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* foi usado como isolado padrão. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos, expostos a mesma dose de UV-B, e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, expostos a diferentes doses de UV-B, não diferem estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ). .... 25
- Figura 8:** Média e desvio padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados ou não após exposição à 42 °C por 2, 4 ou 6 horas. O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* foi usado como isolado padrão. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos, expostos durante o mesmo tempo, e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, expostos por diferentes tempos, não diferem estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ). .... 26
- Figura 9:** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* sobre o solo contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 esporulados a partir de micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B). As setas brancas apontam as partículas fúngicas e as setas vermelhas apontam as fêmeas colonizadas e mortas pelo fungo. .... 29
- Figura 10:** Colônias de *Metarhizium anisopliae* reisolados de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Conídios não encapsulados a  $2,0 \times 10^7$  (A);  $4,5 \times 10^7$  (B) e  $6,7 \times 10^7$  conídios/mL (C). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 2% aplicados na quantidade de 30 (D), 60 (E) e 90 mg (F). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 3% aplicados na quantidade de 30 (G), 60 (H) e 90 mg (I). .... 30

**Figura 11:** Conídios oriundos das colônias de *Metarhizium anisopliae* reisoladas de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Conídios não encapsulados a  $2,0 \times 10^7$  (A);  $4,5 \times 10^7$  (B) e  $6,7 \times 10^7$  conídios/mL (C). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 2% aplicados na quantidade de 30 (D), 60 (E) e 90 mg (F). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 3% aplicados na quantidade de 30 (G), 60 (H) e 90 mg (I). Ampliação de 100×..... 31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
2.2 <i>Metarhizium</i> spp. no Controle Microbiano de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	4
2.3 Efeitos de Fatores Abióticos sobre Fungos Entomopatogênicos .....	5
2.3.1 Radiação solar .....	5
2.3.2 Temperatura .....	6
2.4 Encapsulamento de Fungos Entomopatogênicos .....	7
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1 Local de Realização dos Experimentos .....	10
3.2 Obtenção dos Isolados Fúngicos de <i>Metarhizium</i> spp. ....	10
3.3 Obtenção da Suspensão Fúngica Aquosa .....	10
3.4 Microencapsulamento Fúngico por Gelificação Iônica .....	11
3.5 Morfologia Externa das Micropartículas Fúngicas .....	12
3.6 Eficiência do Processo de Encapsulamento .....	13
3.7 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas .....	13
3.8 Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados .....	13
3.9 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados .....	14
3.10 Avaliação da Eficácia de Conídios Formulados em Alginato de Sódio sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	15
3.10.1 Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	16
3.11 Análise Estatística .....	16
<b>4 RESULTADOS</b> .....	18
4.1 Morfologia Externa das Micropartículas Fúngicas .....	18
4.2 Eficiência do Processo de Encapsulamento .....	20
4.3 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas .....	21
4.4 Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados .....	24
4.5 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados .....	25
4.6 Avaliação da Eficácia de Conídios Formulados em Alginato de Sódio sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	26

4.6.1. Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	29
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36

# 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) Murrel & Barker, 2003 é um ectoparasito hematófago responsável por causar graves perdas econômicas para a pecuária bovina. Os prejuízos se devem a queda da produção cárnea e leiteira, danos ao couro, transmissão de agentes patogênicos causadores da Tristeza Parasitária bovina, entre outros. O controle deste carrapato é realizado principalmente através de acaricidas químicos que utilizados, geralmente, de forma inadequada contribuem para o agravamento do cenário de resistência química. Numa abordagem alternativa, o fungo entomopatogênico *Metarhizium spp.* (Hipocreales: Clavicipitaceae) que se destaca no controle biológico de artrópodes pragas, apresenta promissora eficácia no controle de *R. microplus*.

A maior parte dos produtos a base de fungos entomopatogênicos comercializados no Brasil contra pragas agrícolas utilizam como propágulos os conídios aéreos. Estes são estruturas especializadas responsáveis pela reprodução, dispersão e persistência ambiental da maior parte dos fungos filamentosos. Entretanto, fatores ambientais como temperatura elevada, irradiação solar excessiva e umidade relativa baixa podem ser deletérios aos conídios de fungos entomopatogênicos, limitando sua utilização em condições semi-naturais ou naturais. A irradiação solar, sobretudo os componentes ultravioletas UV-A (330-400 nm) e UV-B (290-330 nm), é um dos principais fatores ambientais que prejudicam a sobrevivência dos fungos. A exposição à radiação, principalmente a UV-B, pode retardar a germinação, reduzir a virulência e até mesmo causar a morte dos conídios. A temperatura (alta ou baixa) pode acometer um entomopatógeno de diferentes formas e, assim, interferir na virulência, viabilidade e no processo de infecção do hospedeiro. O tempo de prateleira dos fungos entomopatogênicos é um fator importante a ser avaliado, uma vez que impacta no sucesso da aplicabilidade e viabilidade financeira do entomopatógeno.

Neste contexto, a elaboração de formulações é uma estratégia para aumentar a eficiência de programas de controle biológico de pragas utilizando fungos. Além de preservar a viabilidade de fungos entomopatogênicos frente a exposição aos intempéries ambientais, a formulação facilita a manipulação e a aplicação destes entomopatógenos contra as pragas alvo e ainda promovem um aumento do tempo de vida útil. Estima-se que 95% da população do carrapato *R. microplus* esteja presente na pastagem, correspondendo a fase não parasitária, enquanto somente 5% representam a fase parasitária que é encontrada no bovino. Neste contexto, formulações de fungos entomopatogênicos que permitem a aplicação diretamente na pastagem podem representar uma estratégia eficaz na produção de bioprodutos para o controle desse carrapato.

A tecnologia de encapsulamento tem sido utilizada na formulação de agentes de biocontrole, pois além de modular a liberação da substância encapsulada, atua na sua proteção contra fatores ambientais. Dentre as técnicas para o encapsulamento de microrganismos, a gelificação iônica é um método vantajoso visto que é simples, não requer o uso de equipamentos específicos ou solventes orgânicos nocivos e não envolve a aplicação de altas temperatura. O polímero alginato de sódio é muito utilizado como matriz de revestimento de fungos entomopatogênicos, pois além de ser financeiramente acessível, é degradável e biocompatível.

Os fungos entomopatogênicos tem sua utilização consolidada em programas de controle biológico de pragas da agricultura. Entretanto, apesar de todas as pesquisas na área, ainda não existe um produto comercial a base de fungos entomopatogênicos registrado para o controle de carrapatos no Brasil. Desta forma, estudos acerca do desenvolvimento de formulações fúngicas são importantes para que a utilização de fungos contra carrapatos se torne uma alternativa viável e aplicada na prática. Neste contexto, o presente trabalho



envolveu à formulação de conídios de *Metarhizium anisopliae* em alginato de sódio a 2 e 3% utilizando o método de gelificação iônica, assim como a avaliação das micropartículas elaboradas quanto a morfologia externa, concentração e viabilidade, tempo de prateleira, tolerância à radiação UV-B, termotolerância e atividade no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições laboratoriais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888, popularmente conhecido como “carrapato do boi”, tem sua origem na Ásia e chegou até as Américas através da importação de gado pelos colonizadores (WHARTON, 1974). Pode ser encontrado na Ásia, Austrália, Madagascar, Sul e Leste da África, nas Américas Central e do Sul e no México e Caribe, ou seja, áreas de clima favorável à sua disseminação (ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

Antes dos estudos de Murrel; Barker (2003), o carrapato *R. microplus* era denominado *Boophilus microplus*. Após a realização de sequenciamentos genéticos e estudos morfológicos, Murrel; Barker (2003) sugeriram que *Boophilus* se tornasse um subgênero do gênero *Rhipicephalus*. Assim, as espécies pertencentes ao gênero *Boophilus* foram mudadas para o gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*, respeitando a classificação taxonômica de Murrel; Barker (2003).

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasito monoxeno, ou seja, de um só hospedeiro, cujo o ciclo de vida é dividido em duas fases: parasitária e não-parasitária. Na fase parasitária machos e fêmeas copulam sobre o animal e a fêmea copulada começa o processo de ingurgitação, que é o ato de se alimentar de sangue para retirar do mesmo os nutrientes necessários para a maturação dos ovos. As fêmeas ingurgitadas, denominadas teleógenas, desprendem-se naturalmente do hospedeiro e caem ao solo dando início a fase não parasitária. Elas procuram um local apropriado para realizarem a postura, sendo que cada fêmea pode colocar cerca de 3.000 ovos. As larvas eclodem, sofrem o processo de enrijecimento completo da cutícula e migram para o ápice das pastagens aonde ficam à espera do hospedeiro. Ao encontrarem o bovino, se fixam utilizando peças do aparelho bucal e começam a se alimentar iniciando novamente a fase parasitária (MONTEIRO, 2017)

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasito de expressiva importância para a pecuária de leite e corte em função dos danos que causa ao animal e as consequentes perdas econômicas calculadas, por ano, em US\$ 3.24 bilhões no Brasil (GRISI et al., 2014). Os prejuízos são decorrentes da diminuição do ganho de peso dos animais, queda na produção de carne e leiteira, depreciação do couro, e gastos com mão de obra e materiais utilizados no controle contínuo (HORN ; ARTECHE, 1985). Além disto, este carrapato é vetor de agentes patogênicos, como protozoários do gênero *Babesia* spp. e bactérias do gênero *Anaplasma* spp. que são hemoparasitos causadores da Tristeza Parasitária Bovina, doença que acarreta perdas econômicas uma vez que leva a alta morbidade e mortalidade dos bovinos (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2019).

Devido à relevância dos prejuízos causados por *R. microplus*, o seu controle é feito quase que exclusivamente pelo uso de parasiticidas químicos. O uso indiscriminado desses produtos, compostos por moléculas de diferentes classes químicas, podem causar sérios problemas à saúde do homem e dos animais, e danos à biodiversidade (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2007; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Além disto, a exposição frequente de carrapatos aos produtos químicos disponíveis no mercado associada a aplicação e manejo inadequados, contribuem para um aumento da pressão de seleção de carrapatos resistentes (DE OLIVEIRA HIGA, 2015). A resistência de *R. microplus* a pelo menos um dos acaricidas disponíveis para o seu controle no Brasil foi relatada em quase todos os estados (KLAFKE et al., 2017; RECK et al., 2014; VILELA et al., 2020), sobretudo no Mato Grosso do Sul, onde uma cepa de carrapato é resistente a todos os grupos químicos de acaricidas (VALSONI et al., 2020).

Em resposta aos efeitos desfavoráveis da utilização indiscriminada e muitas vezes sem critério técnico de carrapaticidas e à crescente demanda da população por uma produção animal mais sustentável e com maior biossegurança, pesquisas com novas tecnologias alternativas ao controle químico de *R. microplus* são desenvolvidas intensamente. Neste sentido, a utilização de fungos entomopatogênicos destaca-se no controle microbiano de artrópodes.

## **2.2 *Metarhizium* spp. no Controle Microbiano de *Rhipicephalus microplus***

Frente aos problemas gerados pelo uso indiscriminado de produtos químicos, torna-se importante a busca por novas estratégias de controle do carrapato *R. microplus*. Neste contexto pesquisas na área de controle microbiano crescem cada vez mais e a utilização de fungos entomopatogênicos é promissora no controle do carrapato do boi.

Alves (1998) definiu o controle microbiano como um ramo do controle biológico que se refere ao emprego racional de patógenos, levando em consideração a manutenção da população de pragas a níveis não-econômicos. O primeiro estudo que utilizou um fungo entomopatogênico para controle de pragas foi realizado por Merchnickoff em 1878-1879, através da utilização de *Metarhizium anisopliae* para o controle de larvas do besouro *Anisoplia austriaca*. No Brasil, Pestana em 1923 foi um dos primeiros a referir-se a um fungo como potencial agente de controle de um artrópode, quando observou o fungo *Penicillium anisopliae* infectando *Tomaspis* spp (ALVES, 1998).

O gênero *Metarhizium* é composto por espécies de fungos entomopatogênicos, na sua maioria anamórficas, que são frequentemente isolados do solo ou de insetos. (BISCHOFF et al., 2009). Estes fungos são cosmopolitas, podendo ser encontrados facilmente em diferentes regiões do mundo (ROBERTS; ST LEGER, 2004). A doença induzida por *Metarhizium* recebe o nome de muscardina verde, com base na coloração esverdeada dos conídios encontrados nos cadáveres de seus hospedeiros (ROBERTS; ST LEGER, 2004).

De modo geral, o processo de infecção de *Metarhizium* spp. em seu hospedeiro envolve as seguintes etapas: aderência, germinação, formação do apressório, penetração, colonização da hemolinfa, extrusão e esporulação. A fixação dos conídios na cutícula do hospedeiro é a fase inicial e crucial para o sucesso da infecção, envolvendo eventos ativos e passivos, como forças hidrofóbicas, forças eletrostáticas e interações proteicas (BIDOCHKA; ST LEGER; ROBERTS, 1997; MENT et al., 2010). Após a adesão ocorre a germinação dos conídios seguida pelo desenvolvimento do tubo germinativo e a diferenciação deste em apressório (SCHRANK; VAINSTEN, 2010). A pressão mecânica combinada com a ação de enzimas que degradam a cutícula (proteases e quitinases) favorecem a penetração do apressório na cutícula do hospedeiro (FANG et al., 2009). Além disso, o apressório secreta uma camada de mucilagem que tem como função a consolidação da união entre fungo e a cutícula (ST LEGER et al., 1989). Ao atingirem a hemolinfa, as hifas se diferenciam em blastosporos, colonizando o hospedeiro. Finalmente, ocorre a extrusão de hifas para a superfície do cadáver do hospedeiro e o desenvolvimento de conidióforos que dão origem a novos conídios (AW; HUE, 2017).

Os fungos entomopatogênicos destacam-se no controle de carrapatos em função de serem importantes inimigos naturais de artrópodes, atuarem sobre os diferentes estágios de vida do hospedeiro e de possuírem virulência relativamente específica (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004). O mecanismo de infecção dos fungos entomopatogênicos é através da penetração ativa pela cutícula, assim, por não necessitarem ser ingeridos e penetrar pelas cavidades naturais do hospedeiro, estes entomopatógenos se destacam quando comparados com outros agentes de controle microbiano.

Entre os fungos entomopatogênicos, as espécies *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* são as mais virulentas para carrapatos, sendo amplamente estudadas em relação ao seu potencial no controle de artrópodes (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Estudos já demonstraram a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre *R. microplus* em condições laboratoriais (BITTENCOURT; MASSARD; LIMA, 1994; JONES et al., 2021), semi-campo (CAMARGO et al., 2014; MARCIANO, A. F. et al., 2020; MESQUITA et al., 2020) ou campo (CAMARGO et al., 2016; KAAYA et al., 2011).

Os fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados no controle biológico de pragas da agricultura. Na busca por programas de manejo integrado de pragas mais sustentáveis, grandes empresas agrícolas brasileiras têm investido em produtos à base de fungos (MASCARIN et al., 2019). Apesar de pesquisas demonstrarem o potencial de fungos entomopatogênicos no controle de *R. microplus*, ainda não existe um produto comercial a base de fungos entomopatogênicos com indicação para carrapatos no Brasil (MASCARIN et al., 2019).

### **2.3 Efeitos de Fatores Abióticos sobre Fungos Entomopatogênicos**

Um dos principais entraves na utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas é que quando utilizados em condições de campo, a viabilidade destes entomopatógeno é afetada pela a ação deletéria de altas e baixas temperaturas, baixa umidade relativa do ar e excessivas exposições a radiação ultravioleta. Desta forma a ação de fatores ambientais naturais podem afetar a disseminação e persistência dos fungos entomopatogênicos no ambiente, limitando o seu potencial como agentes de biocontrole em condições semi-naturais ou naturais (ZIMMERMANN, 2007b). O tempo de prateleira é um fator que afeta a vida útil dos fungos entomopatogênicos sob condição de armazenamento, impactando no sucesso da aplicabilidade comercial e viabilidade financeira desses entomopatógenos (PRZYKLENK et al., 2017).

#### **2.3.1 Radiação solar**

A radiação solar, sobretudo os componentes UV-A (330 - 400 nm) e UV-B (290 - 330 nm), é um dos principais fatores ambientais que prejudicam a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no campo (ZIMMERMANN, 2007b). A irradiação UV-B é absorvida diretamente pelo DNA das células, induzindo reações de degradação que resultam na formação de fotoprodutos, como dímeros de pirimidina (NASCIMENTO et al., 2010). Assim, a exposição à radiação pode desde retardar a germinação (BRAGA et al., 2001a) e virulência (FERNÁNDEZ-BRAVO et al., 2017) até causar a morte dos conídios (BRAGA et al., 2015), o que limita a dispesão e o tamanho da população fúngica.

Estudos já investigaram a ação do estresse induzido por diferentes doses de UV-B sobre a germinação e culturabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos. Neste âmbito, Braga et al. (2001a) investigaram que o aumento de 30% (de 920 para 1200 mW/m<sup>2</sup>) de irradiação UV-B causou uma diminuição significativa na capacidade dos conídios de *Metarhizium* spp. ARSEF 2575 e ARSEF 23 formarem colônia, quando expostos durante 1, 2, 3, 4, 6 ou horas. Ainda, mostraram que a exposição à irradiação por um curto período (1 hora) já foi o suficiente para causar um atraso na germinação dos conídios fúngicos. Já exposições por períodos mais longo atrasaram a germinação por dias, indicando que, dependendo da dose, o fungo pode exigir mais tempo para se recuperar e dar continuidade ao processo de germinação.

Isolados de fungos entomopatogênicos oriundos de diferentes localidades podem ser mais ou menos susceptíveis aos efeitos da exposição à radiação UV-B. Neste contexto, 60 isolados de *Beauveria* spp., provenientes de diferentes localidades, foram avaliados quanto a tolerância a radiação UV-B (FERNANDES et al., 2007). Os autores verificaram que dentre os isolados oriundos de latitudes de 0° a 22°, os de latitudes mais baixas manifestaram tolerâncias a UV-B significativamente maiores do que os isolados de latitudes mais altas. Além disso, notaram que os conídios que sobreviveram à radiação demonstraram um atraso na germinação fúngica, além de propensão a terem virulência reduzida.

Corval et al. (2021) avaliaram a tolerância à irradiação UV-B de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. Estes autores observaram que conídios, blastosporos e microescleródios de um mesmo isolado fúngico apresentam diferenças na tolerância à UV-B, no entanto não conseguiram verificar qual propágulo seria o mais tolerante para cada isolado.

Estudos são realizados na busca do entendimento de como os fungos entomopatogênicos respondem frente a ação deletéria da irradiação. Assim, Rangel e Roberts (2018) compararam o acúmulo de manitol e trealose em conídios do isolado ARSEF 324 de *Metarhizium acridum* (conhecido pela alta tolerância a radiação à radiação UV-B e calor), em relação aos isolados ARSEF 23 e ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* (mais suscetíveis). Os autores atestaram que os conídios de ARSF 324, crescidos em meio batata dextrose ágar acrescido de extrato de levedura, acumulou duas vezes mais estes dois compostos quando comparados com os isolados ARSEF 23 e ARSEF 2575. Sendo assim, atribuíram o alto acúmulo de trealose e manitol pelo isolado ARSEF 324, como um mecanismo para atingir a alta tolerância não só à radiação UV-B, mas também ao calor.

### 2.3.2 Temperatura

De maneira geral, a faixa de temperatura ótima para o crescimento e germinação do fungo *Metarhizium* spp. é entre 25 e 30 °C, no entanto o mesmo geralmente consegue se desenvolver entre 15 e 35 °C (ROBERTS; CAMPBELL, 1977; ALVES; RISCO; ALMEIDA, 1984; MILNER et al., 2003). Para *Beauveria* spp., a faixa de temperatura ótima está entre 23 a 28°C, entretanto o fungo pode crescer nas temperaturas de 5 a 38 °C (ROBERTS; CAMPBELL, 1967). Segundo Paixão, Fernandes e Pedrini (2019) o estresse induzido pela a ação da temperatura pode levar a inibição de processos metabólicos, desnaturação de proteínas e desorganização da membrana de conídios fúngicos.

Dependendo das exigências de temperatura do entomopatógeno e hospedeiro alvo, as altas temperaturas podem inativá-lo antes que ele alcance o hospedeiro ou pode reduzir ou acelerar o seu crescimento dentro do mesmo (ZIMMERMANN, 2007b). De outro modo, as baixas temperaturas podem reduzir ou interromper a germinação e o crescimento, assim como prejudicar ou prolongar uma infecção bem sucedida (ZIMMERMANN, 2007b).

Sendo assim, a temperatura pode acometer um entomopatógeno de diferentes formas, interferindo na germinação conidial, no crescimento micelial e na esporulação dos fungos entomopatogênicos (POLAR et al., 2005; KEYSER et al., 2014; ALVES et al., 2016; PAIXÃO; FERNANDES; PEDRINI, 2019). Walstad, Anderson e Stambaugh (1970) observaram que a exposição a 50 °C durante 10 minutos é o suficiente para levar a morte destes fungos entomopatogênicos.

Rangel et al. (2010) realizaram pesquisas a fim de entender como a temperatura interferia no crescimento micelial de diferentes isolados de fungo. Esses autores observaram que dentre os isolados de *Metarhizium* spp. testados, os conídios do isolado ARSEF 324 de *M. acridum* foram os mais termotolerantes e que o micélio deste e do isolado ARSEF 3609 também de *M. acridum* mostrou recuperação notável após 10 dias de exposição a 42 °C.

Como esperado, o isolado *Aspergillus nidulans* (termofílico), utilizado como padrão, mostrou-se muito mais termotolerante do que qualquer um dos isolados de *Metarhizium spp.*

Ainda, a termotolerância de nove isolados de *Metarhizium spp.* foi investigada por Mesquita et al. (2020). Estes autores observaram um perfil de tolerância a temperatura de 40 °C, com isolados apresentando cerca de 100% de germinação relativa. No entanto, a exposição a 42 °C diminuiu significativamente a viabilidade de todos os isolados, com exceção dos isolados de *M. anisopliae* LCM S01 e LCM S04 que exibiram germinação relativa de cerca de 69 e 55%, respectivamente.

Assim como acontece para a tolerância à irradiação UV-B, isolados fúngicos de diferentes origens geográficas podem apresentar variabilidade na termotolerância de seus conídios. No estudo conduzido por Rangel et al. (2005), isolados de latitudes mais altas demonstraram maior suscetibilidade ao calor do que os isolados mais próximos do equador. Os autores também constataram que a correlação entre latitude e a tolerância ao calor é menos expressiva quando comparada com o que foi observado por Fernandes et al. (2007), para tolerância a irradiação ultravioleta.

Estudos também são realizados para o entendimento da aplicabilidade do conhecimento da termotolerância dos fungos entomopatogênicos. Neste contexto, Fernandes et al. (2010a) sugeriram que as exposições ao calor e ao frio podem ser utilizadas como ferramentas rápidas para identificação provisória de algumas espécies e variedades importantes do gênero *Metarhizium*.

## 2.4 Encapsulamento de Fungos Entomopatogênicos

A formulação de um entomopatógeno envolve a incorporação de substâncias que além de preservar a viabilidade do agente de biocontrole frente a exposição aos intempéries ambientais, facilitam sua manipulação e aplicação (ALVES, 1998). Desta forma, a elaboração de formulações é uma estratégia para o sucesso do controle de pragas utilizando fungos entomopatogênicos (FARIA; WRAIGHT, 2007). Existem diferentes apresentações de formulação, como pó molhável, pó de contato, iscas, grânulos, grânulos dispersíveis em água, suspensão miscível em óleo, suspensão de ultra baixo volume, suspensão e dispersão oleosa (FARIA; WRAIGHT, 2007). Diversos estudos já foram desenvolvidos com diferentes formulações de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos (CAMARGO et al., 2014, 2016, 2012; SULLIVAN et al., 2021; KAAYA et al., 2011; LORENZ; HUMBERT; PATEL, 2020; MARANGA et al., 2005; MARCIANO et al., 2020, 2021; MESQUITA et al., 2020; SANTOS et al., 2021).

Faria e Wraight (2007) definem os grânulos como partículas de tamanho controlado, nas quais o ingrediente ativo se encontra fortemente incorporado. O encapsulamento, ferramenta amplamente empregada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (VIEIRA et al., 2019), vem se destacando na produção de formulações granulares de agentes de biocontrole. Além de modular a liberação da substância encapsulada, o uso de formulações granulares promove proteção contra os fatores ambientais, facilidade de manuseio, assim como a redução do número de aplicações e da biomassa do conteúdo utilizado. Desta forma, a técnica de encapsulamento tem potencial promissor na formulação de agentes de biocontrole mais estáveis a campo e com maior tempo de prateleira (FRACETO et al., 2018; VEMMER; PATEL, 2013). A técnica de encapsulamento já foi empregada para formulações granulares de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* (PEREIRA; ROBERTS, 1991; QIU et al., 2019) e *Beauveria bassiana* (LIU; LIU, 2009b), assim como do fungo

*Trichoderma* sp., usado no biocontrole de fitopatógenos (MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2017).

Existem diferentes técnicas para o encapsulamento de microrganismos, tais como spray drying (ACUÑA-JIMÉNEZ et al., 2015; LIU; LIU, 2009b), coacervação (QIU et al., 2019), gelificação iônica (LIU; LIU, 2009a; RODRIGUES et al., 2017), dentre outras. A gelificação iônica é um método muito vantajoso visto que é simples, não requer o uso de equipamentos específicos ou solventes orgânicos nocivos e não envolve a aplicação de altas temperaturas (PATIL et al., 2010). Nesta técnica, a solução do polímero, como o alginato de sódio, contendo o ingrediente ativo a ser encapsulado é gotejada numa solução iônica, como o cloreto de cálcio, sob agitação constante. Quando as gotículas entram em contato com a solução iônica, há uma formação instantânea de micropartículas esféricas que aprisionam o ingrediente ativo (LEONG et al., 2016; VEMMER; PATEL, 2013).

A morfologia das cápsulas depende do método de encapsulamento, sendo o formato esférico o mais comum (VEMMER; PATEL, 2013). O termo “beads” pode ser utilizado para as cápsulas sólidas formadas no processo de encapsulamento. Os polímeros são usados para formar a matriz básica da cápsula e os mais adequados são os biodegradáveis. Os materiais de cápsula mais utilizados são os polissacarídios naturais, tais como: alginatos, carrageninas, agar/agarose, goma gelana, goma de guar, goma arábica, amido, celulose, pectina e quitosano (GUISELEY, 1989; MURANO, 1998; SMIDSROD; SKJAKBRK, 1990).

Os alginatos, derivados do ácido alginico, são extraídos de várias espécies de algas marrons e também podem ser obtidos de algumas bactérias (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008). Em temperatura ambiente, o ácido alginico é insolúvel em água, no entanto torna-se solúvel em temperaturas elevadas. O alginato de sódio, sal de sódio do ácido alginico, é solúvel em água. Entretanto, a adição de cátions divalentes, como o cálcio, tornam o alginato de sódio insolúvel, levando a formação de géis ou filmes (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012). O polímero alginato de sódio é barato, biocompatível, degradável e amplamente disponível (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008), sendo bastante empregado como matriz de revestimento de materiais biológicos (BOKKHIM et al., 2018).

Em relação ao encapsulamento de conídios fúngicos, por meio de spray drying, Liu; Liu (2009b) investigaram que as altas temperaturas empregadas na técnica convencional (100/80 °C) causaram redução da viabilidade de conídios de *B. bassiana*, diferente da secagem a baixa temperatura (60/30 °C) que foi mais benéfica na manutenção da viabilidade fúngica. Rodrigues et al. (2017) investigaram a performance da gelificação iônica no encapsulamento fúngico e o seu papel na manutenção da vida útil de fungos entomopatogênicos armazenados. Esses autores observaram que o processo de encapsulamento não levou a grandes perdas de propágulos, assim como não afetou a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* encapsulados em alginato de sódio. Verificaram também que a germinação dos conídios de *B. bassiana* não formulados diminuiu em 47%, após 6 meses de armazenamento em ambiente, enquanto não houve reduções significativas na germinação dos conídios formulados durante os 12 meses de avaliação.

Trabalhos recentes demonstram que diferentes tipos de técnicas de encapsulamento e polímeros oferecem proteção contra à irradiação a diferentes espécies de fungos. Qiu et al. (2019) elaboraram partículas de gelatina e 2 % de goma arábica contendo conídios de *M. anisopliae* encapsulados. Eles avaliaram a germinação fúngica dos conídios após exposição à UV-B por 3 horas, observando que os conídios encapsulados germinaram significativamente mais em relação aos não encapsulados. Ainda, verificaram que quando não expostos à UV-B, a germinação de conídios encapsulados não diferiu estatisticamente da germinação dos conídios não encapsulados. Além disso, testaram as partículas contra formigas *Solenopsis invicta*, verificando eficácia no controle. Por sua vez, Maruyama et al. (2020) avaliaram a

fotoestabilidade de conídios de *T. harzianum* encapsulados em 2% alginato de sódio, utilizando a técnica de gelificação iônica. Mostraram que após exposição à UV-A e UV-B por diferentes tempos, as características macromorfológicas de crescimento em meio de cultura do fungo encapsulado foram mantidas.

Além dos fungos, o processo de encapsulamento também pode ser aplicado a outros agentes de biocontrole, como bactérias. O efeito da exposição à UV-B e UV-C sobre a viabilidade dos esporos de *Bacillus thuringiensis* encapsulados em alginato de sódio, por meio da emulsificação/gelificação interna, foram avaliados por García-Gutiérrez et al. (2011). Estes autores verificaram que após exposição à 236 J de UV-B, os esporos encapsulados apresentaram viabilidade de 60%. Entretanto a exposição à UV-C por 20 minutos não afetou a viabilidade dos conídios encapsulados, ao contrário dos não encapsulados os quais não permaneceram viáveis.

Ainda, o potencial de partículas fúngicas de alginato de sódio elaboradas através da gelificação iônica foi avaliado para o controle de carrapatos. Lorenz, Humbert e Patel (2020) investigaram que o encapsulamento de blastosporos de *Metarhizium pemphigi* em 2% de alginato de cálcio, acrescido de 15% de amido de milho ou 15% de quitina, causou 100% de mortalidade em ninfas de *Ixodes ricinus*.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Realização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM). O laboratório fica localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

#### 3.2 Obtenção dos Isolados Fúngicos de *Metarhizium* spp.

O isolado LCM S01 de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) foi utilizado para o preparo das partículas fúngicas. Este isolado é oriundo de amostra de solo coletada na cidade de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Tabela 1), sendo mantido no Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ. Como o presente estudo acessou o patrimônio genético brasileiro, a pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob o código AA47CB6. O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* Bischo., Rehner & Humber (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolado de um inseto da família Curculionidae, foi utilizado para validar os ensaios de tolerância à temperatura e à radiação UV-B, pois possui os valores de tolerância conhecidos. Este isolado foi obtido da Coleção do Serviço de Pesquisa Agrícola de Culturas Fúngicas Entomopatogênicas (ARSEF) (Laboratório de Plantas, Solo e Nutrição do USDA-US) (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram cultivados em ágar aveia e mantidos a  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$  por 14 dias. Após este tempo, as placas foram armazenadas a 4 °C.

**Tabela 1:** Isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. utilizado nos experimentos.

Isolado Fúngico	Espécie	Localização	Coordenadas geográficas	Data de isolamento
LCM S01	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Rio de Janeiro/Brasil	22° 45' 54" 43° 41' 58"W	15/12/2015
ARSEF 2575	<i>Metarhizium robertsii</i>	South Carolina/USA	34°00'N	21/07/1998

#### 3.3 Obtenção da Suspensão Fúngica Aquosa

A suspensão fúngica usada na elaboração das partículas armazenadas para análise do tempo de prateleira foi obtida através da lavagem do arroz utilizado para a produção de conídios. Para a produção de conídios em arroz, 30 mL de água peptonada a 5% foram adicionados em 100 g de arroz parboilizado contido em sacos plásticos, os quais foram

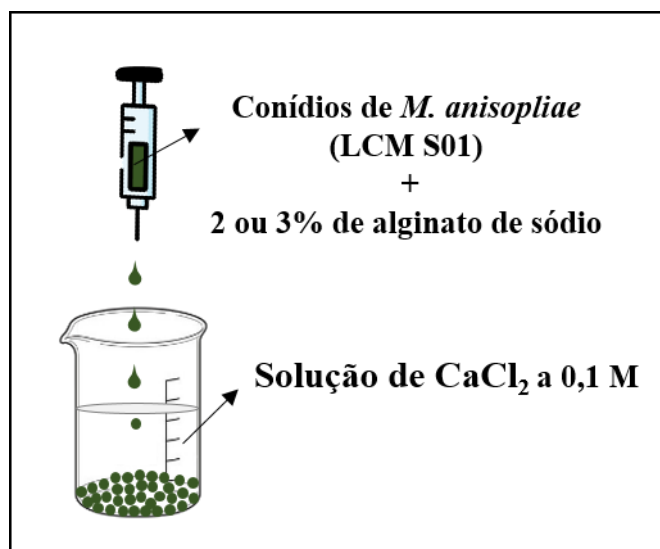
autoclavados. Em capela de fluxo laminar, 8 mL de suspensão fúngica a  $1 \times 10^8$  conídios/mL foram inoculados em cada saco (Adaptado de SANTI et al., 2010). Algodão hidrófilo foi colocado na extremidade dos sacos com a finalidade de permitir a entrada de umidade, sendo os mesmos identificados e vedados com o auxílio de barbante. O arroz foi armazenado a temperatura de  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  por 14 dias. Durante todo este período os sacos foram manualmente agitados para a fragmentação de agregados de arroz, permitindo assim, que o fungo se dispersasse em todo o substrato. A lavagem do arroz foi realizada no interior da capela de fluxo laminar com solução de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80<sup>®</sup>) (Isifar) a 0,02% (v/v). Em seguida, a suspensão aquosa obtida foi filtrada, com o auxílio de uma peneira estéril, de modo que o arroz ficasse retido na mesma. A suspensão conidial foi quantificada, com o auxílio da câmara de Neubauer, e ajustada para a concentração desejada, sendo realizado um teste de viabilidade dos conídios (ALVES, 1998).

A suspensão fúngica do isolado LCM S01 de *M. anisopliae* para a elaboração das partículas utilizadas nos demais experimentos foram obtidas a partir da raspagem dos conídios da superfície do meio de ágar aveia e suspensos em solução de 0,02% de Tween 80<sup>®</sup>. A suspensão foi filtrada para remover agregados de conídios e a concentração fúngica apropriada foi ajustada para cada teste.

### **3.4 Microencapsulamento Fúngico por Gelificação Iônica**

As micropartículas foram preparadas pelo método de encapsulamento por gelificação iônica (Adaptado de dos Santos et al., 2015) (Figura 1). Soluções de alginato de sódio (Sigma) a 2 e 3% (p/v) foram preparadas através da dissolução do alginato de sódio diretamente na suspensão fúngica, com o auxílio de agitador magnético para se obter uma mistura homogênea. As soluções de alginato a 2 e 3% contendo o isolado fúngico foram gotejadas, através de seringa e agulha estéril (21G  $\times$  1 1/4”), em solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (Dinâmica) a 0,1 M. As micropartículas foram colocadas em peneiras e lavadas com água destilada estéril para remover o excesso de CaCl<sub>2</sub>. Em seguida, foram secas em estufa a 27 °C durante 15 horas.

Um lote de partículas fúngicas foi preparado para cada experimento desenvolvido, de modo que as partículas não permaneceram armazenadas, com exceção do teste de tempo de prateleira.



**Figura 1:** Esquema ilustrativo da elaboração de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados, através do método de gelificação iônica. Fonte: Acervo pessoal.

### 3.5 Morfologia Externa das Micropartículas Fúngicas

Para a avaliação da morfologia externa, os seguintes grupos foram formados: micropartículas de alginato de sódio a 2% contendo conídios encapsulados não germinados; micropartículas de alginato de sódio a 2% contendo conídios encapsulados germinados; micropartículas de alginato de sódio a 3% contendo conídios encapsulados não germinados e micropartículas de alginato de sódio a 3% contendo conídios encapsulados germinados. Para estimular o processo de germinação dos conídios encapsulados (EC), as partículas foram aplicadas na superfície do solo úmido e estéril, sendo posteriormente incubadas durante 7 dias a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ .

As micropartículas foram analisadas quanto a morfologia externa através de observações em microscópio estereoscópio e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a realização da MEV, as micropartículas fúngicas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) (pH 7.2) e refrigeradas em -4°C. Em seguida foi realizado o protocolo de lavagem em tampão cacodilato de sódio (CS) (0,1 M). A lavagem foi repetida 3 vezes por 10 minutos. As amostras foram imersas em Tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich®, US) e, após 1 hora, o protocolo de lavagem em CS foi repetido. As amostras foram desidratadas, por 5 minutos, em solução ascendente de álcool (7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 80% e 90%) e posteriormente foram realizadas 3 imersões de 10 minutos em álcool absoluto. Finalmente, as amostras foram secas em  $\text{CO}_2$  e metalizadas em banho de ouro (BITENCOURT et al., 2021) . Para a visualização e registros das fotos foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Auriga 40® (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha), operado a 2 kV, pertencente a plataforma de microscopia do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 3.6 Eficiência do Processo de Encapsulamento

A eficiência do processo de gelificação iônica utilizando 2 e 3% de alginato de sódio como matriz encapsulante foi avaliada quanto a capacidade de encapsulamento dos conídios e a interferência na viabilidade fúngica. Uma alíquota de 1 g das micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2 e 3% foram solubilizadas em 10 mL de solução de citrato de sódio (Sigma) a 2% acrescida de Tween 80® a 0,02% (LOCATELLI et al., 2018). Em seguida, a suspensão fúngica inicial utilizada para o preparo das partículas, bem como a suspensão obtida após solubilização das mesmas tiveram suas concentrações conidiais quantificadas em câmara de Neubauer para a comparação e verificação da capacidade de encapsulamento dos conídios.

Para avaliar a interferência do processo de gelificação iônica na viabilidade dos conídios, 20 µL de cada suspensão fúngica (suspensão inicial utilizada para o preparo das partículas e a suspensão obtida após solubilização das mesmas) a  $1 \times 10^5$  conídios/mL foi inoculada em placas de Petri (60 × 15 mm, Kasvi) contendo 8 mL de meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) + Cloranfenicol a 0,05% (p/v) + benomyl a 0,002% (p/v) (50% de ingrediente ativo; Benlate®, DuPont) (MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). Foram feitas três réplicas por grupo. As placas foram incubadas por 24 h no escuro a  $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  UR  $\geq 80\%$ . A germinação fúngica foi avaliada em microscópio óptico (Nikon; ECLIPSE E200MV R) (×40) após coloração com azul de metila. Foram contados pelo menos 300 conídios germinados e não germinados por placa e o valor percentual de germinação fúngica foi estipulado (LOPES et al., 2013). A avaliação da concentração e viabilidade dos conídios foi realizada em cada lote de micropartículas fúngicas produzido para cada experimento desenvolvido.

### 3.7 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas

Os conídios encapsulados em alginato de sódio a 2 (EC 2%) e 3% (EC 3%), bem como os conídios não encapsulados (NEC) do mesmo isolado fúngico (LCM S01 de *M. anisopliae*) foram armazenados em microtubos tipo eppendorf por 11 meses em duas condições de temperatura diferentes: temperatura ambiente e freezer (adaptado de RODRIGUES et al., 2017). As amostras foram avaliadas no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º e 11º mês(es) de armazenamento quanto à viabilidade do fungo conforme descrito anteriormente no tópico 3.6.

Os conídios não encapsulados foram obtidos conforme descrito a seguir. A suspensão fúngica, preparada a partir da lavagem do arroz, foi centrifugada de modo que os conídios ficassem depositados no fundo do tubo tipo Falcon. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os conídios foram transferidos para placas de Petri de vidro. Para a retirada do excesso de umidade, os conídios foram secos em estufa a 27 °C por 15 horas. Para a avaliação da viabilidade, os conídios foram suspensos em 0,02% de Tween 80® e avaliados quanto a germinação fúngica.

As temperaturas mínima e máxima de cada condição de armazenamento (ambiente e freezer) foram registradas ao longo de todo o período de armazenamento.

### 3.8 Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados

Para avaliação da tolerância à radiação UV-B, 1 g de partículas de alginato de sódio a 2 e 3% de LCM S01 de *M. anisopliae* foram colocadas em placas de Petri de vidro (60 × 15 mm) para serem expostas à radiação. Foram preparadas suspensões aquosas (Tween 80

0,02%) com conídios não encapsulados dos isolados LCM S01 de *M. anisopliae* e ARSEF 2575 de *M. robertsii*. Uma alíquota de 20 µL das suspensões fúngicas aquosas (LCM S01 e ARSEF 2575) a  $1 \times 10^5$  conídios/mL foi inoculada em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo 8 mL de BDA + benomyl a 0,002% (p/v) (BRAGA et al., 2001a; MILNER; HUPPATZ; SWARIS, 1991). Tanto as placas contendo as partículas com o fungo encapsulado quanto as placas contendo as suspensões aquosas com o fungo não encapsulado foram expostas à radiação UV-B por aproximadamente 1h 20min ou 1h 50min (dose total de 6,0 ou 8,0 kJ m<sup>-2</sup>, respectivamente) em câmara de UV com irradiação fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL20 W / 12 RS (Philips). Para os grupos controles (fungos que não receberam radiação), placas de Petri contendo as partículas de fungos encapsulados e as suspensões aquosas de fungos não encapsulados foram envoltas com papel alumínio para bloquear toda a radiação e também foram colocadas na câmara de UV.

Todas as placas foram cobertas com um filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries) que bloqueia radiações de comprimento de onda inferior a 290 nm. Desta forma foi permitida a passagem da maior parte das radiações UV-B (290-320 nm) e do mínimo de UV-A (320-400 nm), bloqueando a passagem da radiação UV-C (<280 nm) e de comprimento de onda curta da radiação UV-B (280 –290 nm), simulando a ação da camada de ozônio. A ação de danos ao DNA (dimerização da pirimidina), desenvolvida por Quate; Sutherland; Sutherland. (1992) foi usado para calcular as irradiâncias UV. O espectro de irradiação emitido pelas lâmpadas foi medido com o espectrorradiômetro Ocean Optics USB 2000 (Dunedin, FL).

Para avaliar a viabilidade dos conídios expostos ou não a radiação UV-B, as micropartículas fúngicas de alginato de sódio, foram solubilizadas em citrato de sódio 2% (p/v) conforme descrito anteriormente no tópico 3.7. Em seguida, uma alíquota de 20 µL a  $1 \times 10^5$  conídios/mL das micropartículas solubilizadas foi inoculada em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo 8 mL de BDA + benomyl a 0,002% (p/v). As placas de todos os grupos foram incubadas por 24 h no escuro a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  para avaliar a germinação de conídios fúngicos conforme descrito anteriormente no tópico 3.6.

As porcentagens relativas de germinação foram calculadas através da relação entre o número de conídios germinados expostos à radiação e o número de conídios não germinados não expostos à radiação (BRAGA et al., 2001a). *Metarhizium robertsii* (ARSEF 2575) foi usado para validar os ensaios, pois possui tolerância a radiação UV-B conhecida (BRAGA et al., 2001a). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

### 3.9 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados

Para a avaliação do efeito da temperatura, 1 g de micropartículas de alginato de sódio a 2 e 3% (LCM S01) ou 2 mL de suspensão fúngica aquosa (LCM S01 e ARSEF 2575) a  $1 \times 10^5$  conídios/mL foram transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca e expostos em banho-maria a  $42 \pm 1$  °C por 2, 4 ou 6 h (FERNANDES et al., 2008). Os controles foram formados pelos mesmos grupos, porém foram mantidos a  $25 \pm 1$  °C. Após a exposição ou não ao calor, para avaliar a viabilidade dos conídios formulados em alginato de sódio, as micropartículas foram solubilizadas em citrato de sódio 2% (p/v) conforme já descrito. Em seguida, uma alíquota de 20 µL de micropartículas solubilizadas e suspensões aquosas fúngicas a  $1 \times 10^5$  conídios/mL foi inoculada em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo 8 mL de BDA + Cloranfenicol a 0,05% (p/v) + benomyl a 0,002% (p/v).

Placas de todos os grupos foram incubadas por 24 h no escuro a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  para avaliar a germinação dos conídios fúngicos, conforme descrito anteriormente. As porcentagens relativas de germinação foram calculadas segundo Braga et al. (2001b). O

isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* foi usado para validar os ensaios, pois possui termotolerância aos conídios conhecida (RANGEL et al., 2005). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

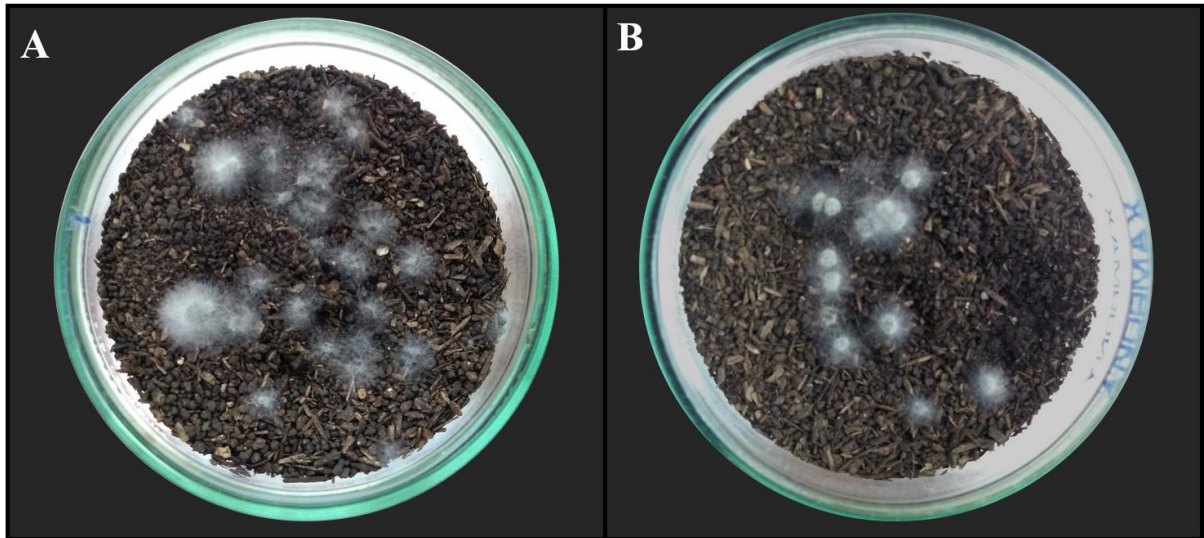
### **3.10 Avaliação da Eficácia de Conídios Formulados em Alginato de Sódio sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* pertencentes a cepa brasileira Porto alegre (POA), suscetível a acaricidas, foram coletadas do piso das baias de bovinos artificialmente infestados (Comitê de Ética no Uso de Animais/IV/UFRRJ, protocolo nº 9714220419) na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do DPA, IV, UFRRJ, Brasil. As fêmeas foram lavadas em água corrente, imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% para assepsia da cutícula e separadas em grupos homogêneos quanto ao peso (10 fêmeas por grupo). Testes prévios foram realizados a fim de determinar o tempo de esporulação dos conídios encapsulados com alginato de sódio ao serem aplicados no solo, assim como as quantidades (mg) dessas partículas fúngicas utilizadas nos experimentos com as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Para a realização dos ensaios biológicos, 30, 60 e 90 mg de micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2 e 3% foram espalhadas manualmente sobre a superfície de placas de Petri de vidro (60 × 15 mm) contendo 5 g de condicionador de solo (Natussolos do Brasil Ltda) estéril seco, previamente umedecido com 1 mL de água destilada estéril (SANTOS et al., 2021). As placas foram incubadas durante 7 dias a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  para que os conídios pudessem esporular a partir das micropartículas (Figura 2). No 3º e no 7º dia foi realizada a umidificação do solo com 100 µL de água destilada estéril. Para a formação dos grupos contendo conídios não encapsulados, no 7º dia foi acrescentado 1 mL de suspensão fúngica aquosa (Tween 80® a 0,02%) na concentração equivalente as quantidades de 30, 60 e 90 mg de micropartículas ( $2,0$ ;  $4,5$  e  $6,7 \times 10^7$  conídios/mL, respectivamente) em placas de Petri contendo solo. O solo do grupo controle foi tratado com 1 mL de solução de Tween 80® a 0,02%. Ainda no 7º dia foi acrescentada uma fêmea ingurgitada sobre o solo de cada placa, sendo estas mantidas a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  durante todo o período de avaliação do ensaio.

No final do período de postura, a massa total de ovos foi pesada e transferida para tubos de ensaio que foram vedados com algodão hidrófilo estéril e mantidos a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  até eclosão total das larvas. Os seguintes parâmetros biológicos foram analisados: peso inicial da fêmea ingurgitada; peso da postura; peso final da fêmea e percentual de eclosão larval.

Os índices de produção de ovos e nutricional (BENNETT, 1974) foram calculados. O percentual de controle (DRUMMOND et al., 1971) foi calculado em relação ao grupo controle (solução de Tween 80® a 0,02%). O percentual de controle dos grupos cujo o solo recebeu a aplicação de conídios encapsulados (micropartículas fúngicas de alginato de sódio) também foi calculado em relação aos respectivos grupos tratados com conídios não encapsulados. Os experimentos foram repetidos três vezes.



**Figura 2:** Placas de Petri contendo solo com micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2% (A) e 3% (B), após incubação durante 7 dias a  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ .

### 3.10.1 Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Após a avaliação do peso final das fêmeas utilizadas para o bioensaio, exemplares de fêmeas de cada grupo foram separadas para o reisolamento fúngico. Para isto, a cutícula das mesmas foi lavada em água corrente com o auxílio de uma escova com cerdas macias, para a remoção de material fúngico. Posteriormente, a cutícula foi esterilizada através da imersão das fêmeas, durante 2 minutos, em hipoclorito de sódio a 0,05%, álcool 70% e água destilada estéril, nesta ordem. As fêmeas foram colocadas em placas de Petri contendo algodão umedecido com água e acondicionadas a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ , até a exteriorização fúngica através da cutícula.

Posteriormente, as fêmeas foram transferidas para o meio ágar enriquecido com extrato de levedura e suplementado com cloranfenicol, tiabendazol e ciclohexamida (CTC) (FERNANDES et al., 2010b), enquanto uma amostra do material fúngico presente na superfície da cutícula foi transferida para o meio de cultura ágar acrescido de aveia. Ambos os meios estavam contidos em placas de Petri (90 × 15 mm) que foram incubadas por 14 dias, nas condições ideais para o crescimento fúngico já descritas anteriormente. O CTC é um meio seletivo para os fungos entomopatogênicos, sendo utilizado para o reisolamento fúngico a partir das fêmeas ingurgitadas. O repique no meio ágar acrescido de aveia foi realizado para observação da semelhança das características macroscópicas da colônia do isolado LCM S01 de *M. anisopliae* encapsulado, uma vez que o mesmo foi crescido neste meio. Finalmente, para observação das características dos conídios das colônias reisoladas, foram realizadas lâminas destes propágulos, que foram corados com azul de metila e observados em microscópio ( $\times 400$ ).

### 3.11 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 8.4.2. Os dados foram verificados quanto a distribuição da normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Para os dados paramétricos (tempo de prateleira; tolerância a radiação UV-B

dos conídios encapsulados e termotolerância dos conídios encapsulados) aplicou-se análise two-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. No tempo de prateleira, os grupos cujos os dados eram todos iguais a 0, foram transformados ( $\sqrt{x+0,5}$ ).

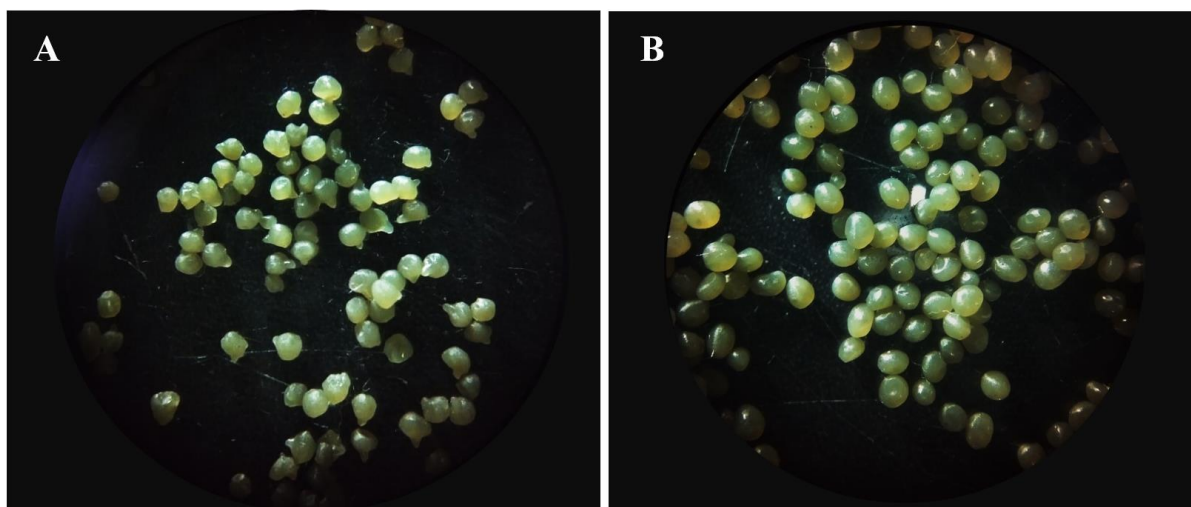
Para a comparar as médias de redução na concentração fúngica de conídios encapsulados com 2 e 3% de alginato de sódio, foi empregada a análise T test seguida pelo unpaired t test. Em relação ao bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foi utilizada a análise one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey para os dados paramétricos, e o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Duun para os dados não paramétricos.



## 4 RESULTADOS

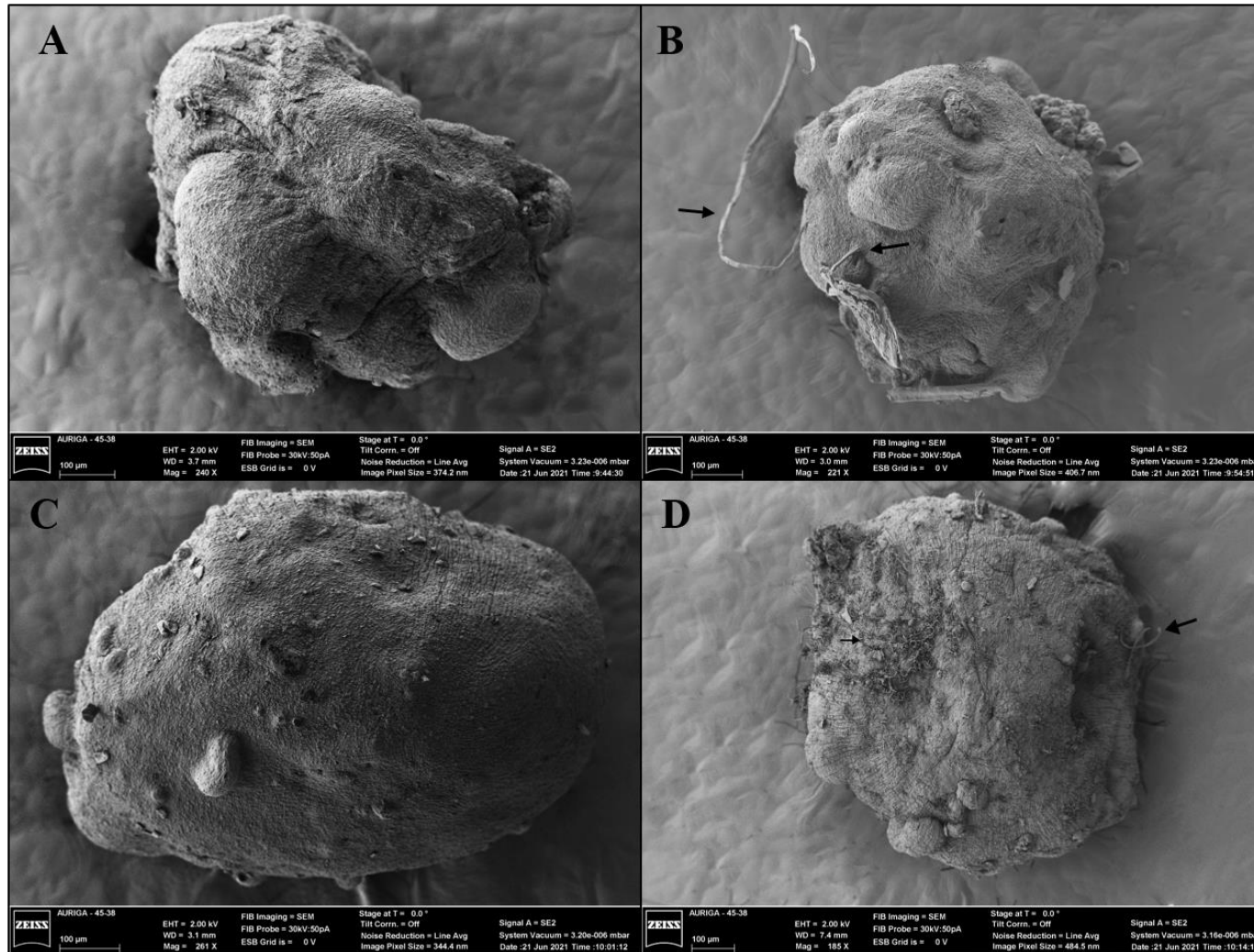
### 4.1 Morfologia Externa das Micropartículas Fúngicas

Nas observações em microscópio estereoscópico ( $\times 25$ ), as micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2 e 3% apresentaram formato esférico irregular ou regular, respectivamente. Ainda foi possível notar que as partículas de alginato de sódio a 2% eram menores (Figura 3-A) em relação as partículas confeccionadas com 3% de alginato de sódio (Figura 3-B).



**Figura 3:** Micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B), visualizadas em microscópio estereoscópico ( $\times 25$ ).

Quanto a MEV, todas as micropartículas fúngicas exibiram formato esférico e apresentaram cavidades em sua superfície. O encapsulamento em 2% alginato de sódio levou a formação de partículas com superfície mais irregular e heterogênea (Figura 4-A e B), enquanto as produzidas com 3 % exibiram superfície mais regular e homogênea (Figura 4-C e D). Sobre as partículas germinadas, poucas hifas foram observadas através das imagens. Acredita-se que a manipulação na etapa de processamento das amostras para a MEV, possa ter removido a maior parte destas estruturas fúngicas (Figura 4-B e D).



**Figura 4:** Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio. A e B: micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2%, A não germinada e B germinada; C e D micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 3%, C não germinada e D germinada. Hifas apontadas pelas setas pretas.

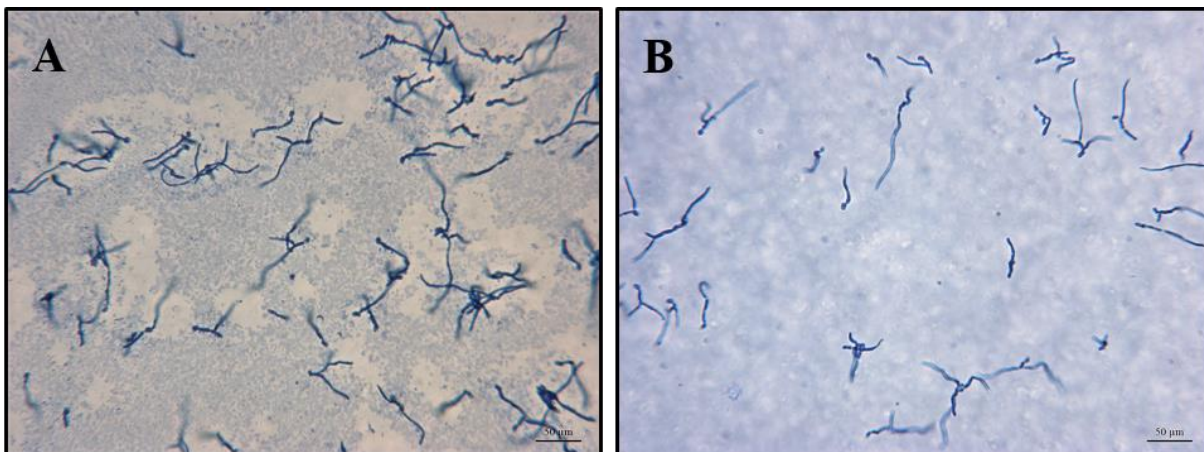
## 4.2 Eficiência do Processo de Encapsulamento

As suspensões fúngicas provenientes da solubilização das micropartículas elaboradas com 2 e 3% de alginato de sódio foram quantificadas, sendo observada uma redução média de, respectivamente, 4,5 e 5,1× na concentração de conídios em relação a suspensão inicial. Não foi observada diferença significativa na redução da concentração de conídios encapsulados com 2 e 3% de alginato de sódio (Tabela 2).

**Tabela 2:** Concentração fúngica de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com 2 e 3% de alginato de sódio, por meio de gelificação iônica.

	Concentração de conídios (conídios/mL)			
	Antes do encapsulamento	Depois do encapsulamento	Redução da concentração	Média da redução
<b>Alginato de sódio a 2%</b>	1,3×10 <sup>8</sup>	2,2×10 <sup>7</sup>	5,9×	4,5× a
	3,5×10 <sup>8</sup>	7,3×10 <sup>7</sup>	4,8×	
	1,7×10 <sup>8</sup>	5,1×10 <sup>7</sup>	3,3×	
	3,0×10 <sup>8</sup>	7,4×10 <sup>7</sup>	4,0×	
<b>Alginato de sódio a 3%</b>	1,3 10 <sup>8</sup>	2,6×10 <sup>7</sup>	5,0×	5,1× a
	3,5×10 <sup>8</sup>	6,5×10 <sup>7</sup>	5,4×	
	1,7×10 <sup>8</sup>	4,1×10 <sup>7</sup>	4,1×	
	3,0×10 <sup>8</sup>	4,9×10 <sup>7</sup>	6,1×	

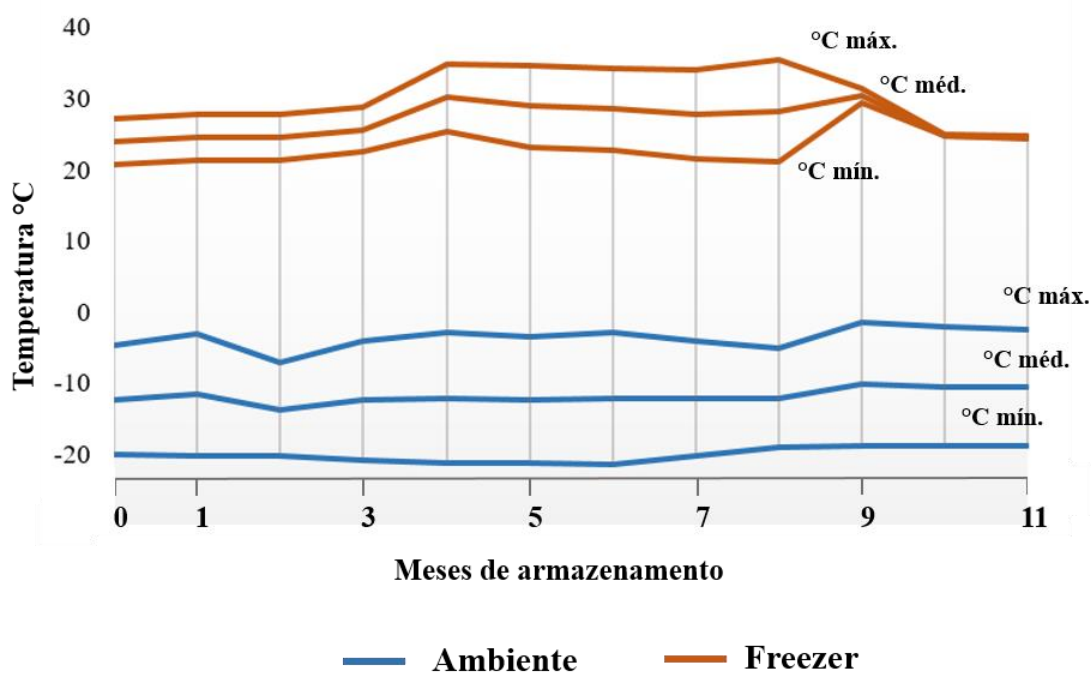
A suspensão inicial de conídios, utilizada para a elaboração das micropartículas, assim como a suspensão fúngica proveniente da solubilização das micropartículas apresentaram-se viáveis, com média de germinação fúngica dos conídios superior a 95%, demonstrando que o processo de encapsulamento por gelificação iônica, bem como o alginato de sódio a 2 e 3% não interferiram na viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* LCM S01 (Figura 5).



**Figura 5:** Conídios germinados de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B), incubados por 24 h a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  e corados com azul de metila. Ampliação de 40 $\times$ .

### 4.3 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas

Os valores médios de temperatura monitoradas durante o armazenamento em ambiente e freezer, foram 26,77 e -11,91 °C, respectivamente. No ambiente a temperatura mínima atingiu 20,70 °C, enquanto a máxima chegou a 35,36 °C. Já no armazenamento em freezer, a temperatura mínima e máxima atingiram -21,40 e 1,60 °C, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6:** Temperaturas máxima, média e mínima monitoradas durante os 11 meses de armazenamento das micropartículas fúngicas. As medições foram realizadas semanalmente.

A Tabela 3 mostra o efeito de dois fatores independentes (encapsulamento e tempo de armazenamento) sobre o percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) armazenados em temperatura ambiente ou freezer. Durante a estocagem em temperatura ambiente, foi observado um efeito significativo do encapsulamento ( $F_{2,42}= 1527$  e  $p < 0,0001$ ) e tempo de armazenamento ( $F_{6,42}= 11500$  e  $p < 0,0001$ ) sobre o percentual de germinação fúngica. A interação entre o encapsulamento e o tempo de armazenamento também teve um efeito significativo ( $F_{12,42}= 401$  e  $p < 0,0001$ ).

Em temperatura ambiente, os conídios NEC não geminaram, diferentemente dos conídios EC que apresentaram percentuais de germinação significativamente superiores até o 5º mês de armazenamento. Após 9 e 11 meses de armazenamento os conídios EC não se mantiveram viáveis. Nos 3º, 5º e 7º meses de armazenamento os conídios EC 3% apresentaram maiores percentuais de germinação em relação aos conídios EC 2%, sendo mais eficientes na preservação da viabilidade fúngica (Tabela 3).

No armazenamento em freezer, também houve efeito significativo do encapsulamento ( $F_{2,42}= 326,7$  e  $p < 0,0001$ ) e tempo de armazenamento ( $F_{6,42}= 1174$  e  $p < 0,0001$ ) sobre o percentual de germinação dos conídios fúngicos. A interação entre o encapsulamento e o tempo de armazenamento teve um efeito significativo ( $F_{12,42}= 62,34$  e  $p < 0,0001$ ) (Tabela 3).

Os conídios NEC germinaram em todos os meses de armazenamento em freezer e apresentaram viabilidade significativamente superior a dos conídios EC 2 e 3%, com exceção do 11º mês. Somente no último mês de estocagem foi observada uma maior eficiência da encapsulação com 3% de alginato de sódio na manutenção da viabilidade fúngica (Tabela 3).

De forma geral, independente de estarem encapsulados ou não, a diminuição da viabilidade dos conídios ao longo tempo foi decrescente nas duas condições de armazenamento, com exceção dos conídios NEC armazenados em freezer por 7 meses. Ainda, tanto em ambiente quanto em freezer não foram observadas diferenças significativas entre a germinação dos conídios EC 2 ou 3% na maioria dos meses de avaliação (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média e desvio padrão do percentual de germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 não encapsulados ou encapsulados em 2 ou 3% de alginato de sódio, após armazenamento por diferentes períodos de tempo.

Tempo de Armazenamento	Germinação (%)					
	Ambiente			Freezer		
	LCM S01 NEC	LCM S01 EC 2%	LCM S01 EC 3%	LCM S01 NEC	LCM S01 EC 2%	LCM S01 EC 3%
Antes do armazenamento	98,05 Aa ± 0,54	96,89 Aa ± 0,84	96,67 Aa ± 0,33	98,05 Aa ± 0,54	96,89 Aa ± 0,84	96,67 Aa ± 0,33
1 mês	0 Bb	48,22 Ab ± 0,69	49,33 Ab ± 2,08	97,67 Aa ± 0,47	90,00 Ba ± 1,15	86,78 Bb ± 1,50
3 meses	0 Cb	22,89 Bc ± 0,19	30,67 Ac ± 1,45	71,89 Ac ± 2,41	52,33 Bb ± 3,05	57,33 Bc ± 2,40
5 meses	0 Cb	14,89 Bd ± 0,51	28,56 Ac ± 2,67	70,22 Ac ± 2,55	51,11 Bb ± 3,50	51,56 Bc ± 2,14
7 meses	0 Bb	1,78 Be ± 0,77	5,56 Ad ± 1,84	82,11 Ab ± 2,67	37,78 Bc ± 4,07	36,22 Bd ± 4,72
9 meses	0 Ab	0 Ae	0 Ae	57,22 Ad ± 1,57	30,22 Bd ± 1,68	35,56 Bd ± 1,92
11 meses	0 Ab	0 Ae	0 Ae	19,89 Be ± 1,50	24,78 Bd ± 1,35	33,11 Ad ± 0,38

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas do mesmo bloco, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

A tabela 4 mostra o efeito de dois fatores independentes (encapsulamento e temperatura de armazenamento) sobre o percentual de germinação de conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) armazenados pelo período de tempo avaliado. Em cada mês de avaliação, foram observados efeitos significativos do encapsulamento e da temperatura de armazenamento sobre o percentual de germinação fúngica. A interação entre o encapsulamento e a temperatura de armazenamento também teve um efeito significativo em todos os meses de avaliação.

Quando armazenados em freezer, os conídios NEC germinaram em todos os meses de armazenamento, apresentando percentuais de germinação significativamente maiores que os conídios NEC armazenados em ambiente, que não permaneceram viáveis. Em relação aos conídios EC, o armazenamento em freezer também foi mais eficiente na manutenção da viabilidade em relação ao armazenamento em ambiente, promovendo significativo aumento da germinação fúngica (Tabela 4).

Após 3 e 5 meses de armazenamento em ambiente, o encapsulamento com 3% de alginato de sódio promoveu germinação significativamente maior que o encapsulamento co

2%, enquanto que em freezer estas diferenças foram observadas no 9º e 11º meses de armazenamento (Tabela 4).

**Tabela 4:** Média e desvio padrão do percentual de germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (LCM S01) não encapsulados ou encapsulados em 2 ou 3% de alginato de sódio, após o armazenamento em temperatura ambiente ou freezer.

Tempo de Armazenamento	Condição de armazenamento	Germinação (%)		
		LCM S01 NEC	LCM S01 EC 2%	LCM S01 EC 3%
1 mês	Ambiente	0 Bb	48,22 Ab ± 0,69	49,33 Ab ± 2,08
	Freezer	97,67 Aa ± 0,47	90,00 Ba ± 1,15	86,78 Ba ± 1,50
3 meses	Ambiente	0 Cb	22,89 Bb ± 0,19	30,67 Ab ± 1,45
	Freezer	71,89 Aa ± 2,41	52,33 Ba ± 3,05	57,33 Ba ± 2,40
5 meses	Ambiente	0 Cb	14,89 Bd ± 0,51	28,56 Ac ± 2,67
	Freezer	70,22 Aa ± 2,55	51,11 Bb ± 3,50	51,56 Bc ± 2,14
7 meses	Ambiente	0 Ab	1,78 Ab ± 0,77	5,56 Ab ± 1,84
	Freezer	82,11 Aa ± 2,67	37,78 Ba ± 4,07	36,22 Ba ± 4,72
9 meses	Ambiente	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	Freezer	57,22 Aa ± 1,57	30,22 Ca ± 1,68	35,56 Ba ± 1,92
11 meses	Ambiente	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	Freezer	19,89 Ca ± 1,50	24,78 Ba ± 1,35	33,11 Aa ± 0,38

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas do mesmo bloco, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

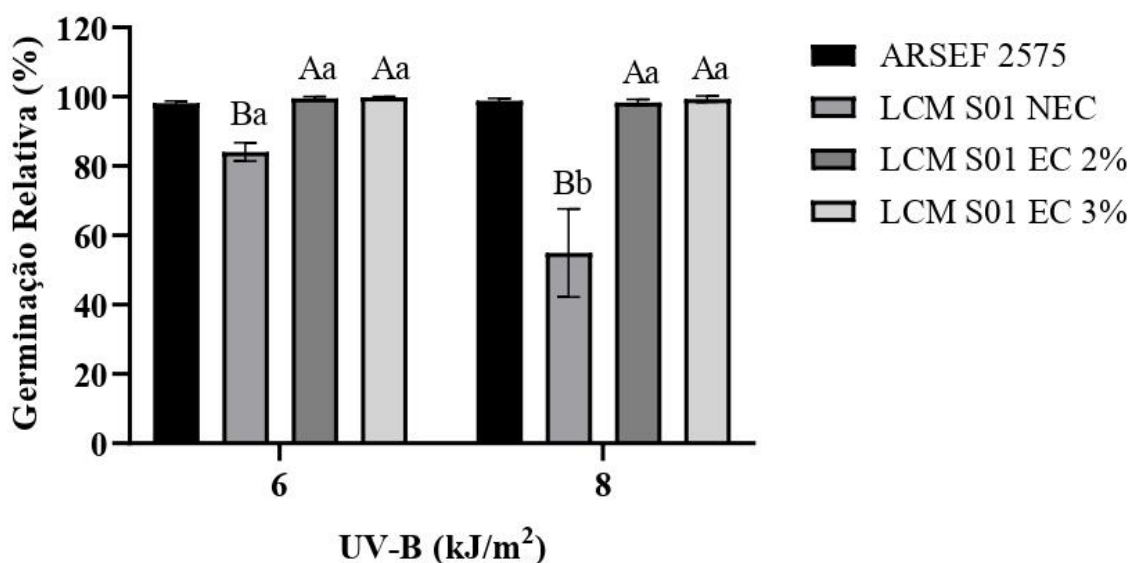
#### 4.4 Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados

A Figura 7 mostra o efeito de dois fatores independentes (encapsulamento e dose de irradiação UV-B) sobre a germinação relativa dos conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) após incubação por 24 horas. Houve um efeito significativo do encapsulamento ( $F_{2,12} = 62,31$  e  $p < 0,0001$ ) e dose de irradiação UV-B ( $F_{1,12} = 16,82$  e  $p < 0,0015$ ) sobre o percentual de germinação. A interação entre o encapsulamento e a dose de UV-B também teve um efeito significativo ( $F_{2,12} = 14,02$  e  $p = 0,007$ ) (Figura 7).

A exposição à ambas as doses de irradiação UV-B reduziu significativamente a viabilidade dos conídios de LCMS01 NEC em relação aos conídios EC 2 e 3% de alginato de sódio, que exibiram germinação próxima a 100%. Não foram observadas diferenças significativas na germinação entre os conídios de LCM S01 EC 2 e 3% de alginato de sódio quando expostos a uma mesma dose de UV-B ou quando expostos a doses diferentes (6,0 ou 8,0  $\text{kJ m}^{-2}$ ) (Figura 7).

Os conídios de LCM S01 NEC expostos à 8 kJ de UV-B tiveram a germinação significativamente prejudicada ( $54,98 \pm 12,71\%$ ) em comparação aos conídios de LCM S01 NEC expostos à 6 kJ ( $84,09 \pm 2,63\%$ ;  $p < 0,0002$ ). O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* apresentou tolerância a irradiação UV-B dentro dos padrões esperados, validando os experimentos (BRAGA; FLINT; MESSIAS; *et al.*, 2001) (Figura 7).

O encapsulamento em alginato de sódio a 2 ou 3% forneceu proteção aos conídios de *M. anisopliae* LCM S01 contra os efeitos da exposição à irradiação UV-B (6,0 ou 8,0  $\text{kJ m}^{-2}$ ).



**Figura 7:** Média e desvio padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados ou não após exposição à UV-B (6.0 ou 8.0 kJ/m<sup>2</sup>). O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* foi usado como isolado padrão. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos, expostos a mesma dose de UV-B, e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, expostos a diferentes doses de UV-B, não diferem estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ).

#### 4.5 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados

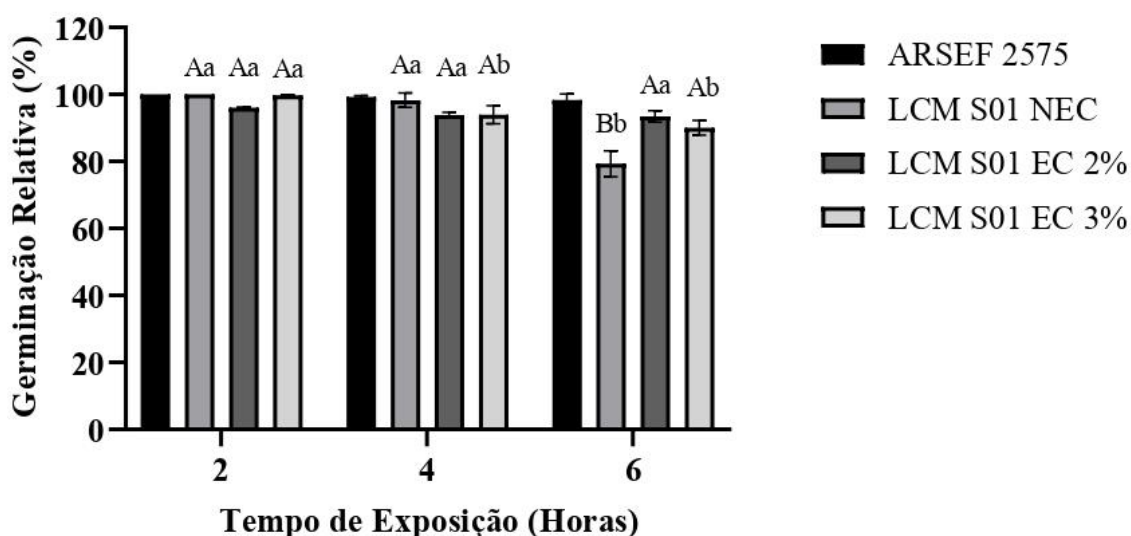
A Figura 8 apresenta o efeito de dois fatores independentes (encapsulamento e tempo de exposição ao calor) sobre a germinação relativa de conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) após incubação por 24 horas. Foi observado um efeito significativo somente do tempo de exposição ao calor ( $F_{2,18} = 73,42$  e  $p < 0,0001$ ) sobre o percentual de germinação. A interação entre o encapsulamento e o tempo de exposição ao calor também produziu um efeito significativo ( $F_{4,18} = 23,72$  e  $p < 0,0001$ ) (Figura 8).

Não houve diferença entre conídios de LCM S01 não encapsulados e encapsulados quando expostos a 42 °C por 2 ou 4 h. No entanto quando expostos por 6 h os conídios de LCM S01 EC 2% ( $93,46\% \pm 1,72$ ;  $p < 0,0001$ ) e EC 3% ( $90,08 \pm 2,18\%$ ;  $p < 0,0001$ ) apresentaram maior germinação quando comparados aos conídios de LCM S01 NEC ( $79,33 \pm 3,84\%$ ) (Figura 8).

A exposição dos conídios de LCM S01 NEC à 42 °C por 6 h diminuiu ( $79,33\% \pm 3,84$ ) significativamente a germinação relativa em comparação com a exposição durante 2 (100%;  $p < 0,0001$ ) ou 4 h ( $98,29 \pm 2,13\%$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 8).

No grupo LCM S01 EC 2% não foi observada diferença significativa na germinação dos conídios quando expostos ao calor nos diferentes tempos de exposição. A germinação dos conídios de LCM S01 EC 3% expostos ao calor por 4 e 6 h foi menor significativamente em comparação com a exposição por 2 horas. Nas diferentes horas de exposição ao calor, não ocorreu diferença estatística entre os conídios de LCM S01 EC2 e 3% (Figura 2). Os experimentos foram validados uma vez que o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* apresentou termotolerância dentro dos padrões esperados (RANGEL et al., 2005) (Figura 8).





**Figura 8:** Média e desvio padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados ou não após exposição à 42 °C por 2, 4 ou 6 horas. O isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* foi usado como isolado padrão. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos, expostos durante o mesmo tempo, e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, expostos por diferentes tempos, não diferem estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ).

#### 4.6 Avaliação da Eficácia de Conídios Formulados em Alginato de Sódio sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Não houve diferença estatística no peso inicial das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* entre os grupos avaliados, então alterações observadas nos demais parâmetros biológicos foram atribuídas ao tratamento com as partículas fúngicas. No que se refere ao peso da massa de ovos, as fêmeas tratadas com diferentes quantidades (30, 60 e 90 mg), dos conídios EC 2 e 3% de alginato de sódio produziram menor quantidade de ovos em comparação com as fêmeas dos grupos que receberam as concentrações correspondentes de conídios NEC e ao grupo controle. Mesmo não havendo diferença significativa entre as diferentes concentrações de alginato de sódio, as fêmeas do grupo tratado com 60 mg de conídios EC 3% produziram menor quantidade de ovos, diminuindo em média 81,9% ( $p=0,0021$ ) e 84,4% ( $p < 0,0001$ ) o peso da postura em comparação com as fêmeas tratadas com os conídios NEC e Tween 80<sup>®</sup> a 0,02%, respectivamente (Tabela 5).

As fêmeas ingurgitadas dos grupos que receberam 30 ou 90 mg de conídios EC com ambas as concentrações de alginato de sódio apresentaram IPO e IN menores em relação as fêmeas dos grupos que receberam conídios NEC e Tween 80<sup>®</sup> a 0,02%, entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos com conídios EC 2 ou 3%. As fêmeas tratadas com 60 mg de conídios EC 3% produziram menor IPO ( $8,7 \pm 14,9\%$ ) e IN ( $22,0 \pm 28,5\%$ ) quando comparadas com as fêmeas dos grupos que receberam conídios NEC, cujos os valores de IPO e IN são, respectivamente,  $51,4 \pm 3,5\%$  ( $p=0,0069$ ) e  $66,1 \pm 7,0\%$  ( $p=0,0386$ ). Quanto ao percentual de eclosão das larvas, houve diferença estatística somente entre o grupo em que foi realizada a aplicação de 30 mg de conídios EC 3% ( $80,7 \pm 13,4\%$ ) e o controle ( $97,6 \pm 1,9\%$ ;  $p=0,0217$ ). (Tabela 5).

As micropartículas contendo conídios EC 2% produziram percentuais de controle que variaram de 65,3 a 71,6% e 56,3 a 65,0% quando calculados em relação ao grupo CTR e ao

grupo de conídios NEC, respectivamente, sendo sempre superiores a 50% mesmo quando aplicados na menor quantidade (30 mg). Os percentuais de controle dos conídios EC 3% variaram de 43 a 72,6% e 30,3 a 64,9% quando calculados em relação ao grupo CTR e ao grupo de conídios NEC. Aplicados em diferentes quantidades, os conídios NEC apresentaram percentuais de controle que variaram entre 18,1 e 21,9% quando calculados em relação ao grupo CTR. Independente das quantidades utilizadas, os grupos tratados com conídios EC 2 ou 3% apresentaram maior percentual de controle quando comparados com os grupos tratados com diferentes concentrações de conídios NEC (Tabela 5). Nos grupos onde foram aplicados conídios encapsulados com 2 ou 3% de polímero, foi possível observar fêmeas mortas e colonizadas com o fungo a partir de 5 dias após o início do experimento, enquanto nos demais grupos a morte das fêmeas só foi observada após 10 dias de tratamento (Figura 9).

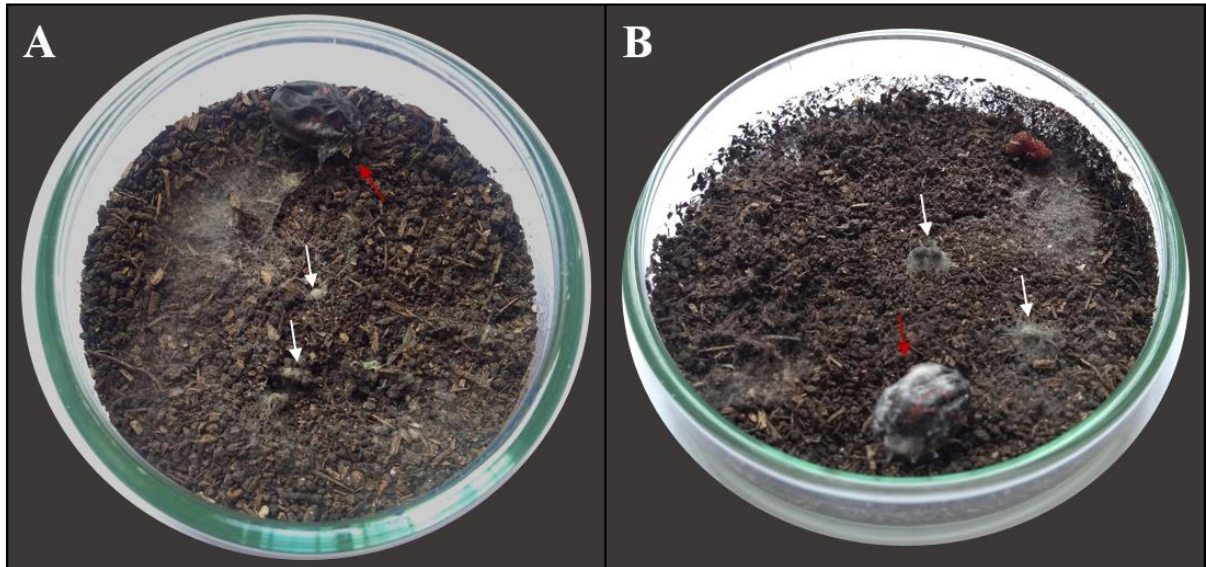
Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas entre os grupos tratados com conídios não encapsulados e as diferentes concentrações fúngicas, e entre os grupos tratados com conídios encapsulados com a mesma concentração de alginato de sódio e as diferentes quantidades de partículas.

**Tabela 5:** Média e desvio padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas às diferentes doses dos conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados ou não em 2 ou 3% de alginato de sódio.

Grupos	Peso Inicial das Fêmeas (mg)	Peso da Massa de Ovos (mg)	IPO (%)	IN (%)	Eclosão das Larvas (%)	% CONTROLE CTR	% CONTROLE NEC
<b>CTR</b>	283,0 a ± 28,1	167,9 a ± 18,0	59,3 a ± 2,1	83,0 a ± 3,0	97,6 a ± 1,9	-	-
<b>LCM S01 NEC (2,0×10<sup>7</sup>)</b>	281,3 a ± 27,8	145,8 a ± 16,9	52,0 a ± 5,1	68,0 a ± 7,5	90,5 ab ± 13,7	18,1	-
<b>LCM S01 EC 2% 30 mg</b>	200,8 a ± 28,1	53,6 b ± 48,3	20,0 b ± 19,5	34,9 b ± 20,9	83,8 ab ± 23,9	65,3	57,6
<b>LCM S01 EC 3% 30 mg</b>	281,0 a ± 29,2	81,4 b ± 68,2	28,8 b ± 23,1	38,6 b ± 29,4	80,7 b ± 13,4	43,0	30,3
<b>CTR</b>	283 a ± 28,1	167,9 a ± 18,0	59,3 a ± 2,3	83,0 a ± 3,0	97,6 a ± 1,9	-	-
<b>LCM S01 NEC (4,5×10<sup>7</sup>)</b>	281,0 a ± 28,5	144,6 a ± 19,7	51,4 ab ± 3,5	66,1 ab ± 7,0	87,9 a ± 13,3	21,9	-
<b>LCM S01 EC 2% 60 mg</b>	280,90 a ± 29,9	49,7 b ± 43,0	18,4 bc ± 16,6	31,3 bc ± 24,4	78,7 a ± 19,6	65,8	56,3
<b>LCM S01 EC 3% 60 mg</b>	280,90 a ± 28,3	26,2 b ± 46,8	8,7 c ± 14,9	22,0 c ± 28,5	79,0 a ± 22,5	72,6	64,9
<b>CTR</b>	283,0 a ± 28,1	167,9 a ± 18,0	59,3 a ± 2,1	83,0 a ± 3,0	97,6 a ± 1,9	-	-
<b>LCM S01 NEC (6,7×10<sup>7</sup>)</b>	280,3 a ± 29,6	141,9 a ± 26,2	51,0 a ± 9,1	72,1 a ± 9,4	91,6 a ± 12,7	19,0	-
<b>LCM S01 EC 2% 90 mg</b>	279,8 a ± 29,0	43,9 b ± 42,3	15,8 b ± 14,5	26,7 b ± 18,1	66,2 a ± 31,2	71,6	65,0
<b>LCM S01 EC 3% 90 mg</b>	281,4 a ± 29,7	47,1 b ± 42,5	16,8 b ± 15,2	27,8 b ± 21,6	83,7 a ± 15,7	71,4	64,6

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna e no mesmo bloco não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

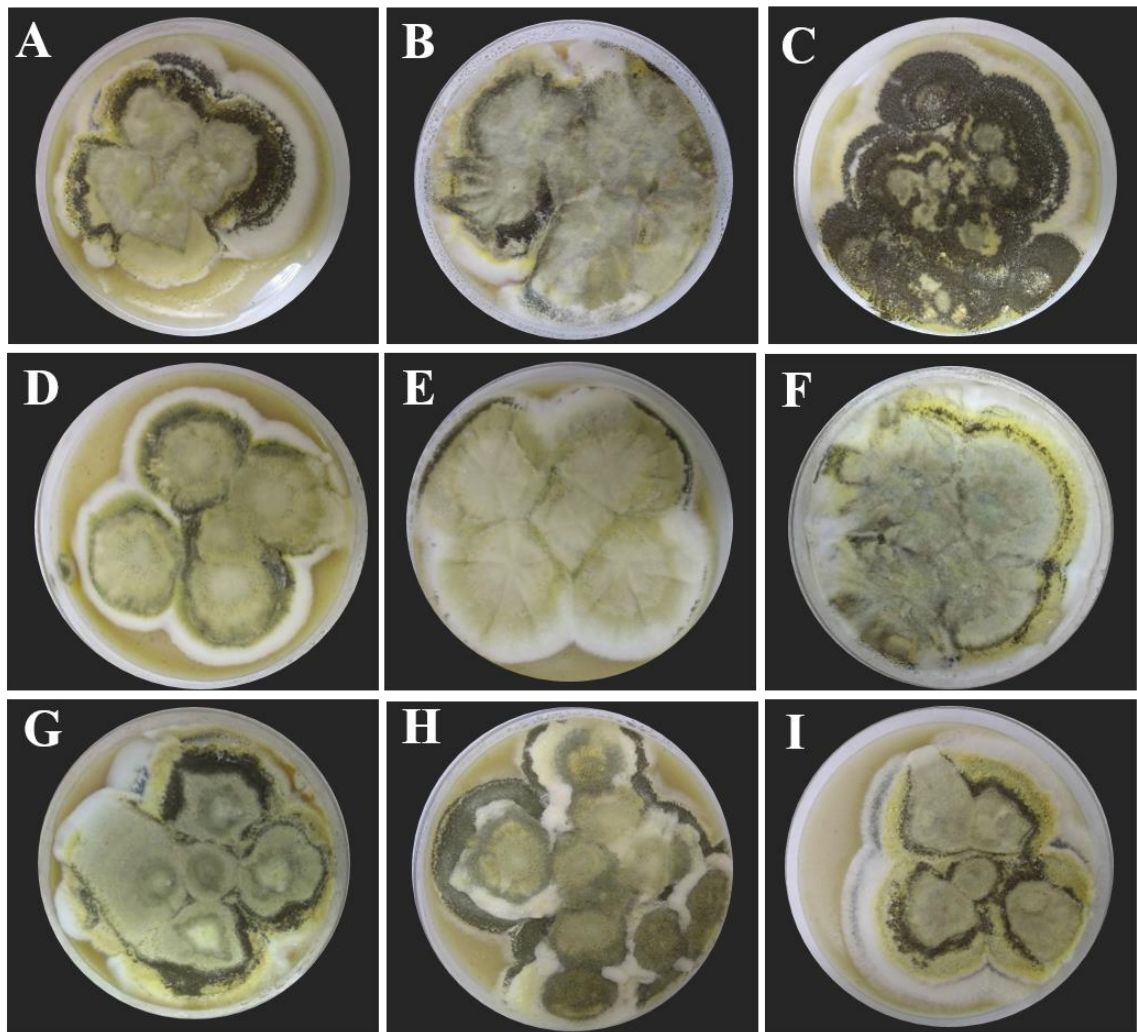
IPO: Índice de Produção de Ovos; IN: Índice Nutricional.



**Figura 9:** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* sobre o solo contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 esporulados a partir de micropartículas fúngicas de alginato de sódio a 2 (A) e 3% (B). As setas brancas apontam as partículas fúngicas e as setas vermelhas apontam as fêmeas colonizadas e mortas pelo fungo.

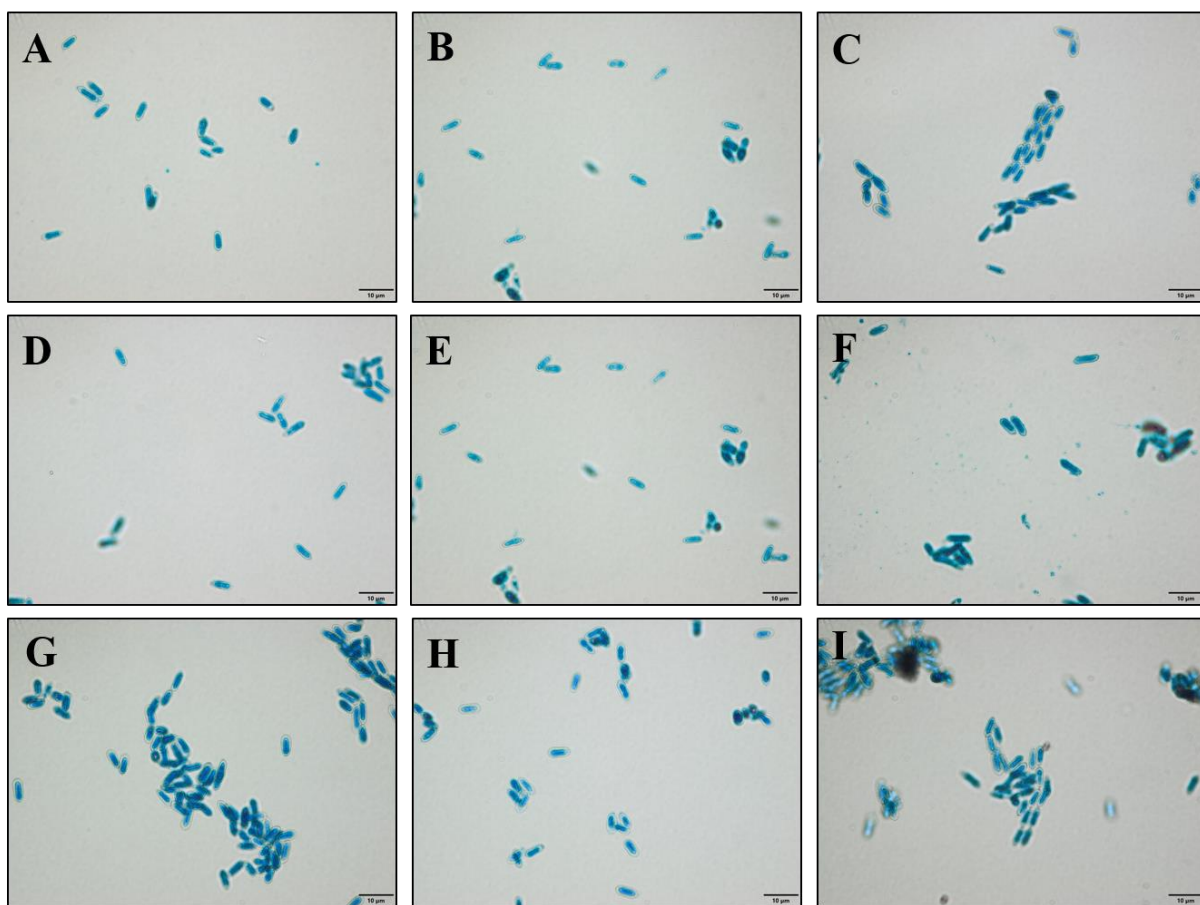
#### 4.6.1. Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Em relação ao reisolamento de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir do bioensaio, foi possível observar que as colônias crescidas em meio de cultura ágar acrescido de aveia, apresentaram características macroscópicas semelhantes entre si e ao isolado LCM S01 utilizado para a elaboração das micropartículas (Figura 10).



**Figura 10:** Colônias de *Metarhizium anisopliae* reisolados de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Conídios não encapsulados a  $2,0 \times 10^7$  (A);  $4,5 \times 10^7$  (B) e  $6,7 \times 10^7$  conídios/mL (C). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 2% aplicados na quantidade de 30 (D), 60 (E) e 90 mg (F). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 3% aplicados na quantidade de 30 (G), 60 (H) e 90 mg (I).

As imagens microscópicas dos conídios obtidos a partir das colônias reisoladas de fêmeas ingurgitadas mostraram conídios com o formato cilíndrico característicos de *Metarhizium* spp., em todos os grupos que compõem o bioensaio. Desta forma, em associação às características macroscópicas das colônias, é possível sugerir que a esporulação de conídios do isolado LCM S01 de *M. anisopliae*, a partir da superfície das micropartículas permitiu a colonização do solo e a posterior infecção das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Figura 11).



**Figura 11:** Conídios oriundos das colônias de *Metarhizium anisopliae* reisoladas de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Conídios não encapsulados a  $2,0 \times 10^7$  (A);  $4,5 \times 10^7$  (B) e  $6,7 \times 10^7$  conídios/mL (C). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 2% aplicados na quantidade de 30 (D), 60 (E) e 90 mg (F). Conídios encapsulados com alginato de sódio a 3% aplicados na quantidade de 30 (G), 60 (H) e 90 mg (I). Ampliação de 100 $\times$ .

## 5 DISCUSSÃO

O emprego de novas abordagens tecnológicas na elaboração de formulações contribuem para que a implementação de programas de biocontrole de carrapatos no Brasil, utilizando fungos entomopatogênicos, se torne realidade. Assim, acreditamos que o presente estudo possa favorecer o desenvolvimento, financeiramente viável, de produtos a base de fungos entomopatogênicos que além de possuir virulência contra *Rhipicephalus microplus*, sejam estáveis frente aos fatores ambientais, contribuindo efetivamente para a aplicação do controle biológico do carrapato a campo.

As micropartículas de alginato de sódio contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 encapsulados, produzidas neste estudo, apresentaram formato esférico, o que está de acordo com a literatura, pois o método de extrusão por gotejamento normalmente produz partículas esféricas (VEMMER; PATEL, 2013). Além disso, as cavidades presentes na superfície das mesmas podem ter sido em consequência do processo de secagem e/ou da preparação das amostras para a realização da microscopia. Esses resultados corroboram com Locatelli et al. (2018) e Maruyama et al. (2020) que encapsularam *Trichoderma* sp. também por meio da técnica de gelificação iônica, sendo que o último, além de utilizar o alginato de sódio isolado, o associou com um ou mais polímeros.

O presente estudo demonstrou que o encapsulamento de *M. anisopliae* reduziu 4,8× a concentração de conídios em relação a suspensão inicial utilizada para a elaboração das micropartículas. Rodrigues et al. (2017) observaram uma maior redução na concentração de conídios de *M. anisopliae*, cerca de 10×, após o encapsulamento também em alginato de sódio por meio do método de gelificação iônica. Apesar desta diferença, ambos os estudos verificaram que o processo de encapsulamento não afetou a viabilidade fúngica. A gelificação iônica é uma técnica simples que não envolve a aplicação de altas temperaturas, o que é uma vantagem em relação a preservação da viabilidade fúngica após o processo de encapsulamento. Neste contexto, Acuña-Jiménez et al. (2015); Liu, Liu (2009a); Muñoz-Celaya et al. (2012) observaram que altas temperaturas empregadas no método de encapsulamento por spray drying reduziram a viabilidade fúngica. No entanto, mesmo utilizando a técnica de gelificação iônica, Locatelli et al. (2018) constataram que o tipo de polímero pode afetar negativamente a viabilidade dos conídios de *Trichoderma* sp. encapsulados. Desta forma, a escolha da técnica e do material de revestimento utilizados no processo de encapsulamento fúngico é crucial, principalmente no ponto de vista econômico, uma vez que a aplicação de técnicas que diminuem a viabilidade do fungo e/ou levam a grandes perdas de propágulos demandariam maior quantidade de biomassa fúngica, elevando o custo do produto final.

O tempo de prateleira é um dos principais obstáculos para a comercialização de produtos utilizados no controle biológico, visto que sob armazenamento, a viabilidade de diferentes microrganismos diminui com temperaturas entre 4 e 37°C (revisado por FU; CHEN, 2011). Em temperatura ambiente, os conídios não encapsulados não germinaram, diferente dos conídios encapsulados que apresentaram germinação durante os 11 meses de armazenamento, mostrando que o encapsulamento atuou na preservação da viabilidade fúngica, assim como observado por Liu, Liu (2009b), Pereira; Roberts (1991), Przklenk et al. (2017) e Vemmer; Patel (2013). O estudo em questão mostrou que as micropartículas apresentaram perdas significativas na viabilidade ao longo do tempo de armazenamento nas condições de temperatura avaliadas. Por outro lado, Rodrigues et al. (2017) mostraram que micropartículas de alginato de sódio contendo conídios de *Beauveria bassiana* encapsulados se mantiveram viáveis mesmo após 12 meses de armazenamento em ambiente ou freezer. Estas divergências nos resultados podem ter ocorrido devido à diferentes concentrações de polímero ou CaCl<sub>2</sub> utilizadas ou ainda às diferentes formas de secagem aplicadas.

Embora o armazenamento de fungos entomopatogênicos em ambiente exija menos recursos que em baixas temperaturas, não é a estratégia de preservação mais confiável (HUMBER, 2012). Desta forma, nós observamos que em freezer os conídios encapsulados ou não apresentaram maior viabilidade do que em temperatura ambiente. No entanto, em freezer, a viabilidade dos conídios encapsulados foi menor quando comparada aos conídios não encapsulados, diferentemente dos estudos de Rodrigues et al. (2017) que observaram que os conídios encapsulados apresentaram maior vida útil de armazenamento. Acreditamos que o processo de secagem das partículas possa não ter sido o suficiente e que a umidade restante possa ter prejudicado o armazenamento em freezer ao invés de ter favorecido. Sugerimos este fato, uma vez que a secagem eficiente de um bioproduto está associada a diminuição da atividade de água que, além de melhorar a estabilidade, pode aumentar a vida útil das células (FU; CHEN, 2011; MORGAN et al., 2006).

A exposição à irradiação UV-B excessiva leva a redução da viabilidade de fungos entomopatogênicos, limitando sua aplicação como agentes de biocontrole em condições naturais (BRAGA; FLINT; MESSIAS et al., 2001; JARONSKI, 2010). A irradiação UV-B é absorvida diretamente pelo o DNA das células, levando a reações de degradação que resultam na formação de dímeros de pirimidina (NASCIMENTO et al., 2010). Assim, a barreira física promovida pela a matriz encapsulante pode atuar na proteção da célula encapsulada contra os danos ao DNA induzidos pela exposição á UV-B. Neste cenário, o presente estudo demonstrou que o encapsulamento com 2 ou 3% de alginato de sódio promoveu proteção aos conídios encapsulados contra a irradiação UV-B, que apresentaram germinação próxima a 100%, diferente dos conídios não encapsulados, que germinaram 84% e 55% quando expostos a 6 ou 8 kJ m<sup>-2</sup> de UV-B, respectivamente. Qiu et al. (2019) observaram que a encapsulação em gelatina e 2% de goma arábica, através do método de coacervação complexa, aumentou a tolerância de conídios de *M. anisopliae* a exposição à UV-B por 3 horas. Maruyama et al. (2020) ao investigaram a fotoestabilidade de conídios de *Trichoderma harzianum* encapsulados em 2% de alginato de sódio por gelificação iônica, após exposição à UV-A e UV-B, constaram através de observações macroscópicas do crescimento fúngico em meio de cultura, que o fungo encapsulado foi mais resistente. Apesar das diferenças metodológicas e/ou das diferentes espécies fúngicas, assim como o presente estudo, esses resultados confirmam o papel do encapsulamento na proteção de microrganismos contra os efeitos deletérios da exposição à doses excessivas de irradiação ultravioleta.

Além de afetar negativamente a viabilidade, a exposição à altas temperaturas pode interferir no processo de infecção de fungos entomopatogênicos (ZIMMERMANN, 2007a). O estresse dos conídio induzido pela ação da temperatura envolve a inibição de processos metabólicos, desnaturação de proteínas e desorganização da membrana (PAIXÃO; FERNANDES; PEDRINI, 2019). Desta forma, o encapsulamento numa matriz polimérica pode preservar o conídio fúngico das ações da exposição à temperaturas elevadas, contribuindo, assim, para o sucesso do processo de infecção do hospedeiro e o aumento da sobrevivência desses entomopatógenos quando submetidos à condições naturais. Em nossas análises, os conídios de *M. anisopliae* formulados em alginato de sódio foram mais termotolerantes quando comparados aos conídios não formulados após 6 horas de exposição à 42 °C. Barreto et al. (2016) verificaram que, em todos os tempos de exposição (2, 4 ou 6 horas) os conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. foram mais tolerantes a 45 °C quando formulados em óleo mineral puro do que quando suspensos em solução de Tween 80<sup>®</sup>. As diferenças podem ser em decorrência dos diferentes isolados fúngicos utilizados e/ou das diferentes formulações fúngicas avaliadas em cada trabalho.

Estudos demonstraram a eficácia de formulações oleosas a base de *Metarhizium spp.* no controle da fase parasitária de carrapatos através da aplicação direta nos animais estabulados (CAMARGO et al., 2014) ou alocados em piquetes, a campo (CAMARGO et al.,



2016; KAAYA et al., 2011). No entanto, estima-se que 95% da população do carrapato *R. microplus* encontra-se na pastagem (POWELL; REID, 1982), então, a aplicação dos fungos entomopatogênicos na pastagem visando o controle biológico da fase não parasitária e das fêmeas ingurgitadas presentes no solo pode ser uma abordagem interessante e promissora (MARCIANO et al., 2021, 2020; MESQUITA et al., 2020). Além de aumentar a estabilidade e a vida útil do microrganismo encapsulado no ambiente, o uso de formulações granulares permite facilidade de manuseio, assim como a redução do número de aplicações e da biomassa do conteúdo utilizado (VEMMER; PATEL, 2013).

Nesse âmbito, o presente estudo testou, em condições laboratoriais, a eficácia da aplicação diretamente no solo de diferentes quantidades de micropartículas de 2 ou 3% de alginato de sódio no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Observamos que os conídios encapsulados foram capazes de reduzir o peso da massa de ovos, os índices nutricional e de produção de ovos, e também o percentual de eclosão das larvas em relação aos conídios NEC e o grupo controle. As partículas produziram percentuais de controle superiores a 60%, maior que os conídios não encapsulados cujos percentuais de controle foram inferiores a 22%. De modo geral, não houveram diferenças significativa entre os conídios EC 2 ou 3%. Lorenz, Humbert e Patel (2020) investigaram que a aplicação de blastosporos de *Metarhizium pempighi* em 2% de alginato de cálcio acrescido de 15% de amido de milho ou 15% de quitina, causou 100% de mortalidade em ninfas de *Ixodes ricinus*, mostrando que o encapsulamento por meio da gelificação iônica também é eficaz contra uma diferente espécie de carrapato.

Observamos que o tratamento com 30 mg de conídios encapsulados com 3% de alginato de sódio produziu uma redução significativa na eclosão das larvas de *R. microplus*. Apesar de não haver diferença significativa, todos os demais grupos de micropartículas foram capazes de diminuir este parâmetro em relação aos conídios não encapsulados e ao grupo controle. Corroborando com nossos resultados, estudos demonstraram que, quando aplicados no solo, pellets de microescleródios de *M. anisopliae* sob condições laboratoriais (SANTOS et al., 2021), assim como de formulações granulares de microescleródios ou blastosporos de *M. robertsii* sob condições semi-naturais (MARCIANO et al., 2021), reduziram significativamente o número de larvas eclodidas de *R. microplus*.

O processo de encapsulamento por gelificação iônica com alginato a 2 e 3% contribuiu para o aumento da vida útil de armazenamento em ambiente, assim como da termotolerância e tolerância à UV-B de conídios de LCM S01 de *M. anisopliae* encapsulados. Além disso, as micropartículas elaboradas foram eficazes no controle, em laboratório, de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Desta forma, o presente estudo, através da tecnologia de encapsulamento, traz inovações para a produção de bioprodutos a base de fungos entomopatogênicos, contribuindo para que a utilização desses entomopatógenos se torne uma alternativa viável e aplicada na prática do controle do carrapato *R. microplus*.

## 6 CONCLUSÕES

A formulação de conídios de *Metarhizium anisopliae* LCM S01 em alginato de sódio a 2 e 3%, por meio da técnica de gelificação iônica, produz partículas esféricas com superfície mais heterogênea ou homogênea, respectivamente.

O encapsulamento com 2 e 3% de alginato de sódio, através do método de gelificação iônica, ocasiona pouca perda de conídios de *M. anisopliae* LCM S01 e manteve a viabilidade deste propágulo fúngico.

O armazenamento em freezer é mais eficiente na preservação da viabilidade fúngica de conídios de *M. anisopliae* LCM S01 encapsulados e não encapsulados.

Em ambiente, encapsulamento com 2 e 3% de alginato de sódio aumenta a vida útil dos conídios de *M. anisopliae* LCM S01 encapsulados quando comparados aos conídios não encapsulados. Em freezer o encapsulamento em alginato de sódio não é eficaz na manutenção da viabilidade dos conídios encapsulados em relação aos conídios não encapsulados.

O encapsulamento com 2 e 3% de alginato de sódio promove proteção aos conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) encapsulados contra à exposição a 42 °C por 6 horas.

O encapsulamento com 2 e 3% de alginato de sódio promove proteção aos conídios de *M. anisopliae* (LCM S01) encapsulados contra à exposição à doses de 6.0 ou 8.0 kJ m<sup>-2</sup> de irradiação UV-B.

Em condições laboratoriais, a aplicação das micropartículas de conídios de *M. anisopliae* LCM S01 encapsulados com alginato de sódio a 2 e 3% apresenta eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

As diferenças entre a encapsulação de conídios de *M. anisopliae* LCM S01 com diferentes concentrações de alginato de sódio não é significativa, com exceção em determinados meses de avaliação do tempo de prateleira.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, F. M.; BERNARDO, C. C.; PAIXÃO, F. R.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FERNANDES, É. K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (in vitro) and virulence (in vivo) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology research**, v. 116, n. 1, p. 111-121, 2016.
- ACUÑA-JIMÉNEZ, M.; ROSAS-GARCÍA, N. M.; LÓPEZ-MEYER, M.; SAÍNZ-HERNÁNDEZ, J. C.; MUNDO-OCAMPO, M.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C. Pathogenicity of microencapsulated insecticide from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius). **Southwestern Entomologist**, v. 40, n. 3, p. 531–538, 2015.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ: [s. n.], 1998.
- AW, K. M. S.; HUE, S. M. Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, 2017.
- ALVES, S. B.; RISCO, S. H.; ALMEIDA, L. C. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v. 97, n. 1-5, p. 127-129, 1984.
- BARRETO, L. P.; LUZ, C.; MASCARIN, G. M.; ROBERTS, D. W.; ARRUDA, W.; FERNANDES, É. K.K. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 138, p. 94–103, 2016.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE): influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, p. 52–61, 1974.
- BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 129, n. S171, p. 213–224, 1997.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.
- BITENCOURT, R. O. B.; DOS SANTOS MALLETT, J. R.; MESQUITA, E.; GÓLO, P. S.; FIOROTTI, J.; BITTENCOURT, V. E. P.; PONTES, E. G.; ANGELO, I. C. Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. **Acta Tropica**, v. 213, 2021.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Rev Univ Rural Ser Cienc Vida**, v. 16, p. 41–47, 1994.
- BOKKHIM, H.; NEUPANE, P.; GURUNG, S.; SHRESTHA, R. Encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* in alginate beads and its application for wine making. **Journal of Food Science and Technology Nepal**, v. 10, p. 18–23, 2018.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 140, 2001a.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability and Delay Germination in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 74, n. 5, p. 734, 2001b.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; FLINT, S. D.; ROBERTS, D. W. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 405–425, 2015.

CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 271–276, 2014.

CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M. R. S.; MARCIANO, A. F.; PERINOTTO, W. M. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SCOTT, F. B.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38–42, 2016.

CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, Fillipe A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Veterinary Parasitology Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 140–147, 2012.

CORVAL, A. R. C.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; SILVA, C. S. R.; BITENCOURT, R. O. B.; FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W.; GÔLO, P. S. UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 15–26, 2021.

DOS SANTOS, G. F.; LOCATELLI, G. O.; COÊLHO, D. A.; BOTELHO, P. S.; DE AMORIM, M. S.; DE VASCONCELOS, T. C.L.; BUENO, L. A. Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, vol. 75, n. 2, p. 345–352, 2015.

DRUMMOND, R. O.; GLADNEY, W. J.; WHETSTONE, T. M.; ERNST, S. E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal Economic Entomology**, v. 64, p. 686–688, 1971.

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, vol. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.

FANG, W.; PAVA-RIPOLL, M.; WANG, S.; ST. LEGER, R. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 3, p. 277–285, 2009.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FERNANDES, É. K.K.; KEYSER, C. A.; CHONG, J. P.; RANGEL, D. E.N.; MILLER, M. P.; ROBERTS, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 115–128, 2010a.

FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, Donald W. CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 197–205, 2010b.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, Á. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 69–78, 2008.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, Á. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 3, p. 237–243, 2007.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1–4, p. 71–93, 2008.

FERNÁNDEZ-BRAVO, M.; FLORES-LEÓN, A.; CALERO-LÓPEZ, S.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, F.; VALVERDE-GARCÍA, P.; QUESADA-MORAGA, E. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 148, p. 142–151, 2017.

FRACETO, L. F.; MARUYAMA, C. R.; GUILGER, M.; MISHRA, S.; KESWANI, C.; SINGH, H. B.; DE LIMA, R.. *Trichoderma harzianum* -based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n.8, p. 2056–2063, 2018.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1127–1149, 2011.

FURLONG, J; MARTINS, J. R; PRATA, M. C. A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.159, p. 1–7, 2007.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, K.; POGGY-VARALDO, H. M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; IBARRA-RENDÓN, J.; BARRERA-CORTÉS, J. Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 6, p. 701–708, 2011.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; DE BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; DE LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUISELEY, K. B. Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 11, p. 706–716, 1989.

HORN, S. C.; ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, p. 12–32, 1985.

HUMBER. Preservation of entomopathogenic fungal cultures. **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 317–327, 2012.

HURTADO, O. J. B.; GIRALDO-RÍOS, C. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. **Ticks and Tick-Borne Pathogens**. [S. l.]: IntechOpen, 2019.

JARONSKI, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159–185, 2010.

JONES, G. A.; PERINOTTO, W. M. S.; CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Selection of *Metarhizium* spp. Brazilian isolates to control *Rhipicephalus* microplus ticks: In vitro virulence tests and conidiogenesis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 43, p. 1–13, 2021.

KAAYA, G. P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 55, n. 3, p. 273–281, 2011.

KEYSER, C. A.; FERNANDED, E. K. K.; RANGEL, D. E.; Roberts, D. W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy?. **Journal of invertebrate pathology**, v. 120, p. 67-73, 2014.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; DALL AGNOL, B.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2017.

LEONG, J. Y.; LAM, W. H.; HO, K.W.; VOO, W. P.; LEE, M. F. X.; LIM, H. P.; LIM, S.; TEY, B.T.; PONCELET, D.; CHAN, E. S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44–60, 2016. .

LIU, C. P.; LIU, S. D. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 5, p. 377-384, 2009a.

LIU, Ching Piao; LIU, Shan Da. Low-temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *beauveria bassiana*. **Drying Technology**, v., n. 6, p. 747–753, 2009b.

LOCATELLI, G. O.; DOS SANTOS, G. F.; BOTELHO, P. S.; FINKLER, C. L. L.; BUENO, L. A. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, v. 117, p. 21–29, 2018.

LOPES, R. B.; MARTINS, I.; SOUZA, D.; FARIA, M. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 3, p. 236–242, 2013.

LORENZ, S. C.; HUMBERT, P.; PATEL, A. V. Chitin increases drying survival of encapsulated *Metarhizium pemphigi* blastospores for *Ixodes ricinus* control. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, . 6, p. 101537, 2020.

LOTFIPOUR, F.; MIRZAEI, S.; MAGHSOODI, M. Evaluation of the effect of cacl2 and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, vol. 2, n. 1, p. 71–78, 2012.

MARANGA, R. O.; KAAYA, G. P.; MUEKE, J. M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, v. 159, n. 4, p. 527–532, 2005.

MARCIANO, A. F.; GOLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J.B.; CAMARGO, M. G.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; PERINOTTO, W. M.S.; BITTENCOURT, V. R.E.P. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 4, p. 488–492, 2020.

MARCIANO, A. F.; MASCARIN, G. M.; FRANCO, R. F.; GOLO, P. S.; JARONSKI, S. T.; FERNANDES, Éverton K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

MARUYAMA, C. R.; BILESKY-JOSÉ, N.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–14, 2020.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, Í.; FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–53, 2019.

MENT, D.; GINDIN, G.; ROT, A.; SOROKER, Victoria.; GLAZER, I.; BAREL, S.;

SAMISH, M.. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia, to the tick cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 76, n.11, p. 3521–3528, 2010.

MESQUITA, E.; MARCIANO, A. F.; CORVAL, A. R. C.; FIOROTTI, J.; CORRÊA, T. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 353–362, 2020.

MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium conidia*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v 57, n 1, p. 121–123, 1991.

MILNER, R. J.; LOZANO, L. B.; DRIVER, F.; HUNTER, D. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*—strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. **BioControl**, v. 48, n. 3, p. 335-348, 2003.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. 2nd ed. [S. l.: s. n.], 2017.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n.2, p. 183–193

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; ORTIZ-GARCÍA, M.; VERNON-CARTER, E. J.; JAUREGUI-RINCÓN, J.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1141–1148, 2012.

MURANO, E. Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 14, n. 3–4, p. 245–249, 1998.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n.3, p. 169–172, 2003.

NASCIMENTO, É.; DA SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acidum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 6, p. 1259–1266, 2010.

PAIXÃO, F. R., FERNANDES, É. K. K., PEDRINI, N. Thermotolerance of Fungal Conidia. **in Microbes for Sustainable Insect Pest Management**, Sustainability in Plant and Crop Protection. Cham, , p. 185–196, 2019.

PAIXÃO, F. R.S.; MUNIZ, E. R.; BARRETO, L. P.; BERNARDO, C. C.; MASCARIN, G. M.; LUZ, C.; FERNANDES, K. K. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 324–337, 2017.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate



sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, vol. 5, no. 1, p. 241–248, 2010.

PEREIRA, R. M., ROBERTS, D. W. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, p. 1657–1661, 1991. .

POLAR, P.; DE MURO, M. A.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. A.; ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 159–167, 2005.

POWELL, R. T., REID, T. J. Project tick control [*Boophilus microplus*, cattle breeds, prevention, resistance, Australia]. **Queensland agricultural journal**, v. 108, p. 279–300, 1982. .

PRZYKLENK, M.; VEMMER, M.; HANITZSCH, M.; PATEL, A. A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 5, p. 498–512, 2017.

QIU, H.; FOX, E. G. P.; QIN, C. S.; ZHAO, D.Y.; YANG, H; XU, J. Z. Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. **Biological Control**, v. 134, n. 1, p. 141–149, 2019.

QUAITE, F. E., SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v. 358, p. 576–578, 1992.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 2, p. 116–125, 2005.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; DETTENMAIER, S. J.; ROBERTS, D. W. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n.4, p. 344–350, 2010.

RANGEL, D. E. N.; ROBERTS, D. W. Possible source of the high UV-B and heat tolerance of *Metarhizium acridum* (isolate ARSEF 324). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 157, p. 32–35, 2018.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluzuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n 1–2, p. 128–136, 2014.

ROBERTS, D. W. AND CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. 1967.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1–70, 2004.

RODRIGUES, I. M. W.; FILHO, A. B.; GIORDANO, I. B.; DENADAE, B. E.; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. Rossi. Compatibilidade de polímeros aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e a estabilidade dos seus produtos formulados. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 457–464, 2017.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 3–29, 2018.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, 2004.

SANTI, L.; BEYS DA SILVA, W. O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874–880, 2010.

SANTOS, T. R.; DA PAIXÃO, F. R. S.; CATÃO, A. M. L.; MUNIZ, E. R.; RIBEIRO-SILVA, C. S.; TAVEIRA, S. F.; LUZ, C.; MASCARIN, G. M.; FERNANDES, É. K. K.; MARRETO, R. N. Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 12, p. 5001–5012, 2021.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267–1274, 2010.

SMIDSROD, O.; SKJAKBRK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, vol. 8, p. 71–78, 1990.

SOUZA HIGA, L. O. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326–333, 2015.

ST.LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, n. 3, p. 274–288, 1989.

SULLIVAN, C. F.; PARKER, B. L.; KIM, J. S.; SKINNER, M. Effectiveness of granular formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on off-host larvae of *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2021.

WALSTAD, J. D.; ANDERSON, R. F.; STAMBAUGH, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate pathology**, v. 16, n. 2, p. 221–226, 1970.

VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G.; ECHEVERRIA, J. T.; BORGES, D. G. L.; TUTIJA, J.; BORGES, F. A. Resistance to all chemical groups of acaricides in a single isolate of *Rhipicephalus microplus* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 4, p. 276–280, 2020.

VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 380–389, 2013.

VIEIRA, M. V.; PASTRANA, L. M.; FUCIÑOS, P. Microalgae Encapsulation Systems for Food, Pharmaceutical and Cosmetics Applications. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, 2020.

VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, R. A.; KLAFKE, G. M.; RIET-CORREA, F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101413, 2020.

WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. **London: Plenum Press**, , p. 134–177, 1974. .

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879–920, 2007b.