

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

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de micropartículas com conídios de *Metarhizium*:
caracterização, estabilidade e aplicação no controle de *Rhipicephalus
microplus*.**

Laura Nobrega Meirelles

2026



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

**Desenvolvimento de micropartículas com conídios de *Metarhizium*:
caracterização, estabilidade e aplicação no controle de *Rhipicephalus
microplus*.**

LAURA NOBREGA MEIRELLES

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

E coorientação das Professoras
Mariana Guedes Camargo
Yara Peluso Cid

Tese de doutorado submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de **Doutor**
em Ciências no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica – RJ
Janeiro de 2026

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

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

M511d Meirelles, Laura Nobrega, 1994-
Desenvolvimento de micropartículas com conídios de
Metarhizium: caracterização, estabilidade e aplicação
no controle de Rhipicephalus microplus / Laura
Nobrega Meirelles. - Barra do Piraí, 2026.
82 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.
Coorientadora: Mariana Guedes Camargo.
Coorientadora: Yara Peluso Cid.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2026.

1. Carrapato do boi. 2. Encapsulamento fúngico. 3.
Formulações inovadoras. I. Bittencourt, Vânia Rita
Elias Pinheiro, 1959-, orient. II. Camargo, Mariana
Guedes, 1985-, coorient. III. Cid, Yara Peluso, 1982
, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias. V. Título.



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



ATA Nº 242 / 2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.004908/2026-62

Seropédica-RJ, 05 de fevereiro de 2026.

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

LAURA NÓBREGA MEIRELLES

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

TESE APROVADA EM 30/01/2026

(Assinado digitalmente em 05/02/2026 11:04)

ISABELE DA COSTA ANGELO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###602#7

(Assinado digitalmente em 05/02/2026 11:39)

VANIA RITA ELIAS PINHEIRO

BITTENCOURT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###79#2

(Assinado digitalmente em 06/02/2026 13:39)

WENDELL MARCELO DE SOUZA

PERINOTTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###966#0

(Assinado digitalmente em 11/02/2026 10:27)

JHONES LUIZ DE OLIVEIRA

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.758.##

(Assinado digitalmente em 05/02/2026 09:53)

VALESCA HENRIQUE LIMA

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.014.##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **242**, ano: **2026**, tipo: **ATA**, data de emissão: **05/02/2026** e o código de verificação: **876dc0d474**

**“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”
(Leonardo da Vinci)**

**“A vida é maravilhosa se não se tem medo dela.”
(Charles Chaplin)**

**Dedico este trabalho a Deus,
aos meus pais, ao meu marido e ao meu filho...**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida e pela saúde que me permitiu seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Dorvânia e Paulo, meu porto seguro, agradeço por estarem presentes em todos os momentos. Obrigada pelos sacrifícios feitos para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade e pelo incentivo constante aos estudos. Amo vocês! Mãe, obrigada por sua dedicação à nossa família e por ser minha maior inspiração. Admiro sua trajetória.

À minha irmã, agradeço pelos momentos felizes em família e por todo o carinho que dedica ao Gael.

Ao meu filho, Gael, minha maior dádiva, sou eternamente grata a Deus por me permitir viver esse amor inexplicável que ilumina meus dias. Tudo o que faço é para você e por você. Eu te amo imensamente, meu filho!

Ao meu marido, Danilo, que esteve ao meu lado em todas as etapas, do pré-vestibular ao doutorado, deixo meu mais profundo reconhecimento pelo companheirismo, paciência e amor. Obrigada por compreender os inúmeros finais de semana e feriados dedicados ao laboratório, pelas madrugadas em que me fez companhia durante a escrita e por todo apoio ao longo de 13 anos de jornada juntos. Agradeço também por ser um pai tão presente e dedicado ao Gael e por assumir tantas responsabilidades quando precisei estar em Seropédica. Eu te amo!

Ao meu tio Oswaldo, agradeço pelas caronas até Seropédica durante a graduação e o mestrado, pela constante disponibilidade em ajudar e pelo carinho com a nossa família.

Aos companheiros de quatro patas que já passaram pela minha vida (Nininha, Paralisia, Irmão do Paralisia, Lassie, Estopa, Kako e Kiko) e aos que permanecem comigo (Mell, Cacau, Day, Thor e Vira), obrigada pelo afeto incondicional e por tornarem meus dias mais leves e felizes.

Ao melhor laboratório do mundo, minha segunda família, agradeço pelo acolhimento, pelo apoio nos inúmeros experimentos e pelas risadas compartilhadas nos cafés da tarde. Aos alunos de iniciação científica, vivência, estagiários, colegas de pós-graduação e ao técnico Adonis, registro minha gratidão. Às amigas Emily, Mariana, Thaís, Jéssica, Victória, Adriani e Joana obrigada pela parceria e amizade que levarei para a vida. Em especial, Emily, não tenho palavras para agradecer sua presença tão importante nessa trajetória, obrigada por me ouvir e me apoiar sempre.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação e aos que continuam presentes, obrigada pela dedicação em transmitir não apenas conhecimento científico, mas também lições para a vida. Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Vânia Bittencourt, por me acolher no laboratório, apresentar o universo científico e caminhar comigo até aqui. À minha coorientadora, Mariana Camargo, amiga, incentivadora e “socorrista” nas horas vagas, agradeço pela confiança, apoio e parceria ao longo dessa caminhada. À Yara Cid Peluso, agradeço pela orientação e pelas contribuições nesta pesquisa. Às coordenadoras do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária, Dra. Vânia Bittencourt, Dra. Isabele da Costa Angelo e Dra. Patrícia Golo, agradeço pela dedicação na estruturação de um ambiente de trabalho organizado, funcional e favorável ao desenvolvimento das atividades científicas.

À banca Dra. Emily Mesquita, Dr. Éverton Kort, Dra. Isabele da Costa Angelo, Dr. Jhones Luiz de Oliveira, Dra. Valesca Lima, e Dr. Wendell Perinotto, obrigada pela disponibilidade em contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Rural, agradeço pelo acolhimento e pela inspiração de suas belas paisagens. Aos funcionários da Estação, em especial ao Zeca, pelo cuidado com o ambiente de trabalho e pela disposição em ajudar sempre.

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

BIOGRAFIA

Laura Nobrega Meirelles, filha de Dorvânia Nobrega Meirelles e Paulo Jasmin Meirelles, nasceu em 23 de setembro de 1994, no município de Barra do Piraí, Rio de Janeiro. Concluiu o Ensino Médio em 2012, no Centro de Estudos Integrados, em sua cidade natal.

Em março de 2014, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), formando-se em dezembro de 2018. Durante a graduação, em 2015, passou a integrar o Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM), sob orientação da Professora Dra. Vânia Rita E. P. Bittencourt, atuando como bolsista de iniciação científica do programa PIBIC até a conclusão do curso.

Em 2019, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, sob orientação da Dra. Vânia Rita E. P. Bittencourt e coorientação da Dra. Mariana Guedes Camargo, concluindo em agosto de 2021. No mesmo ano, iniciou o Doutorado no mesmo programa, sob orientação da Dra. Vânia Rita E. P. Bittencourt e coorientação das Dras. Mariana Guedes Camargo e Yara Peluso Cid.

Entre setembro e dezembro de 2024, atuou como Professora Substituta da disciplina de Parasitologia Médica no curso de Medicina da Universidade de Vassouras. Atualmente, é Professora do curso de Medicina Veterinária do Instituto Brasileiro de Medicina de Reabilitação e na Instituição Estácio Unidade Volta Redonda. Ao longo de sua trajetória acadêmica, participou de cursos de aperfeiçoamento, congressos e simpósios, além de colaborar ativamente com o grupo de pesquisa do LCM, contribuindo com a publicação de resumos em anais de eventos científicos e artigos em periódicos especializados.

RESUMO

MEIRELLES, Laura Nobrega. **Desenvolvimento de micropartículas com conídios de *Metarhizium*: caracterização, estabilidade e aplicação no controle de *Rhipicephalus microplus***. 2026. 78 p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Os fungos entomopatogênicos destacam-se como alternativa sustentável no controle biológico de *Rhipicephalus microplus*, especialmente diante do cenário de resistência aos carrapaticidas químicos. A produção de micropartículas por gelificação iônica aplicada ao encapsulamento de propágulos surge como estratégia promissora, ao permitir a combinação de polímeros e adjuvantes capazes de proteger o fungo de fatores ambientais e prolongar sua vida útil. Os objetivos deste estudo foram desenvolver micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados com diferentes associações de alginato de sódio (A) com pectina (P), glicerol (G) ou quitina (Q). As micropartículas elaboradas foram avaliadas quanto à eficiência do processo de encapsulamento, interferência da quitina na produção de conídios, distribuição de tamanho, morfologia, estrutura, tempo de prateleira, tolerância à radiação UV-B, termotolerância e eficácia no controle de *R. microplus* em laboratório e semi-campo. A eficiência do encapsulamento foi determinada pela quantificação e análise da viabilidade dos conídios encapsulados. Para investigar o efeito da quitina nas formulações, quantificaram-se os conídios esporulados das micropartículas incubadas em meio de cultura. Formulações com quitina (AQ, APQ, AGQ e APGQ) foram utilizadas nos experimentos seguintes. Foram realizadas análises de distribuição de tamanho (ImageJ), morfologia por microscopia (estereoscópica e eletrônica de varredura), e espectroscopia no infravermelho (FTIR). As micropartículas fúngicas e os conídios não encapsulados (NEC) foram armazenados por um e dois meses em temperatura ambiente e sob refrigeração. Para os ensaios de tolerância, as amostras foram expostas à radiação UV-B ($6,0 \text{ kJ m}^{-2}$) e ao calor (45°C por 4 h). Foi avaliada a eficácia das micropartículas no controle do carrapato em laboratório e semi-campo. O encapsulamento reduziu 2,5 vezes a concentração de conídios, sem comprometer sua viabilidade. As partículas AQ, APQ, AGQ e APGQ apresentaram aumento de, respectivamente, 60,26; 84,77; 37,72 e 54,84% na produção de conídios comparadas às formulações sem quitina. As micropartículas exibiram formato esférico com superfície mais homogênea (APQ e APGQ) ou heterogênea (AQ e AGQ). O diâmetro médio das micropartículas AQ, APQ, AGQ e APGQ foi igual a 1338, 1459, 1244 e 1367 μm , respectivamente. As análises de FTIR sugeriram interações físicas entre a matriz polimérica e o fungo. NEC apresentou maior percentual de germinação em relação as micropartículas em ambas as condições de armazenamento. O armazenamento sob refrigeração foi mais eficiente na manutenção da viabilidade das micropartículas fúngicas comparado ao ambiente. A germinação de NEC foi reduzida após exposição à radiação UV-B (59,08%) e ao calor (0,19%) comparado à AQ (98,59% e 71,74%), APQ (95,48% e 93,87%), AGQ (94,37% e 68,18%) e APGQ (97,95% e 75,5%), respectivamente. Em laboratório, as micropartículas fúngicas reduziram os parâmetros biológicos e a sobrevivência de fêmeas ingurgitadas comparado aos controles, porém sem diferirem de NEC. Em semi-campo, AGQ reduziu o número de larvas em 59,5% em relação ao grupo sem tratamento, enquanto APQ foi ineficaz. Esses achados reforçam o potencial das micropartículas fúngicas como abordagem inovadora no controle de *R. microplus*, agregando valor tecnológico a um produto final que oferece vantagens práticas para uso em campo, como facilidade de aplicação e maior estabilidade.

Palavras-chave: carrapato do boi, encapsulamento fúngico, formulações inovadoras

ABSTRACT

MEIRELLES, Laura Nobrega. **Development of microparticles with *Metarhizium* conidia: characterization, stability and application in *Rhipicephalus microplus* control.** 2026. 78 p. Thesis (Phd in Science, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Entomopathogenic fungi are a sustainable alternative for the biological control of *Rhipicephalus microplus*, particularly given the emergence of resistance to chemical acaricides. The production of microparticles by ionic gelation for encapsulating propagules is a promising strategy, as it allows polymers and adjuvants to be combined to protect the fungus and improve its shelf life. This study aimed to develop microparticles containing *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 conidia encapsulated with different combinations of sodium alginate (A), pectin (P), glycerol (G), and chitin (Q). The encapsulation efficiency and the influence of chitin addition on conidia production were investigated, and the particles were analyzed for size distribution, morphology, structure, shelf life, UV-B tolerance, thermotolerance, and efficacy in controlling *R. microplus* in the laboratory and semi-field conditions. The ionic gelation efficiency was assessed by quantifying and verifying the viability of the encapsulated conidia. To investigate the effect of chitin on propagule production, the sporulated conidia of the microparticles incubated in culture medium were quantified. Formulations containing chitin (AQ, APQ, AGQ e APGQ) were used in subsequent experiments. Size distribution was analysed using ImageJ, morphology was analysed using stereoscopic and scanning electron microscopy, and infrared spectroscopy (FTIR) was performed. The microparticles and the non-encapsulated conidia (NEC) were stored for one and two months at room temperature and in a refrigerator. For tolerance tests, samples were exposed to UV-B radiation (6.0 kJ m^{-2}) and heat (45°C for four hours). The efficacy of the fungal microparticles in controlling ticks was evaluated in laboratory and semi-field settings. Encapsulation reduced the concentration of conidia by an average of $2.5\times$ without compromising viability. Compared to formulations without chitin, the AQ, APQ, AGQ and APGQ particles showed increases of 60.26%, 84.77%, 37.72% and 54.84%, respectively, in conidia production. The microparticles exhibited spherical shapes with more homogeneous (APQ and APGQ) or heterogeneous (AQ and AGQ) surfaces. The average diameter of the AQ, APQ, AGQ and APGQ microparticles was $1,338 \mu\text{m}$, $1,459 \mu\text{m}$, $1,244 \mu\text{m}$ and $1,367 \mu\text{m}$, respectively. FTIR analyses suggested physical interactions between the polymeric matrix and the fungus. NEC exhibited greater germination than the fungal microparticles under both storage conditions. Refrigerated storage was more efficient in maintaining microparticle viability than ambient storage. NEC germination decreased after exposure to UV-B radiation (59.08%) and heat (0.19%), compared to AQ (98.59% and 71.74%), APQ (95.48% and 93.87%), AGQ (94.37% and 68.18%) and APGQ (97.95% and 75.5%), respectively. In the laboratory, the microparticles reduced biological parameters and the survival of engorged females compared to the control group, with no difference observed in comparison to the NEC group. In semi-field conditions, AGQ reduced the number of larvae by 59.5% compared to the untreated group, while APQ was ineffective. These findings reinforce the potential of fungal microparticles as an innovative approach to controlling this tick, adding technological value to a final product that offers practical advantages for field use, such as easily application and greater stability.

Keywords: fungal encapsulation, cattle tick, innovative formulations

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não, em condições de laboratório. Comparação entre os pares de grupos e tempo de sobrevivência médio (S50).... 36

Tabela 2: Mediana e erro padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não..... 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de desenvolvimento das micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados, através do método de gelificação iônica. 14

Figura 2: Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de semi-campo. Vasos de *Urochloa decumbens* na área externa ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária com incidência direta de luz, chuva e calor (A); conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 esporulados a partir da superfície das micropartículas fúngicas (apontadas pela seta vermelha) de alginato de sódio + pectina + quitina (B) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (C) 13 dias após o tratamento do solo; larvas do carrapato no ápice das folhas da forrageira (D). 20

Figura 3: Média e erro padrão da concentração de conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio (A); alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina (AP); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol (AG); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); alginato de sódio + pectina + glicerol (APG) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). Barras com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). 22

Figura 4: Média e erro padrão da produção de conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 esporulados a partir de um grama das micropartículas, contendo ou não quitina (Q). A- alginato de sódio (A) e alginato de sódio + quitina (AQ); B- alginato de sódio + pectina (AP); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); C- alginato de sódio + glicerol (AG); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); D- alginato de sódio + pectina + glicerol (APG) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). (*) indica diferença estatística significativa entre os grupos, $p \leq 0,05\%$ 23

Figura 5: Distribuição de tamanho de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados. Micropartículas fúngicas dealginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D)..... 24

Figura 6: Micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados, visualizadas em microscópio estereoscópio. Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D)... 25

Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados não germinados. Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D). 26

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados germinados. Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ; A e B); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ; C e D); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ; E e F) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ; G e H). Hifas sinalizadas pelas setas brancas. 27

Figura 9: Espectros de FTIR das matrizes poliméricas isoladas e de suas respectivas formulações contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148. A- micropartículas de alginato de sódio + quitina sem fungo (AQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + quitina (AQ/Ma); B- micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (APQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + quitina (APQ/Ma); C- micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (AGQ); micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ/Ma); D- micropartículas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina sem fungo (APGQ); micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ/Ma). Alginato de sódio (A); pectina (P); glicerol (G); quitina (Q) e conídios fúngicos (Ma). As setas indicam alterações nas bandas, sugerindo interações físicas entre a matriz polimérica e o fungo. 30

Figura 10: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após armazenamento em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (B) por um período de dois meses. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos expostos ao mesmo período de armazenamento, e barras com a mesma letra minúscula dos mesmos grupos expostos a diferentes períodos de armazenamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). (*) em A indica uma diferença estatística ($p < 0,0001$) na germinação de conídios do mesmo grupo em relação a B, considerando as diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) para o mesmo período. 32

Figura 11: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ) alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após exposição à UV-B (6.0 kJ m^{-2}). Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). 33

Figura 12: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após exposição à 45°C por 4 horas. Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). 34

Figura 13: Curva de sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não, em condições de laboratório. Controle aquoso Tween 80® (CTR TWEEN); suspensão fúngica com conídios não encapsulados (NEC); micropartículas de alginato de sódio + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AQ / AQ; CTR); micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ); micropartículas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APGQ / APGQ). 35

Figura 14: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição ao solo tratado com micropartículas fúngicas de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 contendo diferentes polímeros, em condições de laboratório. A. alginato de sódio + quitina (AQ); B. alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); C. alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); D. alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). As setas brancas apontam as micropartículas

fúngicas e as setas vermelhas apontam as fêmeas mortas e com fungo esporulado na superfície da cutícula.....39

Figura 15: Aspectos macroscópicos (A-E) e microscópicos (F-J) de colônias de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 reisolados de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Suspensão fúngica (A e F). Micropartículas fúngicas de alginato de sódio + quitina (AQ; B e G); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ; C e H); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ; D e I) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ; E e J). Ampliação de 400× (F-J)..... 40

Figura 16: Fêmeas e massa de ovos de *Rhipicephalus microplus*, indicados pelos círculos vermelhos, 23 dias após a introdução das fêmeas ingurgitadas nos vasos cultivados com *Urochloa decumbens*. Fêmeas realizando postura nos grupos sem tratamento (A) e nos grupos tratados com micropartículas sem fungo de alginato de sódio + pectina + quitina (B) e alginato de sódio + glicerol + quitina (C); fêmea morta e ovos no grupo tratado com micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + quitina (D) e fêmea colonizada e morta pelo fungo no grupo tratado com micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (E). 41

Figura 17: Média e erro padrão do número de larvas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas 48 dias após a introdução das fêmeas nos vasos cultivados com *Urochloa decumbens*, tratados com micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados. Controle sem tratamento (CTR); micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ). Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$)..... 42

Figura 18: Temperaturas médias registradas de maio a novembro de 2025. As medições foram realizadas diariamente, em intervalos de 8 horas, pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 43

Figura 19: Valores médios de umidade relativa do ar registrados de maio a outubro de 2025. As medições foram realizadas diariamente, em intervalos de 8 horas, pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 44

Figura 20: Valores de chuva acumulada mensal registrados no ano de 2025. As medições foram realizadas pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 45

Figura 21: Mediana e erro padrão do número unidades formadoras de colônia (UFC) de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 reisoladas em 1 g de solo dos vasos tratados com micropartículas fúngicas alginato de sódio + pectina + quitina (APQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ), coletadas em três momentos distintos: 13 (1), 117 (2) e 185 (3) dias após o tratamento com as micropartículas. A coleta 1 foi realizada em maio (MAI), a coleta 2 em setembro (SET) e a coleta 3 em novembro (NOV). Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos dentro da mesma coleta de amostra, e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, o mesmo grupo em coletas de amostras distintas, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> : Biologia, Impactos Econômicos e Desafios no Controle Químico.....	3
2.2 <i>Metarhizium</i> spp. como Agente de Controle Microbiano de <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.3 Efeitos de Fatores Abióticos sobre Fungos Entomopatogênicos	6
2.4 Encapsulamento de Fungos Entomopatogênicos: Inovação no Desenvolvimento de Formulações	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local de Realização dos Experimentos	12
3.2 Obtenção e Manutenção do Isolado Fúngico de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.....	12
3.3 Obtenção da Suspensão Fúngica Aquosa.....	12
3.4 Obtenção e Manutenção do Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	12
3.5 Encapsulamento Fúngico por Gelificação Iônica.....	13
3.6 Eficiência do Processo de Encapsulamento Fúngico.....	14
3.7 Avaliação da Interferência da Quitina na Produção de Conídios das Micropartículas Fúngicas	15
3.8 Caracterização das Micropartículas Fúngicas	15
3.8.1 Análise da distribuição de tamanho	15
3.8.2 Análises morfológicas.....	15
3.8.3 Análise por espectroscopia no infravermelho (FTIR)	16
3.9 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas	16
3.10 Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados	16
3.11 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados	17
3.12 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em Condições de Laboratório	17
3.12.1 Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
3.13 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em Condições de Semi-campo	19
3.13.1 Reisolamento fúngico de amostras do solo tratado.....	20
3.14 Análise Estatística.....	21

4	RESULTADOS	22
4.1	Eficiência do Processo de Encapsulamento Fúngico	22
4.2	Avaliação da Interferência da Quitina na Produção de Conídios das Partículas Fúngicas	22
4.3	Caracterização das Partículas Fúngicas	23
4.3.1	Análise da distribuição de tamanho	23
4.3.2	Análises morfológicas	24
4.3.3	Análise por espectroscopia no infravermelho (FTIR)	28
4.4	Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas	31
4.5	Avaliação da Tolerância à Irradiação UV-B dos Conídios Fúngicos Encapsulados	32
4.6	Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados	33
4.7	Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em Condições de Laboratório	34
4.7.1	Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	39
4.8	Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em Condições de Semi-campo	41
4.8.1	Reisolamento fúngico de amostras do solo tratado	46
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Espécies do fungo entomopatogênico *Metarhizium* apresentam grande potencial no controle biológico de artrópodes pragas. Estes entomopatógenos, isolados do solo ou de seus hospedeiros, agem sobre os diferentes estágios de vida do artrópode e possuem mecanismo de infecção através da penetração ativa pela cutícula. Estudos realizados em condições laboratoriais, de semi-campo ou campo, demonstram resultados promissores no emprego de fungos entomopatogênicos para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) Murrel & Barker, 2003. No entanto, mesmo com os avanços nas pesquisas, ainda não há, no Brasil, um produto comercial à base de fungos entomopatogênicos oficialmente registrado para o controle de carrapatos.

Rhipicephalus microplus é um ectoparasito hematófago que infesta bovinos, sendo responsável por prejuízos econômicos significativos na pecuária brasileira. O controle deste carrapato é predominantemente realizado com carrapaticidas químicos, cujo manejo inadequado tem agravado o cenário de resistência química. Em todos os estados brasileiros onde foram desenvolvidos testes de sensibilidade, já foram detectadas populações de *R. microplus* resistentes a pelo menos uma das bases químicas comerciais disponíveis para o seu controle. Diante dos desafios enfrentados no controle químico desse carrapato, a implementação de abordagens alternativas tornou-se indispensável. Nesse contexto, o manejo integrado de pragas, baseado na combinação de métodos químicos e biológicos com práticas de manejo ambiental, tem como objetivo mitigar o desenvolvimento e a disseminação de populações resistentes, reduzir os impactos ambientais e contribuir para sustentabilidade dos sistemas produtivos, com destaque para o uso de fungos entomopatogênicos como uma ferramenta promissora de controle biológico.

No entanto, fatores ambientais como temperatura elevada, irradiação solar excessiva e umidade relativa baixa podem prejudicar a viabilidade e o desempenho desses entomopatógenos em condições de semi-campo ou campo. Nesse cenário, o avanço tecnológico é essencial para o desenvolvimento de formulações à base de fungos entomopatogênicos, que não só proporcionem proteção contra as intempéries ambientais, mas também otimizem a manipulação e aplicação, além de prolongar a vida útil desses agentes microbianos.

A tecnologia de encapsulamento, tradicionalmente empregada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, tem ganhado destaque na formulação de grânulos contendo agentes de biocontrole, como fungos e bactérias. Entre as diversas técnicas disponíveis, a gelificação iônica se sobressai no encapsulamento de microrganismos por sua simplicidade, baixo custo e eficiência. Essa técnica consiste na formação de uma matriz polimérica ao redor das células microbianas, geralmente utilizando biopolímeros naturais, como o alginato de sódio.

O encapsulamento de propágulos fúngicos utilizando alginato de sódio associado a outros biopolímeros naturais têm mostrado resultados promissores. Estas combinações podem contribuir para a otimização da produção de micropartículas fúngicas com características estratégicas para a aplicação no controle de carrapatos em condições a campo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados em alginato de sódio combinado a diferentes polímeros e /ou substância adjuvante, utilizando o método de gelificação iônica, assim como a avaliação da eficiência do processo de encapsulamento. As partículas elaboradas foram avaliadas quanto à interferência da quitina na produção de conídios, distribuição de tamanho e morfologia externa, bem como caracterizadas estruturalmente por espectroscopia no infravermelho. Adicionalmente, foram analisados o tempo de prateleira, a tolerância à

irradiação UV-B, a termotolerância e a eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições laboratoriais e de semi-campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*: Biologia, Impactos Econômicos e Desafios no Controle Químico

O Brasil destaca-se entre os maiores produtores e exportadores de carne bovina no cenário mundial. Em 2024, o rebanho nacional foi estimado em cerca de 194 milhões de cabeças, resultando em um volume recorde de exportações de 2,89 milhões de toneladas de carne bovina enviadas a 157 países, com receita de US\$ 12,8 bilhões (ABIEC, 2025). Paralelamente, a cadeia produtiva do leite e de seus derivados apresenta grande importância econômica para o Brasil. O país conta atualmente com mais de 1 milhão de propriedades leiteiras (Milkpoint, 2025) e ocupa a terceira posição mundial em produção, com mais de 34 bilhões de litros anuais (MAPA, 2024).

Neste contexto, o avanço da pecuária nacional, associada à alta densidade de rebanhos e ao clima favorável, tem sido acompanhado do aumento da população de carrapatos, com impactos negativos na sanidade animal e economia do setor. *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), popularmente conhecido como “carrapato do boi”, é um dos principais ectoparasitos de bovinos em regiões tropicais e subtropicais, cujo clima quente e úmido favorece sua disseminação (Estrada-Peña *et al.*, 2006). Tem sua origem na Ásia e foi introduzido no território brasileiro no início do século XVIII, provavelmente, pela movimentação de animais importados (Wharton, 1974).

O carrapato do boi é um parasito monoxeno, ou seja, precisa de um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida o qual compreende os estágios de desenvolvimento de ovos, larvas, ninfas e adultos. Seu ciclo biológico apresenta duas fases, não parasitária e parasitária. Em relação a fase não parasitária, em condições climáticas ideais, a fêmea totalmente ingurgitada (teleógina), se desprende do animal, cai ao solo, metaboliza o sangue ingerido e inicia a postura dos ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar cerca de 3.000 ovos dos quais as larvas eclodem e devido ao fototropismo positivo, são atraídas pela luz, atingindo o ápice das gramíneas. Ao alcançar o hospedeiro, as larvas se fixam e começam a se alimentar de sangue, dando início a fase parasitária. No corpo do animal, ocorrem as mudas de larvas para ninfas e ninfas para adultos machos e fêmeas, que realizam a cópula. A fêmea fertilizada inicia o processo de ingurgitamento, ou seja, consome volume significativo de sangue, 0,5 a 1 mL, com a finalidade de acumular nutrientes para o desenvolvimento dos ovos. Após aumentar significativamente de tamanho, a fêmea totalmente ingurgitada se desprende do hospedeiro e cai no solo iniciando novamente a fase não parasitária (Senbill *et al.*, 2018).

A infestação dos bovinos por esse carrapato acarreta prejuízos diretos e indiretos ao rebanho bovino. Os danos diretos incluem irritação, lesões no couro, anemia e transmissão de agentes causadores de enfermidades graves. Já os indiretos envolvem a redução do ganho de peso, da produção de leite e da qualidade do couro, além do comprometimento da fertilidade dos animais, e aumento dos custos relacionados ao controle do parasito e ao tratamento das doenças por ele veiculadas (Calvano *et al.*, 2019; Vannucchi; Teixeira, 2025). *R. microplus* atua como importante vetor de agentes patogênicos associados à Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Durante o processo de hematofagia, esse ectoparasito pode transmitir diretamente à corrente sanguínea, protozoários do gênero *Babesia* spp. e bactérias do gênero *Anaplasma* spp. A TPB compreende um complexo de doenças responsáveis por alta morbidade e mortalidade dos bovinos constituindo um dos principais desafios sanitários da pecuária (Hurtado; Giraldo-Ríos, 2019). Sob essa perspectiva, o parasitismo do carrapato do boi gera impactos econômicos expressivos na pecuária bovina em todo o mundo, com estimativas de gastos que atingem US\$ 3,24 bilhões anuais apenas no Brasil (Grisi *et al.*, 2014; Jonsson, 2006).

Nas últimas décadas, os carrapaticidas sintéticos permaneceram como o principal recurso para o controle de carrapato dos bovinos (Andreotti; Garcia; Koller, 2019). Diferentes classes de pesticidas estão disponíveis comercialmente e têm indicação para o controle de infestações de carrapatos, como organofosforados, piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas, formamidas, benzoilfenil ureias, fenilpirazóis e isoxazolininas (Rodriguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018). No entanto, a facilidade de compra sem receita veterinária, a utilização desses compostos químicos sem o critério técnico recomendado em bula, associada a aplicações sucessivas e ausência de alternância entre princípios ativos, tem resultado em importantes consequências negativas. Entre elas destacam-se os impactos sobre a biodiversidade, os riscos à saúde humana e animal, além do aumento da pressão de seleção de carrapatos resistentes (Dzemo *et al.*, 2023; Rodriguez-Vivas; Jonsson; Bhushan, 2018). A resistência aos acaricidas constitui um fenômeno multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos, ambientais e de manejo. A ausência de monitoramento sistemático e falhas na vigilância agravam esse quadro, dificultando a identificação precoce de sinais de resistência e possibilitando sua rápida disseminação entre as populações do parasito (Klafke *et al.*, 2024).

Das sete classes de acaricidas químicos comercializadas no Brasil, foram relatadas resistência a seis delas (Klafke *et al.*, 2017; Reck *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2020). Até o momento, não há relatos de resistência de *R. microplus* contra isoxazolininas. No Rio Grande do Sul, Reck *et al.* (2014) identificaram uma população de *R. microplus*, cepa Jaguar, como resistente a seis acaricidas (cipermetrina, clorpirifós, fipronil, amitraz, ivermectina e fluazuron), pertencentes a diferentes classes. Na mesma região, Klafke *et al.* (2017) identificaram resistência múltipla, constatando que a maioria das populações testadas (78,85%) apresentava resistência simultânea a pelo menos três acaricidas diferentes. Já no Mato Grosso do Sul, os estudos de Valsoni *et al.* (2020) demonstraram resistência, de uma cepa de *R. microplus*, a seis classes de acaricidas de contato ou sistêmicos e combinações de piretróides e organofosforados. Segundo Klafke *et al.* (2024), as principais necessidades e prioridades para o controle eficaz do carrapato bovino podem ser organizadas em três domínios fundamentais: comunicação, pesquisa e políticas públicas. Ainda, a integração estratégica desses eixos representa um passo decisivo para a construção de um modelo de manejo mais consistente e sustentável das infestações por esse ectoparasito no Brasil.

2.2 *Metarhizium* spp. como Agente de Controle Microbiano de *Rhipicephalus microplus*

O controle biológico é uma estratégia de manejo de pragas que se baseia na utilização de inimigos naturais, incluindo predadores, parasitoides e patógenos, para controlar populações de organismos considerados danosos (Krebs, 2014). Alves (1998) definiu o controle microbiano como um ramo do controle biológico que envolve o uso racional de microrganismos patogênicos para a regulação de populações pragas. O termo “entomopatogênico” refere-se a microrganismos, entre eles parasitos, bactérias, vírus e fungos, que são capazes de infectar insetos e outros artrópodes terrestres, como ácaros, carrapatos e aranhas, usando-os como hospedeiros para desenvolver parte de seu ciclo de vida (Delgado; Murcia-Ordoñez, 2011; Rajput *et al.*, 2024).

Definidos como um grupo filogeneticamente diverso, os fungos entomopatogênicos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos, podendo ser unicelulares ou multicelulares (filamentosos) e sua reprodução ocorre por esporos sexuais, assexuados ou por ambos (Mora; Castilho; Fraga, 2018). A primeira aplicação documentada de fungos entomopatogênicos no controle de insetos ocorreu entre 1878 e 1879, quando Metchnikoff utilizou *M. anisopliae* para infectar larvas do besouro *Anisoplia austriaca*. No Brasil, Pestana (1923) foi um dos pioneiros ao reconhecer um fungo como agente potencial no controle de artrópodes, ao identificar a

infecção de uma cigarrinha das pastagens *Tomaspis* spp. por *Penicillium anisopliae* (Alves, 1998), atualmente reconhecido como *M. anisopliae*.

O gênero *Metarhizium*, pertencente a ordem Hypocreales, destaca-se por sua importância ecológica e potencial aplicação na biotecnologia e agricultura (Skinner; Parker; Kim, 2014). Sua diversidade genética e especialização para diferentes grupos de hospedeiros faz dele um aliado estratégico no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças (Lovett; St. Leger, 2018). Este gênero, que ao longo do tempo passou por reformulações e revisões filogenéticas, inclui várias espécies de fungos, na sua maioria anamórficas, que podem ser isoladas do solo ou de artrópodes hospedeiros (Bischoff; Rehner; Humber, 2009). Amplamente distribuídos ao redor do mundo, esses entomopatógenos, podem ser encontrados de ambientes áridos a tropicais, habitats terrestres a aquáticos e climas árticos a temperados (Roberts; St. Leger, 2004).

A doença causada por *Metarhizium* em artrópodes é conhecida como muscardina verde, nome derivado da coloração esverdeada dos conídios que recobrem os cadáveres dos hospedeiros infectados (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). Uma vez aderidos à cutícula, os conídios iniciam a fase de germinação, facilitada por condições ambientais favoráveis. A germinação dos conídios consiste no desenvolvimento do tubo germinativo que se diferencia em apressório, estrutura que permite a penetração do fungo na cutícula (Schrank; Vainstein, 2010). A penetração é um processo ativo que combina a ação coordenada de enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula, como proteases, quitinases e lipases e a pressão mecânica aplicada pelo apressório (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 diferenciam-se em blastosporos, colonizando o hospedeiro. Essas estruturas espalham-se por todo o corpo do carrapato utilizando seu sistema circulatório para invadir outros tecidos (Mora; Castilho; Fraga, 2018). Durante o seu crescimento, o fungo produz metabólitos secundários tóxicos, como as dextruxinas, que estão relacionadas com seu potencial virulento. Estas toxinas têm a capacidade de interromper várias funções e estruturas no corpo do carrapato (Vey; Hoagland; Butt, 2001). Uma vez que o hospedeiro sucumbe totalmente à infecção e os recursos nutricionais do fungo se esgotam, ocorre o processo de extrusão das hifas e esporulação de conídios. As hifas rompem a cutícula do carrapato e iniciam o desenvolvimento de conidióforos que dão origem a novos conídios que recobrem o cadáver, auxiliando na dispersão da biomassa fúngica e infecção de um novo hospedeiro (Aw; Hue, 2017).

Comparado com outros agentes de controle microbiano, os fungos entomopatogênicos se destacam no controle de carrapatos porque conseguem infectar ativamente através da cutícula, sem a necessidade de serem ingeridos ou penetrarem por cavidades naturais. Esses entomopatógenos desempenham um papel fundamental como inimigos naturais dos carrapatos, demonstrando uma virulência relativamente específica e atuando nas diferentes fases do ciclo de vida destes artrópodes (Samish; Ginsberg; Glazer, 2004). Considerado um importante microrganismo no manejo de pragas e vetores, *M. anisopliae* é uma das espécies de fungos entomopatogênicos mais virulentas para carrapatos. Análises genéticas indicaram que *M. anisopliae* não é uma única espécie, mas sim um complexo diversificado, conhecido como *M. anisopliae* s.l. As espécies que o compõem apresentam particularidades, variando em fatores como virulência, especificidade de hospedeiros e tolerância a diferentes condições ambientais (Bischoff; Rehner; Humber, 2009).

A eficácia de *M. anisopliae* contra *R. microplus* tem sido amplamente investigada em diferentes condições experimentais. Pesquisas em laboratório comprovaram a virulência deste entomopatógeno contra o carrapato do boi, evidenciando seu potencial como agente biocontrolador (Bittencourt; Massard; Lima, 1994; Camargo *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2021). Em condições de semi-campo, estudos demonstraram sua eficácia em um ambiente mais próximo do natural (Camargo *et al.*, 2014; Marciano *et al.*, 2020; Mesquita *et al.*, 2020). Já os ensaios realizados em campo (Camargo *et al.*, 2016; Kaaya *et al.*, 2011) consolidaram sua aplicabilidade prática no controle populacional do carrapato.

Camargo *et al.* (2012) observaram, em ambiente controlado, que formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l. Ma 959 apresentaram virulência contra diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas). Sob condições de semi-campo, Mesquita *et al.* (2020) verificaram que os vasos de *Brachiaria brizantha* tratados com formulação oleosa de um isolado nativo de *M. anisopliae* (LCM S04) apresentaram número significativamente menor de larvas de em comparação ao controle não tratado. Além disso, os autores registraram a persistência do fungo no solo durante os cinco meses de pesquisa, reforçando seu potencial para o controle biológico da fase não parasitária do carrapato. No ensaio em ambiente natural, Camargo *et al.* (2016) demonstraram a eficácia de uma formulação oleosa de Metarril SP Organic plus® (produto comercial a base de *Metarhizium* spp.) no controle da fase parasitária dos carrapatos de bovinos alocados em piquetes, resultando em significativa diminuição do número médio de carrapatos coletados dos animais.

Impulsionado pela crescente integração de inovações biotecnológicas, o mercado nacional de fungicidas microbianos tem apresentado crescimento expressivo nos últimos anos. Esses entomopatógenos são amplamente utilizados como alternativa sustentável no manejo integrado de pragas que atingem a agricultura (Kidanu; Hagos, 2020). Grandes empresas do setor agrícola no Brasil têm investido significativamente no desenvolvimento e comercialização de produtos à base desses microrganismos, visando reduzir a dependência de produtos químicos convencionais e minimizar impactos ambientais (Mascarin *et al.*, 2019; Rajput *et al.*, 2024). Até o final de 2024, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) havia registrado 309 produtos como bioinseticidas, 119 como biofungicidas e 96 como bionematicidas (Andreatta *et al.*, 2025).

Embora diversas pesquisas tenham demonstrado potencial dos fungos entomopatogênicos no controle do carrapato *R. microplus*, ainda não existe no Brasil um produto comercial registrado especificamente para esse propósito. A implementação do Programa Nacional de Bioinsumos (PNB) surge como uma iniciativa capaz de mudar esse cenário. O PNB, lançado em 2020 pelo MAPA, tem como propósito fomentar, organizar e expandir o uso de insumos biológicos e naturais na agricultura e na pecuária brasileira. Além disso, o programa possibilitou a implementação de normas essenciais para o avanço da cadeia produtiva desses produtos, como **Marco Regulatório (Lei Nº 15.070, de 23 de dezembro de 2024)** que dispõe sobre a produção, a importação, a exportação, o registro, a comercialização, o uso, a inspeção, a fiscalização, a pesquisa, a experimentação, a embalagem, a rotulagem, a propaganda, o transporte, o armazenamento, as taxas, a prestação de serviços, a destinação de resíduos e embalagens e os incentivos à produção de bioinsumos para uso agrícola, pecuário, aquícola e florestal. A promulgação desta lei representa um marco relevante para o fortalecimento do setor no Brasil, ao desvincular os bioinsumos da regulamentação de pesticidas e fertilizantes, estabelecendo um regime jurídico próprio (Andreatta *et al.*, 2025; Policarpo *et al.*, 2025).

2.3 Efeitos de Fatores Abióticos sobre Fungos Entomopatogênicos

A exposição a condições ambientais adversas pode limitar de forma significativa a utilização de fungos entomopatogênicos em programas de controle de pragas (Santos *et al.*, 2022). Fatores estressantes como calor, frio, radiação ultravioleta, falta de nutrientes e desidratação podem comprometer a viabilidade desses microrganismos, reduzindo sua virulência, assim como capacidade de se disseminar e persistir no ambiente (Zimmermann, 2007a, 2007b). A radiação solar, especialmente nas faixas UV-A e UV-B, e a temperatura são considerados os principais fatores ambientais que comprometem a sobrevivência de fungos entomopatogênicos em condições de campo (Couceiro *et al.*, 2021).

A radiação UV-B atua diretamente sobre o DNA celular, promovendo danos que resultam na formação de fotoprodutos, como dímeros de pirimidina (Braga *et al.*, 2015; Brancini *et al.*, 2022). Como consequência, a exposição à radiação pode atrasar a germinação, reduzir a virulência ou até causar a morte dos conídios, o que limita a dispersão e reduz a densidade populacional dos fungos (Brancini; Bachmann; Braga, 2021; Corval *et al.*, 2021). Em relação à temperatura, a maioria dos fungos entomopatogênicos é classificada como mesófila, apresentando crescimento em uma faixa entre 10 e 40 °C, com desenvolvimento ideal entre 25 e 35 °C. Contudo, a exposição a estresses térmicos pode comprometer funções metabólicas, além de provocar a desnaturação de proteínas e desorganização das membranas celulares dos conídios (Paixão; Fernandes; Pedrini, 2019; Rangel *et al.*, 2010; Slowik *et al.*, 2024).

O estresse causado por exposições excessivas à radiação e à temperatura afeta a germinação e a culturabilidade dos conídios fúngicos. Nesse contexto, Braga *et al.* (2001a) observaram que um aumento de 30% na radiação UV-B reduziu significativamente a capacidade de formação de colônias pelos conídios de *Metarhizium* spp. ARSEF 2575 e ARSEF 23. Os autores também verificaram que exposições curtas à UV-B, de apenas uma hora, já eram suficientes para retardar a germinação dos propágulos, enquanto períodos mais longos provocaram atrasos que se estendiam por vários dias, indicando que dependendo da dose, o fungo necessita de mais tempo para se recuperar e completar o processo de germinação. De maneira consistente com esses achados, Mesquita *et al.* (2020) investigaram a termotolerância de nove isolados de *Metarhizium* spp., observando que a temperatura de 42 °C reduziu a viabilidade de todos os isolados, com exceção de *M. anisopliae* LCM S01 e LCM S04, que apresentaram germinação relativa de aproximadamente 69% e 55%, respectivamente.

A recuperação lenta após a exposição a condições de estresse pode afetar a capacidade de infecção do fungo no hospedeiro, reduzindo sua virulência e, consequentemente, seu potencial de uso como agente de biocontrole em condições ambientais. Essa relação foi evidenciada por Keyser *et al.* (2014) que demonstraram que o atraso no crescimento pós-estresse induzido pela exposição ao calor, em três isolados de *Metarhizium* spp., reduziu a eficácia desses entomopatógenos no controle de larvas de *Galleria mellonella*.

Bernardo *et al.* (2020) demonstraram que a sobrevivência de fungos submetidos ao calor e à radiação UV-B depende de fatores como o isolado fúngico, o tipo de propágulo e a intensidade ou duração da exposição ao estresse. Em relação aos diferentes propágulos, os autores verificaram que conídios aéreos tendem a ser mais resistentes tanto ao calor quanto à radiação UV-B em comparação aos blastosporos. Além disso, o estresse térmico mostrou-se mais prejudicial aos blastosporos do que a radiação. De forma semelhante, Corval *et al.* (2021) avaliaram a resistência de propágulos de *Metarhizium* spp. à UV-B e observaram que conídios, blastosporos e microescleródios de um mesmo isolado apresentaram níveis distintos de tolerância. No entanto, não foi possível identificar, de forma consistente, qual propágulo seria o mais resistente em cada isolado.

Isolados de fungos entomopatogênicos provenientes de diferentes regiões geográficas podem apresentar variações na sensibilidade à radiação UV-B e altas temperaturas. Nesse sentido, Fernandes *et al.* (2007) avaliaram a tolerância à radiação UV-B de 60 isolados de

Beauveria spp., provenientes de diferentes localidades. Observaram que dentre os fungos oriundos de latitudes de 0° a 22°, os de latitudes mais baixas apresentaram resistência maior do que aqueles provenientes de latitudes mais elevadas. Da mesma forma, Rangel *et al.* (2005) identificaram ampla variação na tolerância ao calor de conídios de 16 isolados de *M. anisopliae* e de um isolado de *Metarhizium acridum*, coletados entre as latitudes 61°N e 54°S, sendo que os de latitudes mais altas mostraram maior suscetibilidade ao calor em comparação aos obtidos próximos a linha do equador.

Estudos demonstraram que o cultivo sob iluminação pode aumentar a resistência de conídios de fungos entomopatogênicos aos fatores ambientais adversos. Rangel *et al.* (2011) identificaram que os conídios de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 produzidos sob luz apresentaram tolerância à radiação UV-B cerca de duas vezes maior em comparação aos cultivados no escuro. No mesmo âmbito, Dias *et al.* (2021) avaliaram dez espécies de fungos entomopatogênicos, verificando que a exposição a luz aumentou a resistência de *M. robertsii* e *M. anisopliae* ao calor, e de *Cordyceps fumosorosea*, *M. robertsii* e *Metarhizium brunneum* à radiação.

A seleção de isolados fúngicos resistentes a condições ambientais desfavoráveis, em especial as variações de radiação UV-B e temperatura, é fundamental para seu uso como agentes de controle em campo. No entanto, a formulação desses entomopatógenos também é indispensável para garantir sua eficácia no manejo de pragas. Diferentemente dos fungos aplicados de forma direta, que apresentam alta suscetibilidade aos agentes estressantes do ambiente, a formulação proporciona maior proteção dos propágulos, favorecendo a sobrevivência e a persistência dos microrganismos no ambiente. Sob essa perspectiva, diferentes estratégias de formulação têm sido exploradas com resultados promissores. Barreto *et al.* (2016) constataram que conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. formulados em óleo mineral puro, apresentaram maior tolerância a 45 °C por períodos de 2, 4 e 6 horas, em comparação com aqueles suspensos em solução de Tween 80. Do mesmo modo, Paixão (2017) avaliou a combinação de conídios de *Metarhizium* spp. com óleos puros ou misturados a surfactantes para o preparo de emulsões óleo-em-água. Essa abordagem proporcionou proteção significativa dos propágulos frente ao estresse térmico e, segundo o autor, constitui uma estratégia de formulação promissora. Além de aumentar a tolerância ao calor, pode também potencializar a eficácia dos fungos por meio da melhora na dispersão durante a pulverização e da maior adesão dos conídios à cutícula dos hospedeiros. Resultados similares também foram obtidos com formulações sólidas. Santos *et al.* (2021) observaram que a formulação de microescleródios de *M. anisopliae* IP 119 em pellets gerou partículas granulares capazes de preservar a viabilidade do fungo após secagem em leito fluidizado, armazenamento a 4 °C por curtos períodos e exposição a elevadas doses de radiação UV-B. De forma semelhante, Meirelles *et al.* (2023) demonstraram que o encapsulamento de conídios de *M. anisopliae* LCM S01 em micropartículas de alginato de sódio a 2 ou 3%, por meio da técnica de gelificação iônica, aumentou a vida útil à temperatura ambiente, além de conferir maior tolerância à UV-B e à exposição ao calor.

Além de aumentar a capacidade dos fungos de permanecerem viáveis e funcionais no ambiente, a formulação de propágulos também contribui para a manutenção da vida útil desses entomopatógenos durante etapas como armazenamento e transporte. Outra vantagem é a facilidade de aplicação em diferentes estratégias de controle, bem como a possibilidade de inclusão de aditivos que estimulam a germinação e a adesão ao hospedeiro. Em conjunto, esses fatores diminuem a necessidade de reaplicações frequentes e reforçam o potencial dos entomopatógenos como agentes de biocontrole viáveis e economicamente competitivos (Jenkins; Grzywacz, 2000; Quesada-Moraga *et al.*, 2024).

2.4 Encapsulamento de Fungos Entomopatogênicos: Inovação no Desenvolvimento de Formulações

As formulações granulares representam uma estratégia para o emprego de microrganismos no controle biológico de pragas (Marciano *et al.*, 2021). Os grânulos são estruturas sólidas nas quais o ingrediente ativo, como um microrganismo, está firmemente incorporado, proporcionando proteção contra condições ambientais adversas e facilitando o manuseio durante a aplicação (Faria; Wraight, 2007). A tecnologia de encapsulamento é amplamente utilizada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosmética com a finalidade de proteger, estabilizar e liberar, de forma controlada, ingredientes ativos, como enzimas, probióticos, óleos essenciais e compostos bioativos (Zabot *et al.*, 2022). O encapsulamento, como método de imobilização celular, tem ganhado relevância na produção de formulações granulares contendo agentes microbianos de biocontrole (Celestino; Oliveira, 2022; Vindas-Reyes; Chacón-Cerdas; Rivera-Méndez, 2024). Essa técnica não apenas protege os microrganismos dos intempéries ambientais, mas também possibilita a liberação controlada do agente encapsulado, facilita o manuseio e contribui para a redução tanto da quantidade de biomassa empregada quanto a frequência das aplicações (Bejarano; Puopolo, 2021; Vemmer; Patel, 2013). Dentre as técnicas disponíveis para o encapsulamento de microrganismos, as mais empregadas para fungos entomopatogênicos são o *spray drying* (Acuña-Jiménez *et al.*, 2015; De Jesus Seabra *et al.*, 2024; Felizatti *et al.*, 2021; Liu; Liu, 2009a), a coacervação (Qiu *et al.*, 2019) e a gelificação iônica (Baldiviezo *et al.*, 2023; Bitencourt *et al.*, 2024; Liu; Liu, 2009b; Lorenz; Humbert; Patel, 2020; Rodrigues *et al.*, 2017).

No método de *spray drying*, uma suspensão líquida contendo os propágulos fúngicos, materiais encapsulantes e/ou agentes protetores é pulverizada através de um atomizador dentro de uma câmara de ar quente (Felizatti *et al.*, 2021). O contato com ar quente provoca evaporação instantânea da água e gera um pó com partículas secas contendo o fungo encapsulado (Acuña-Jiménez *et al.*, 2015). As principais vantagens incluem rapidez no processo, facilidade de armazenamento e transporte do produto final, boa reprodutibilidade, prolongamento da vida útil do fungo encapsulado e possibilidade de implementação em larga escala (Saber-Riseh *et al.*, 2021). Nos estudos conduzidos por Felizatti *et al.* (2021) a técnica de *spray drying* foi aplicada para o desenvolvimento de formulações em pó contendo conídios de *B. bassiana*. Os resultados indicaram que essas formulações proporcionaram maior proteção dos conídios frente à exposição térmica (60 °C por 4 horas) e à radiação UV (48 horas), quando comparado com o fungo não formulado, além de se mostrarem eficazes no controle de *Spodoptera cosmioides*, com taxa de mortalidade de até 90%. Por outro lado, a técnica apresenta limitações, especialmente para fungos sensíveis ao calor, cuja viabilidade pode ser comprometida pelas altas temperatura relacionadas ao processo. Além disso, a aquisição do equipamento spray dryer requer investimento elevado e a sua operação exige conhecimento técnico especializado (Jyothi *et al.*, 2010; Saber-Riseh *et al.*, 2021). As investigações de Liu, Liu (2009a) indicaram que o processo tradicional de *spray drying*, conduzido a altas temperaturas (100/80 °C), provocou redução na viabilidade dos conídios de *B. bassiana*, enquanto a secagem em condições mais amenas (60/30 °C) foi mais eficaz na conservação da vida útil do fungo.

A coacervação é uma técnica de encapsulamento que envolve a combinação de dois ou mais polímeros de cargas elétricas opostas (catiônicos e aniônicos) (Jyothi *et al.*, 2010). Ao se misturarem, os polímeros interagem formando um complexo polieletrólítico denominado coacervado. Durante esse processo, o fungo a ser encapsulado é incorporado na estrutura do coacervado o que resulta na formação de cápsulas (Choudhury; Meghwal; Das, 2021). Entre suas principais vantagens está a alta eficiência de encapsulamento, que pode atingir até 99%, além do fato de não envolver altas temperaturas, o que favorece a viabilidade de fungos sensíveis ao calor (Qiu *et al.*, 2019; Vemmer; Patel, 2013). Em estudo realizado por Qiu *et al.*

(2019), o método de coacervação foi utilizado para encapsular conídios de *M. anisopliae* em partículas formadas por gelatina e goma arábica. Após exposição à radiação UV-B por 3 horas, conídios encapsulados apresentaram altas taxas de germinação, evidenciando o efeito protetor da formulação. Além disso, os pesquisadores testaram a formulação contra formigas *Solenopsis invicta*, obtendo resultados positivos no controle da praga. No entanto, a técnica exige controle rigoroso, pois variações de pH e temperatura podem comprometer a formação das cápsulas. Ainda, alguns protocolos podem demandar o uso de substâncias nocivas para o microrganismo (Zabot *et al.*, 2022).

A gelificação iônica é uma técnica de encapsulamento por gotejamento que se destaca por sua simplicidade e versatilidade (Melo; Constant, 2021). O processo consiste na formação de cápsulas a partir da interação entre um polímero, geralmente o alginato de sódio, e íons de cálcio (Patil *et al.*, 2010). A solução polimérica contendo o propágulo fúngico a ser encapsulado é gotejada numa solução de cloreto de cálcio, resultando na gelificação instantânea do material (Baldiviezo *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2017). Este processo forma cápsulas de gel que envolvem e aprisionam o fungo no interior da matriz polimérica (Leong *et al.*, 2016; Vemmer; Patel, 2013). A gelificação iônica é um método muito vantajoso uma vez que não demanda o uso de equipamentos específicos e não envolve a aplicação de substâncias tóxicas e altas temperaturas, o que contribui para a manutenção da viabilidade fúngica (Vemmer; Patel, 2013). Além disso, possibilita a liberação controlada do fungo no ambiente e pode ser facilmente adaptada para produção em escala industrial (Leong *et al.*, 2016). Contudo, limitações incluem a sensibilidade das cápsulas a ambientes com pH ácidos e baixa estabilidade durante o armazenamento prolongado, sob condições de variação de temperatura e umidade (Patil *et al.*, 2010).

No encapsulamento por gelificação iônica, é comum o uso do termo “*beads*” para se referir às partículas sólidas e esféricas resultantes do processo (Leong *et al.*, 2016). A matriz básica da cápsula é formada por polímeros, preferencialmente biodegradáveis, como os polissacarídeos de origem natural. Dentre os mais utilizados, destacam-se: alginatos, carrageninas, agar/agarose, goma gelana, goma de guar, goma arábica, amido, celulose, pectina e quitosano (Guiseley, 1989; Murano, 1998; Smidsrod; Skjakbrk, 1990). O alginato de sódio, um polímero extraído da parede celular de algas marinhas, é muito utilizado como matriz de revestimento de compostos biológicos, devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ampla disponibilidade (Garcia-Cruz; Foggetti; Silva, 2008; Martínez-Cano *et al.*, 2022). Embora seja solúvel em água, a adição de cátions divalentes, como o cálcio, o torna insolúvel, promovendo a formação de géis ou filmes (Garcia-Cruz; Foggetti; Silva, 2008; Melo; Constant, 2021).

O uso combinado de diferentes biopolímeros naturais tem sido cada vez mais explorado no encapsulamento de fungos entomopatogênicos através de gelificação iônica (Pavithran *et al.*, 2024). Essa abordagem visa conferir maior resistência às cápsulas, controle na liberação e manutenção da viabilidade do propágulo fúngico encapsulado (Leong *et al.*, 2016; Locatelli *et al.*, 2018). O desenvolvimento de cápsulas que, além de oferecerem proteção ao microrganismo, atuem como sistemas encapsulantes eficazes e funcionalmente bioativos é uma estratégia promissora (Pavithran *et al.*, 2024). Lorenz, Humbert e Patel (2020) encapsularam blastosporos de *Metarhizium pemphigi* em grânulos de alginato de sódio adicionado de quitina, através da técnica de gelificação iônica. Verificaram que o uso de polímeros nutritivos para o fungo, como a quitina, transforma os grânulos em microfermentadores que multiplicam a produção dos conídios aéreos, o que pode reduzir a quantidade de partículas necessárias para o controle de artrópodes. Além disso, a formulação com quitina permitiu a maior sobrevivência dos conídios ao processo de secagem. A incorporação da pectina no encapsulamento de fungos entomopatogênicos por gelificação iônica é uma abordagem promissora em razão das propriedades estruturais e funcionais deste biopolímero (Martau; Mihai; Vodnar, 2019;

Rosales; Fabi, 2023). Ao interagir com íons cálcio, a pectina forma uma rede tridimensional de gel capaz de aprisionar as células no interior das cápsulas. Desta forma, a gelificação da pectina permite a formação de gotas densas e regulares que resultam em cápsulas com formato esférico uniforme, mais rígidas e mecanicamente resistentes (Bekhit *et al.*, 2016; Krell *et al.*, 2018).

Além dos polímeros utilizados na formação da matriz encapsulante, substâncias denominadas adjuvantes funcionais são adicionadas à formulação com o objetivo de otimizar as propriedades físico-químicas das cápsulas e assegurar a viabilidade do microrganismo encapsulado (Bejarano; Puopolo, 2021). O glicerol tem propriedade plastificante e pode ser incorporado em matrizes poliméricas à base de alginato de sódio (Dos Santos *et al.*, 2015; Locatelli *et al.*, 2018; Sarma *et al.*, 2023). Seu papel principal é aumentar a flexibilidade e resistência mecânica das cápsulas, prevenindo sua fragilidade em etapas como processo de secagem, armazenamento e aplicação no campo. Dos Santos *et al.* (2015) demonstraram que uso do método de gelificação iônica para o encapsulamento de *Trichoderma* sp, fungo usado no biocontrole de fitopatógenos, em esferas de alginato adicionadas de maiores concentrações de glicerol, permitiu a manutenção da viabilidade celular por longos períodos em temperatura ambiente. Além disso, Sarma *et al.* (2023) utilizaram a técnica de gelificação iônica para produção de esferas liofilizadas de alginato de sódio e glicerol capazes de manter a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, encapsulados, por um período de 10 meses de armazenamento em temperatura ambiente.

Trabalhos recentes avaliaram o potencial de partículas de alginato contendo fungos entomopatogênicos encapsulados através da gelificação iônica, para o controle dos carrapatos *Ixodes ricinus* e *R. microplus*, do triatomíneo *Triatoma infestans* e do mosquito *Aedes aegypti*. Lorenz, Humbert e Patel (2020) testaram o potencial dos blastosporos de *M. pemphigi*, encapsulados em alginato de sódio com a adição de amido de milho ou quitina, no controle de *I. ricinus*. Observaram que os conídios aéreos recém-formados de ambas as formulações apresentaram alta virulência e causaram 100% de mortalidade das ninfas do carrapato. Meirelles *et al.* (2023) encapsularam conídios de *M. anisopliae* em 2% ou 3% de alginato de sódio e constataram que as partículas formadas foram capazes de diminuir os parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* de forma mais significativa do que os conídios não encapsulados. Nos estudos conduzidos por Bitencourt *et al.* (2024), cápsulas à base de alginato de sódio contendo conídios de *B. bassiana* demonstraram eficiente taxa de liberação e atividade larvicida em ensaios realizados tanto em laboratório quanto em condições de semicampo. As análises histopatológicas das larvas tratadas com as cápsulas revelaram a presença do fungo no trato digestivo, além de lesões evidentes nos enterócitos. Baldiviezo *et al.* (2023) avaliaram, em condições de semicampo, a atividade bioinseticida e o efeito residual de conídios de *B. bassiana* encapsulados em alginato de sódio sobre ninfas de *T. infestans* resistentes a piretroides. Os resultados demonstraram que a formulação encapsulada promoveu maior mortalidade das ninfas em comparação à forma não encapsulada do fungo. Além disso, o encapsulamento contribuiu para a preservação da viabilidade dos conídios ao longo de todo o período experimental, evidenciando sua eficácia nas condições testadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização dos Experimentos

A maior parte dos 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, Brasil. A análise por FTIR foi realizada na Central Analítica Multiusuários do Programa de Pós-graduação em Química da UFRRJ (CAM/UFRRJ). Já as análises de microscopia eletrônica de varredura, foram realizadas no Centro de Tecnologia e Mineral (CETEM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil, nas coordenadas geográficas 22°41'S e 43°41'O.

3.2 Obtenção e Manutenção do Isolado Fúngico de *Metarhizium anisopliae* s.l.

O isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) (Metschn.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), obtido de um inseto da família Cercopidae no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, em 1982, foi utilizado para o preparo das micropartículas fúngicas. O isolado foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil. O cultivo foi realizado em meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) (Kasvi), a 25 ± 1 °C e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ por 14 dias, sob um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Após este período, as placas foram armazenadas a 4 °C. O isolado fúngico foi escolhido com base em estudos anteriores (Perinotto *et al.*, 2014) que demonstraram alta virulência contra larvas e fêmeas de *Rhipicephalus microplus*.

3.3 Obtenção da Suspensão Fúngica Aquosa

Para obtenção da suspensão fúngica aquosa do isolado *M. anisopliae*, os conídios foram raspados da superfície do meio BDA e suspensos em solução de 0,02% de Tween 80® (Isotar). A suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer, e ajustada para a concentração desejada. Um teste de viabilidade dos conídios foi realizado após o preparo de todas as suspensões, sendo consideradas adequadas apenas as que apresentaram valores iguais ou superiores a 95% de germinação fúngica (Alves, 1998).

3.4 Obtenção e Manutenção do Carrapato *Rhipicephalus microplus*

Para a realização do experimento foi utilizada a cepa brasileira de *R. microplus* denominada Porto Alegre (POA), que é sensível a acaricidas. Para a obtenção da quantidade necessária de fêmeas ingurgitadas, foi realizada infestação artificial de bovinos mantidos alojados em baias de alvenaria. Após o período de aproximadamente 21 dias, as teleóginas foram coletadas do piso das baias dos animais (Comitê de Ética no Uso de Animais/IV/UFRRJ, protocolo nº 6274250624) na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do DPA, IV, UFRRJ, Brasil. As fêmeas foram levadas até o laboratório, lavadas com água

corrente, imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% para assepsia da cutícula e secas em papel toalha. Posteriormente, foram pesadas e separadas em grupos homogêneos quanto ao peso.

3.5 Encapsulamento Fúngico por Gelificação Iônica

As micropartículas foram preparadas pelo método de encapsulamento por gelificação iônica (Meirelles *et al.*, 2023) (Figura 1). Os polímeros alginato de sódio (Sigma[®]), pectina (Sigma[®]) e quitina (Sigma[®]), assim como a substância adjuvante glicerol (Sigma[®]) foram utilizados na concentração de 2% (p/v). A seleção dos polímeros e da substância adjuvante, bem como a definição de suas concentrações, baseou-se em resultados de estudos prévios e das propriedades individuais de cada substância, consideradas adequadas para esse tipo de formulação. O alginato de sódio foi escolhido pela elevada capacidade de formar géis estáveis por meio da gelificação iônica (Meirelles *et al.*, 2023); a pectina por conferir maior rigidez estrutural às cápsulas (Locatelli *et al.*, 2018); o glicerol, por apresentar propriedades higroscópicas, plastificantes e osmoprotetoras (Sarma *et al.*, 2023); e a quitina, por atuar como fonte nutricional e favorecer a multiplicação dos propágulos (Lorenz; Humbert; Patel, 2020). Inicialmente, para a formação da matriz encapsulante, os seguintes grupos de micropartículas fúngicas foram formados: alginato de sódio (A); alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina (AP); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol (AG); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); alginato de sódio + pectina + glicerol (APG) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ).

As soluções de polímeros foram preparadas através da dissolução dos mesmos diretamente na suspensão fúngica, com o auxílio de agitador magnético para se obter uma mistura homogênea. As soluções poliméricas contendo o isolado fúngico foram gotejadas, através de seringa e agulha estéril (18G × 1 1/2”), em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) (Dinâmica) a 0,1 M (Figura 1). Após o preparo, as micropartículas foram colocadas em peneiras e lavadas com água destilada estéril para remoção do excesso de CaCl₂. Em seguida, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 27 °C durante 15 horas (Rodrigues *et al.*, 2017). As micropartículas sem o fungo encapsulado (grupo controle) foram preparadas como descrito anteriormente, no entanto a dissolução dos polímeros foi efetuada na solução de 0,02% de Tween 80[®] sem a presença do fungo.

Um lote de micropartículas fúngicas foi preparado para cada experimento desenvolvido, de modo que as partículas não permaneceram armazenadas.

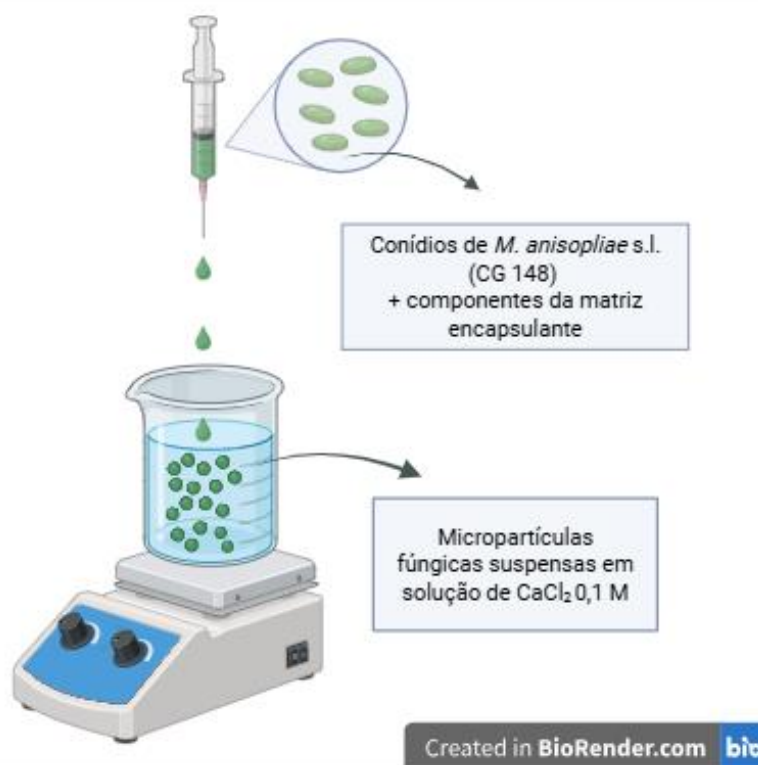


Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de desenvolvimento das micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados, através do método de gelificação iônica.

3.6 Eficiência do Processo de Encapsulamento Fúngico

A eficiência do processo de gelificação iônica, utilizando como matriz encapsulante alginato de sódio e as diferentes combinações de polímeros (pectina e quitina) e substância adjuvante (glicerol), foi avaliada quanto à capacidade de encapsulamento dos conídios e a interferência na viabilidade fúngica. Uma alíquota de 1 g das micropartículas fúngicas foi solubilizada em 10 mL de solução de citrato de sódio (Sigma®) a 2% acrescida de Tween 80® a 0,02% (Locatelli *et al.*, 2018) e a suspensão obtida foi quantificada em câmara de Neubauer. Os valores das concentrações da suspensão inicial, utilizada para o preparo das micropartículas, assim como das suspensões obtidas após a solubilização das mesmas foram comparados. Essa análise permitiu avaliar a capacidade de encapsulamento dos conídios, além de identificar possíveis perdas deste propágulo ao longo do processo (Meirelles *et al.*, 2023).

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 micropartículas e a suspensão obtida após solubilização das mesmas) a 1×10^5 conídios/mL foi inoculada em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm, Kasvi) contendo 8 mL de meio de cultura BDA + benomyl a 0,002% (p/v) (50% de ingrediente ativo; Benlate®, DuPont) (Milner; Huppertz; Swaris, 1991). Foram feitas três réplicas por grupo. As placas foram incubadas por 24 h a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$. A germinação fúngica foi avaliada em microscópio óptico (Nikon; ECLIPSE E200MV R) ($\times 40$) 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 da Interferência da Quitina na Produção de Conídios das Micropartículas Fúngicas

Para avaliar se a quitina incorporada na formulação estimula ou não a maior produção de conídios, 0,125 g de micropartículas contendo a quitina (AQ; APQ; AGQ; APGQ) ou não (A; AP; AG; APG) foram colocadas na superfície do meio BDA + Cloranfenicol a 0,05% (p/v) contido em placas de Petri (três placas por grupo). Estas permaneceram incubadas a 27 °C e UR $\geq$ 80% durante 15 dias. Após este período, as micropartículas esporuladas foram raspadas, com auxílio de lâmina de bisturi, e suspensas em 10 mL de Tween 80[®] a 0,02% (Lorenz; Humbert; Patel, 2020). A suspensão foi homogeneizada, quantificada, com o auxílio da câmara de Neubauer (Alves, 1998) e o número de conídios por grama de partícula foi posteriormente determinado. Os experimentos foram repetidos três vezes.

As formulações com quitina (AQ, APQ, AGQ e APGQ) foram selecionadas para compor os grupos das análises seguintes.

3.8 Caracterização das Micropartículas Fúngicas

As micropartículas contendo conídios fúngicos encapsulados (AQ, APQ, AGQ e APGQ) foram caracterizadas através das análises de distribuição de tamanho, morfológicas e estrutural.

3.8.1 Análise da distribuição de tamanho

Imagens de 100 micropartículas foram obtidas de microscópio estereoscópio. Em seguida, a distribuição do tamanho do diâmetro das partículas foi realizada por meio da análise das imagens no software ImageJ (Maruyama *et al.*, 2020).

3.8.2 Análises morfológicas

A morfologia externa das micropartículas AQ, APQ, AGQ e APGQ contendo conídios encapsulados germinados ou não germinados foi avaliada. Para estimular o processo de germinação dos conídios encapsulados, as micropartículas foram distribuídas sobre a superfície do solo úmido e estéril, acondicionado em Placas de Petri de vidro (60 × 15 mm). Em seguida, as placas foram incubadas por sete dias a 27 ± 1 °C e UR $\geq$ 80. As análises morfológicas foram realizadas através de observações em microscópio estereoscópio e microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectrometria de dispersão de energia (EDS) acoplada.

Para realização da MEV, as micropartículas foram aderidas *in natura* sobre um suporte de alumínio, com o auxílio de fita de carbono adesiva dupla face, e revestidas com prata em Baltec SCD 050 Sputter Coater, através da utilização de vácuo com argônio e aplicação de uma corrente de 30 mA durante 250 segundos. Para a visualização e registros das fotos foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 400 (FEI Company, Oregon, USA) em alto vácuo, tensão de aceleração de elétrons de 20 kV, com detector de elétrons retroespalhados e

EDS Esprit 2.5 da Bruker. Ambos os aparelhos são pertencentes ao Centro de Tecnologia e Mineral (CETEM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.8.3 Análise por espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para identificação estrutural dos polímeros e de seus grupos funcionais, assim como para avaliar a interação entre os conídios *M. anisopliae* s.l. CG 148 e a matriz polimérica de encapsulamento. Qualquer mudança nos espectros que represente uma interação entre componentes das partículas contendo o fungo encapsulado, podem prever um mecanismo de proteção (Maruyama *et al.*, 2020). A análise por FTIR foi realizada na Central Analítica Multiusuários do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CAM/UFRRJ) utilizando um instrumento BRUKER VERTEX 70. O modo de refletância total atenuada (ATR) foi utilizado, com uma faixa de 4000-400 cm^{-1} , 16 varreduras por amostra e uma resolução de 4 cm^{-1} .

As seguintes amostras foram analisadas: alginato de sódio (A); pectina (P); glicerol (G); quitina (Q); conídios fúngicos (Ma); micropartículas de alginato + quitina sem fungo (AQ); micropartículas fúngicas de alginato + quitina (AQ/Ma); micropartículas de alginato + pectina + quitina sem fungo (APQ); micropartículas fúngicas de alginato + pectina + quitina (APQ/Ma); micropartículas de alginato + glicerol + quitina sem fungo (AGQ); micropartículas fúngicas de alginato + glicerol + quitina (AGQ/Ma); micropartículas de alginato + pectina + glicerol + quitina sem fungo (APGQ); micropartículas fúngicas de alginato + pectina + glicerol + quitina (APGQ/Ma).

3.9 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas

Os conídios encapsulados nas formulações AQ, APQ, AGQ e APGQ, assim como os conídios não encapsulados (NEC), foram armazenados em microtubos do tipo Eppendorf por um período de dois meses, sob duas condições de temperatura diferentes: ambiente (24,8 °C; bancada do laboratório) e refrigeração (5 °C; geladeira) (adaptado de Meirelles *et al.*, 2023). As amostras foram avaliadas ao final do primeiro e do segundo mês de armazenamento quanto à viabilidade fúngica, conforme metodologia descrita anteriormente no item 3.6.

O grupo NEC foi obtido por meio da raspagem dos conídios fúngicos da superfície do meio de cultura. Esses conídios corresponderam aos mesmos utilizados na preparação da suspensão fúngica empregada na elaboração das micropartículas. As temperaturas mínima e máxima de cada condição de armazenamento (ambiente e refrigeração) foram monitoradas e registradas semanalmente ao longo de todo o período experimental.

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

Para avaliar a tolerância à irradiação UV-B dos conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados, 1 g de micropartículas AQ, APQ, AGQ e APGQ foram colocadas em placas de Petri de vidro (60 × 15 mm) para serem expostas à radiação. Paralelamente, foi preparada uma suspensão aquosa (Tween 80[®] a 0,02%) contendo conídios não encapsulados do isolado CG 148 (NEC), conforme descrito no item 2.3. Uma alíquota de 20 μL da suspensão fúngica a 1×10^5 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).

As placas contendo micropartículas e aquelas com suspensões do fungo não encapsuladas foram expostas à irradiação UV-B por 2 h 30 min, correspondendo a uma dose total de $6,0 \text{ kJ m}^{-2}$, em câmara equipada com duas lâmpadas fluorescentes TL20 W / 12 RS (Philips). Nos grupos controle (micropartículas e suspensões não expostas a irradiação), as placas foram envoltas em papel alumínio e mantidas na câmara para garantir condições experimentais equivalentes.

Todas as placas foram recobertas com filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries) que bloqueia radiações com comprimento de onda $< 290 \text{ nm}$. Esse procedimento permitiu a passagem da maior parte da radiação UV-B (290–320 nm) e de pequena fração de UV-A (320–400 nm), bloqueando tanto a radiação UV-C ($< 280 \text{ nm}$) comprimento de onda curta da 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 e 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 determinar a viabilidade dos conídios expostos ou não a irradiação UV-B, as micropartículas fúngicas de alginato de sódio, foram solubilizadas em citrato de sódio 2% (p/v) conforme descrito anteriormente no tópico 3.6. Em seguida, uma alíquota de 20 μL (1×10^5 conídios/mL) das partículas solubilizadas foi inoculada em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm) contendo 8 mL de BDA + benomyl a 0,002% (p/v). Todas as placas foram incubadas por 24 h a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$, para avaliação da germinação dos conídios.

As porcentagens relativas de germinação foram calculadas através da relação entre o número de conídios germinados expostos à radiação e o número de conídios germinados não expostos à radiação (Braga *et al.*, 2001b). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

3.11 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados

Para avaliar o efeito da temperatura sobre os conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148, 1 g de micropartículas (AQ, APQ, AGQ e APGQ) ou 2 mL de suspensão fúngica aquosa com conídios não encapsulados (1×10^5 conídios/mL), do mesmo isolado, foram transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca e submetidos a banho-maria a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h (Fernandes *et al.*, 2008). Os controles foram formados pelos mesmos grupos e mantidos a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ em câmara climatizada.

Após a exposição ou não ao calor, as micropartículas foram solubilizadas em citrato de sódio 2% (p/v) e a suspensão obtida inoculada em BDA + benomyl a 0,002% para avaliação da viabilidade fúngica, seguindo o mesmo procedimento para a suspensão aquosa com conídios não encapsulados. Todas as placas foram incubadas por 24 h a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ para avaliação da germinação dos conídios, conforme descrito anteriormente no tópico 3.6. As porcentagens relativas de germinação foram calculadas segundo Braga *et al.* (2001b). Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.12 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em Condições de Laboratório

Para a realização dos ensaios biológicos, os seguintes grupos foram formados: controle aquoso Tween 80® (CTR TWEEN); suspensão fúngica com conídios não encapsulados (NEC); micropartículas controle de alginato + quitina sem fungo (CTR AQ); micropartículas fúngicas de alginato + quitina (AQ); micropartículas controle de alginato + pectina + quitina sem fungo (CTR APQ); micropartículas fúngicas de alginato + pectina + quitina (APQ); micropartículas

controle de alginato + glicerol + quitina sem fungo (CTR AGQ); micropartículas fúngicas de alginato + glicerol + quitina (AGQ); micropartículas controle de alginato + pectina + glicerol + quitina sem fungo (CTR APGQ) e micropartículas fúngicas de alginato + pectina + glicerol + quitina (APGQ). Quanto ao tratamento com os conídios encapsulados, 30 mg de micropartículas fúngicas (AQ, AP, AGQ e APGQ) foram espalhadas manualmente sobre a superfície de placas de Petri de vidro contendo 5 g de solo (Natussolos do Brasil Ltda) estéril seco, previamente umedecido com 1 mL de água destilada estéril (Meirelles *et al.*, 2023). As placas foram incubadas durante sete dias a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ para que os conídios pudessem esporular a partir das micropartículas. O tratamento com as micropartículas controles sem o fungo (CTR AQ; CTR APQ, CTR AGQ e CTR APGQ) foi realizado no mesmo dia, seguindo a mesma metodologia, inclusive a incubação das placas por 7 dias.

Após sete dias de incubação das micropartículas, os grupos contendo conídios não encapsulados (NEC) foram estabelecidos por meio do tratamento do solo presente nas placas com 1 mL de uma suspensão fúngica aquosa de *M. anisopliae* s.l. CG 148, preparada na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL, equivalente à quantidade de conídios contida em 30 mg de partículas. O solo do grupo controle aquoso Tween 80 (CTR TWEEN) foi tratado com 1 mL de solução de Tween 80® a 0,02%. Ainda no sétimo dia foi acrescentada uma fêmea ingurgitada sobre o solo de cada placa (10 placas por grupo), sendo estas mantidas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$ durante todo o período de avaliação do ensaio. Quando foi constatada baixa umidade no fundo da placa, por meio de avaliação visual, realizou-se a umidificação do solo por meio da adição de 100 µL de água destilada estéril.

A sobrevivência das fêmeas foi avaliada a cada dois dias durante 15 dias. 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 ± 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 CTR TWEEN. Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.12.1 Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Após a avaliação do peso final das fêmeas utilizadas para o ensaio em laboratório, três espécimes de fêmeas dos grupos tratados com fungo encapsulado (AQ, APQ, AGQ e APGQ) ou não (NEC) foram separadas para o reisolamento fúngico. Para isso, a cutícula das mesmas foi lavada em água corrente com o auxílio de uma escova com cerdas macias, para a remoção de material fúngico presente no exterior. 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 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, até a exteriorização fúngica através da cutícula.

Posteriormente, as fêmeas foram transferidas para o meio de cultura ágar enriquecido com extrato de levedura e suplementado com cloranfenicol, tiabendazol e ciclohexamida (CTC) (Fernandes *et al.*, 2010), enquanto uma amostra do material fúngico presente na superfície da cutícula foi transferida para o meio de cultura BDA. 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. As características morfológicas das colônias reisoladas (aparência da colônia,

coloração e formato dos conídios), foram avaliadas e comparadas às da colônia do isolado de *M. anisopliae* s.l. CG 148 encapsulado (Bischoff; Rehner; Humber, 2009). A semeadura em ponto foi utilizada para a observação das características macroscópicas das colônias. Para as análises microscópicas, empregou-se a técnica de microcultivo, conforme descrito por Alves (1998). As estruturas fúngicas foram coradas com azul de metila e observadas em microscópio óptico com aumento de 400×.

3.13 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em Condições de Semi-campo

Cinco meses antes do início do experimento (dezembro de 2024), sementes do capim forrageiro *Urochloa decumbens* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf (Poales: Poaceae) cv. Marandu (capim forrageiro) (Wolf® seeds do Brasil, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foram plantadas em vasos de polipropileno (22 cm de altura e 24 cm de largura) preenchidos com 1/3 de areia e pedra para drenagem de água e 2/3 de condicionador de solo não estéril (Natussolos do Brasil Ltda, Taubaté, SP, Brasil). Foram utilizados 50 vasos no total, distribuídos em 5 grupos experimentais, com 10 vasos por grupo. Todos os vasos foram mantidos em área externa do LCM, com incidência direta de sol e chuva (Figura 2-A). As plantas foram cultivadas com irrigação diária e monitoramento regular, a fim de assegurar crescimento uniforme ao longo de todo o período experimental. Sete dias antes da aplicação das micropartículas, todos os vasos foram submetidos à poda da forrageira, padronizando a altura em 35 cm.

Para otimizar a execução do ensaio em condições de semi-campo, e com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores, foram selecionadas as formulações APQ e AGQ, com o objetivo de avaliar o efeito específico da pectina e do glicerol quando incorporados a uma matriz de alginato de sódio e quitina. Os seguintes grupos foram formados: controle sem tratamento (CTR); micropartículas controle de alginato + pectina + quitina sem fungo (CTR APQ); micropartículas fúngicas de alginato + pectina + quitina (APQ); micropartículas controle de alginato + glicerol + quitina sem fungo (CTR AGQ); micropartículas fúngicas de alginato + glicerol + quitina (AGQ). Uma alíquota de 500 mg de micropartículas (equivalente a quantidade de partículas utilizadas no ensaio em condições de laboratório), contendo o fungo encapsulado ou não, foram espalhadas manualmente em cada vaso sobre a superfície do solo contendo a forrageira plantada. Após 13 dias, tempo de esporulação dos conídios a partir da superfície das partículas fúngicas (Figura 2-B e C), 3 fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram colocadas sobre o solo de cada vaso (peso homogêneo de fêmeas por grupo).

Os vasos foram inspecionados para observação da oviposição das fêmeas e eclosão das larvas. Após 48 dias da adição das fêmeas ingurgitadas, as larvas dispostas no ápice do capim foram coletadas (Figura 2-D), através de um corte na folha, e congeladas para posterior contagem. Os vasos foram, então, inspecionados todos os dias, por um período de 50 dias, até que nenhuma larva fosse observada (Marciano *et al.*, 2021; Mesquita *et al.*, 2020). Para monitoramento de temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade, foram obtidos os registros do banco de dados meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), do Ministério de Agricultura e Pecuária.

Para a avaliação da eficácia dos tratamentos na recuperação de larvas de *R. microplus*, foi realizado o cálculo conforme proposto por Bittencourt *et al.* (2003), utilizando a fórmula: eficácia (%) = $(A - B)/A \times 100$, em que A representa a média de larvas observadas no grupo controle e B a média de larvas no grupo tratado. A eficácia dos grupos tratados com micropartículas fúngicas (APQ e AGQ) sobre a recuperação de larvas foi determinada em relação ao grupo controle sem tratamento (CTR), bem como em comparação com os respectivos grupos controle de micropartículas sem fungo (CTR APQ e CTR AGQ).

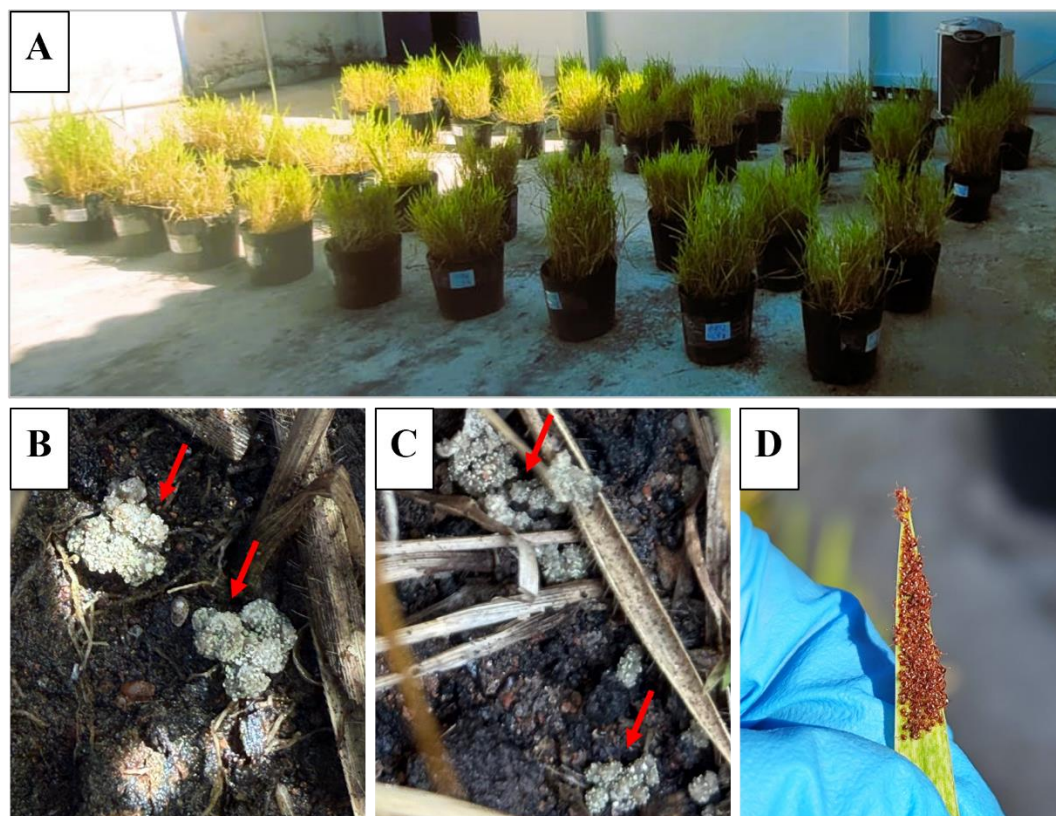


Figura 2: Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de semi-campo. Vasos de *Urochloa decumbens* na área externa ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária com incidência direta de luz, chuva e calor (A); conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 esporulados a partir da superfície das micropartículas fúngicas (apontadas pela seta vermelha) de alginato de sódio + pectina + quitina (B) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (C) 13 dias após o tratamento do solo; larvas do carrapato no ápice das folhas da forrageira (D).

3.13.1 Reisolamento fúngico de amostras do solo tratado

No dia anterior aos tratamentos, amostras de solo foram coletadas de cada vaso para a verificação da presença de fungos. Posteriormente, novas amostras de solo foram coletadas de cada vaso, tanto dos grupos controle quanto dos tratados com fungo, em três períodos distintos: 13, 117 e 185 dias após a adição das partículas. Uma alíquota de 0,35 g de solo, coletada em três pontos distintos de cada vaso, foi transferida para microtubo de 1,5 mL, ao qual se adicionou 1 mL de solução de Tween 80® a 0,02% (v/v). A amostra foi homogeneizada por agitação em vórtex e, posteriormente, uma alíquota de 50 µL foi inoculada em meio de cultura CTC contido em placas de Petri (90 × 15 mm), sendo o inóculo distribuído uniformemente por meio de alça de Drigalski (Fernandes *et al.*, 2010).

Para cada coleta utilizaram-se duas placas por vaso, as quais foram mantidas em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80% durante 21 dias, sendo monitoradas ao longo deste período. As placas provenientes dos vasos tratados com as micropartículas fúngicas foram avaliadas após três dias de incubação quanto as unidades formadoras de colônia (UFC). O

número de UFC foi expresso por grama de solo, com base na contagem das colônias fúngicas observadas em cada placa, considerando-se a análise de dez vasos.

Adicionalmente, com o objetivo de verificar a semelhança das características macroscópicas e microscópicas das colônias fúngicas reisoladas em relação ao fungo encapsulado (*M. anisopliae* s.l. CG 148), realizou-se, respectivamente, a semeadura em ponto e a técnica de microcultivo, conforme descrito anteriormente no tópico 3.12.1.

3.14 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 comparar as médias da produção de conídios das partículas fúngicas com ou sem quitina, foi empregada a análise T test seguida pelo unpaired t test. Para os dados de capacidade de encapsulamento, tempo de prateleira, tolerância à irradiação UV-B e termotolerância dos conídios formulados, assim como para os dados de recuperação de larvas de *R. microplus* obtidos no bioensaio em semi-campo, aplicou-se análise oneway ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Para as comparações da produção de conídios das partículas fúngicas (A e AQ, e APG e APGQ) e de termotolerância, os dados foram transformados antes das análises para atender às suposições de normalidade e homogeneidade de variância ($1/x$). No tempo de prateleira, os grupos cujos dados eram todos iguais a 0, foram transformados ($\sqrt{x+0,5}$).

No bioensaio conduzido em laboratório com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, os parâmetros biológicos foram analisados por meio do teste não paramétrico do teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A sobrevivência dos carrapatos foi avaliada pelo teste log-rank, adotando-se nível de significância de 0,05. Para as análises de reisolamento fúngico a partir das amostras de solo provenientes do bioensaio com *R. microplus* em condições de semi-campo, os dados também foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

4 RESULTADOS

4.1 Eficiência do Processo de Encapsulamento Fúngico

As suspensões fúngicas provenientes da dissolubilização das micropartículas A, AQ, AP, APQ, AG, AGQ, APG e APGQ foram quantificadas, sendo observada uma redução média de, respectivamente, $2,6\times$ ($p= 0,0149$); $2,0\times$ ($p= 0,0422$); $3,1\times$ ($p= 0,0025$); $2,6\times$ ($p= 0,0085$); $2,3\times$ ($p= 0,0165$); $2,3\times$ ($p= 0,0380$); $2,6\times$ ($p= 0,0013$) e $3,0\times$ ($p= 0,0029$) na concentração de conídios em relação a suspensão inicial com conídios não encapsulados (NEC), utilizada para a elaboração das micropartículas. Não foi observada diferença significativa na concentração de conídios encapsulados entre as diferentes composições de matriz de revestimento utilizadas (Figura 3).

Tanto a suspensão inicial de conídios empregada na preparação das micropartículas quanto a obtida após a solubilização destas, apresentaram média de germinação fúngica de conídios superior a 95%. Esses resultados indicam que o processo de encapsulamento por gelificação iônica, assim como a aplicação de alginato, pectina, quitina ou glicerol como matrizes encapsulantes, não comprometeram a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148.

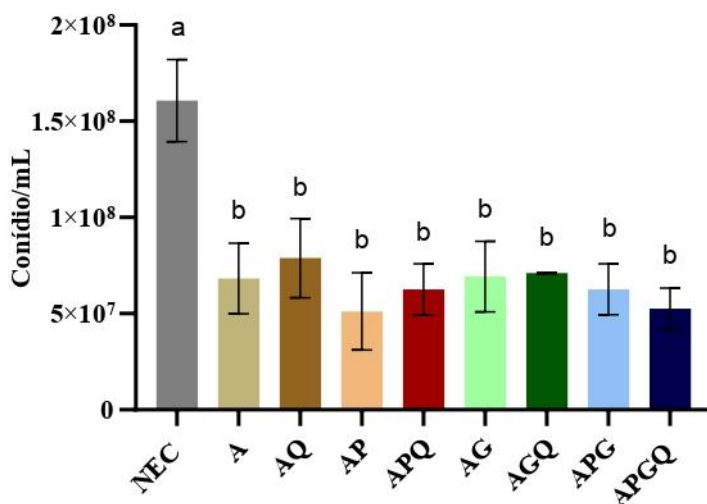


Figura 3: Média e erro padrão da concentração de conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio (A); alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina (AP); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol (AG); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); alginato de sódio + pectina + glicerol (APG) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). Barras com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

4.2 Avaliação da Interferência da Quitina na Produção de Conídios das Partículas Fúngicas

Os grupos A, AP, AG e APG apresentaram produção de conídios/mL igual a $2,06 \pm 0,25 \times 10^9$; $1,81 \pm 0,23 \times 10^9$; $2,48 \pm 0,27 \times 10^9$ e $1,86 \pm 0,35 \times 10^9$ por grama de micropartícula,

respectivamente. A produção de conídios/mL a cada grama das micropartículas fúngicas AQ, APQ, AGQ e APGQ apresentou aumento de 60,26% ($3,31 \pm 0,50 \times 10^9$; $p = 0,0441$); 84,77% ($3,35 \pm 0,42 \times 10^9$; $p = 0,0051$); 37,72% ($3,42 \pm 0,30 \times 10^9$; $p = 0,0320$) e 54,84% ($2,88 \pm 0,35 \times 10^9$; $p = 0,0215$), respectivamente, em comparação com as mesmas formulações sem quitina, A, AP, AQG e APG (Figura 4). Diante destes resultados, as formulações com quitina foram selecionadas para compor os grupos das análises seguintes.

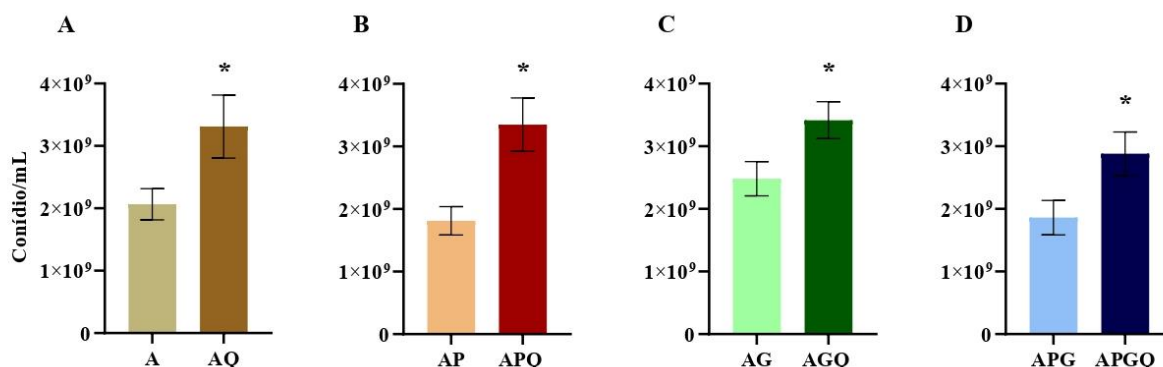


Figura 4: Média e erro padrão da produção de conídios/mL de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 esporulados a partir de um grama das micropartículas, contendo ou não quitina (Q). A- alginato de sódio (A) e alginato de sódio + quitina (AQ); B- alginato de sódio + pectina (AP); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); C- alginato de sódio + glicerol (AG); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); D- alginato de sódio + pectina + glicerol (APG) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). (*) indica diferença estatística significativa entre os grupos, $p \leq 0,05\%$.

4.3 Caracterização das Partículas Fúngicas

4.3.1 Análise da distribuição de tamanho

As micropartículas fúngicas AQ, APQ, AGQ e APGQ apresentaram uma distribuição da medida do diâmetro igual, respectivamente, a 1002 a 1673 μm , 1128 a 2049 μm , 800 a 1921 μm e 1070 a 1921 μm . O diâmetro médio das micropartículas foi igual a 1338 μm , 1459 μm , 1244 μm e 1367 μm para AQ, APQ, AGQ e APGQ, respectivamente (Figura 5).

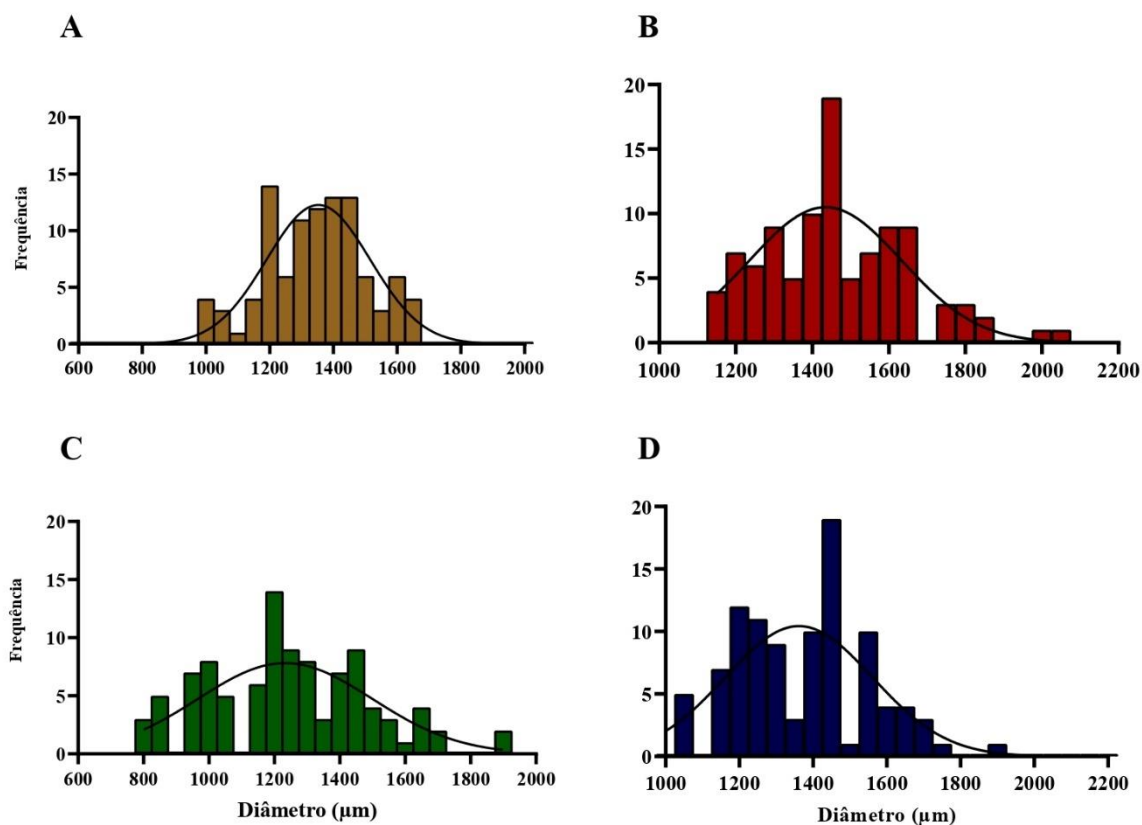


Figura 5: Distribuição de tamanho de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados. Micropartículas fúngicas de alginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D).

4.3.2 Análises morfológicas

Nas observações em microscópio estereoscópio, as micropartículas fúngicas apresentaram formato esférico com superfície mais irregular (AQ e AGQ) ou regular (APQ e APGQ) (Figura 6).

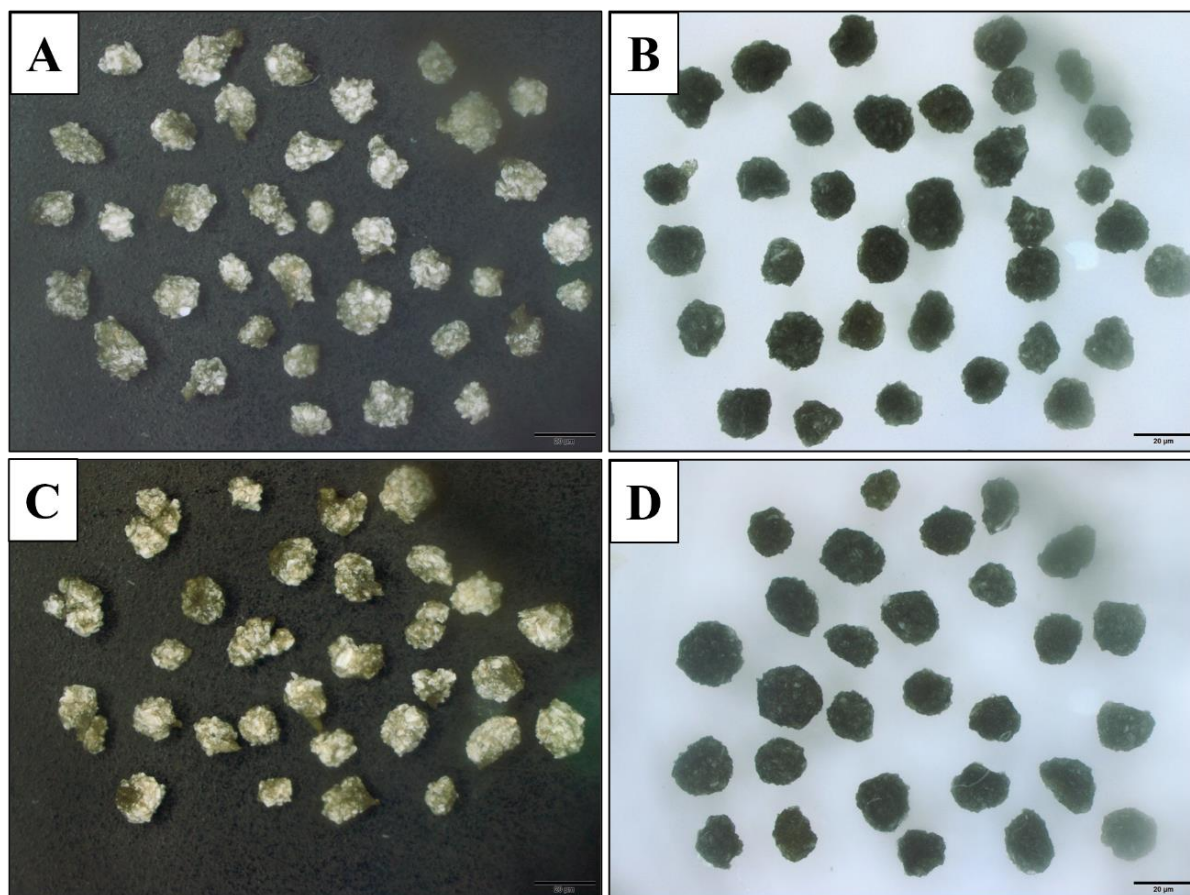


Figura 6: Micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados, visualizadas em microscópio estereoscópio. Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D).

Quanto à microscopia eletrônica de varredura, as micrografias mostraram que as micropartículas contendo conídios não germinados exibiram formato esférico e apresentaram cavidades em sua superfície (Figura 7). As micropartículas fúngicas AQ e AGQ (Figura 7-A e C) apresentaram superfície mais irregular e heterogênea, com maior porosidade quando comparadas com as micropartículas APQ e APGQ (Figura 7-B e D).

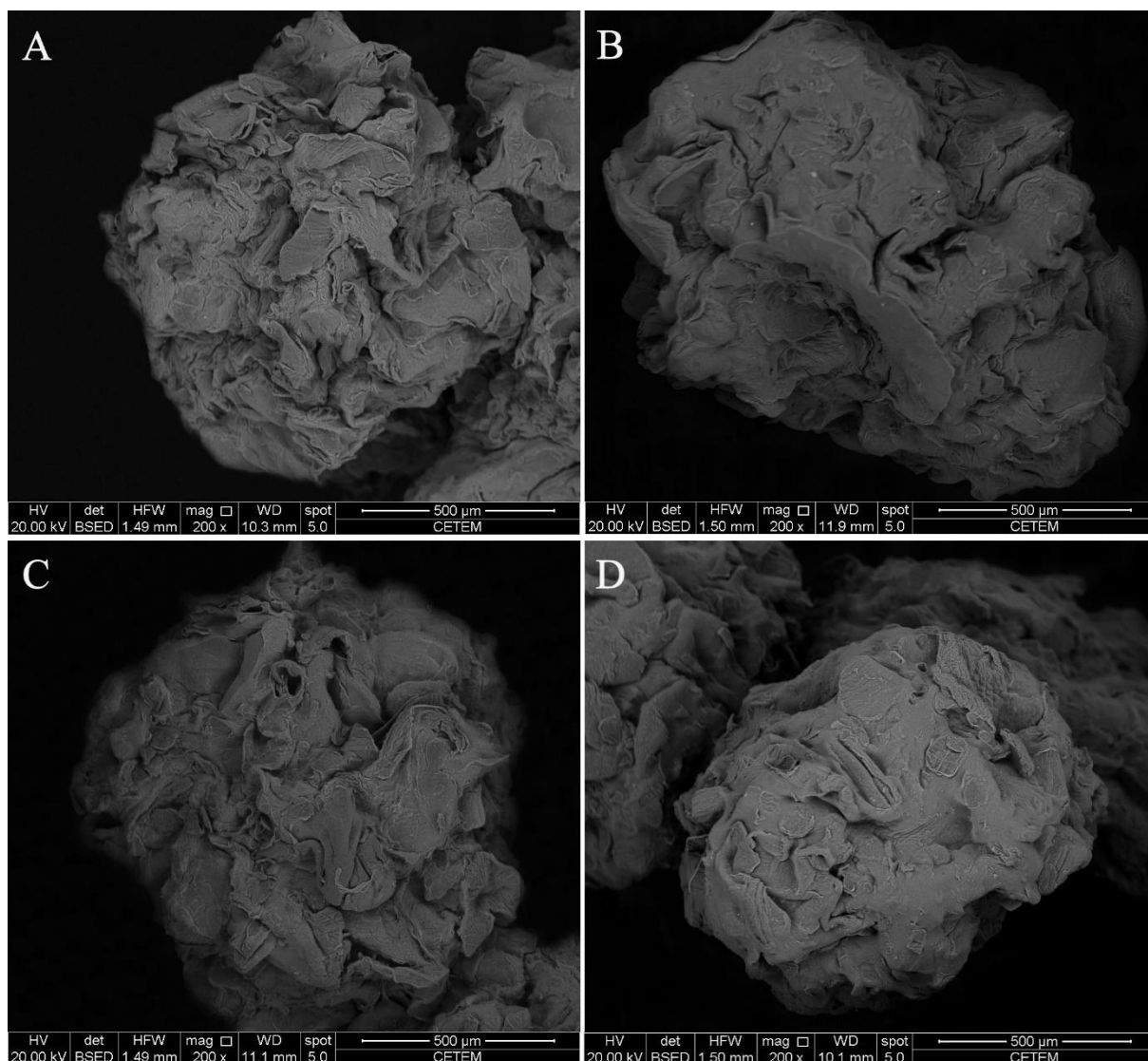


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados não germinados. Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ, A); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ, B); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ, C) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ, D).

As micropartículas contendo conídios encapsulados germinados mantiveram o formato esférico com cavidades na superfície (Figura 8-A, C, E e G). Também foi possível observar a maior irregularidade da superfície das micropartículas AQ e AGQ (Figura 8-A e E) quando comparadas com as micropartículas APQ e APGQ (Figura 8-C e G) que apresentaram superfície com menor porosidade. Após a estimulação do processo de germinação dos conídios encapsulados, muitas hifas foram observadas através das imagens (Figura 8).

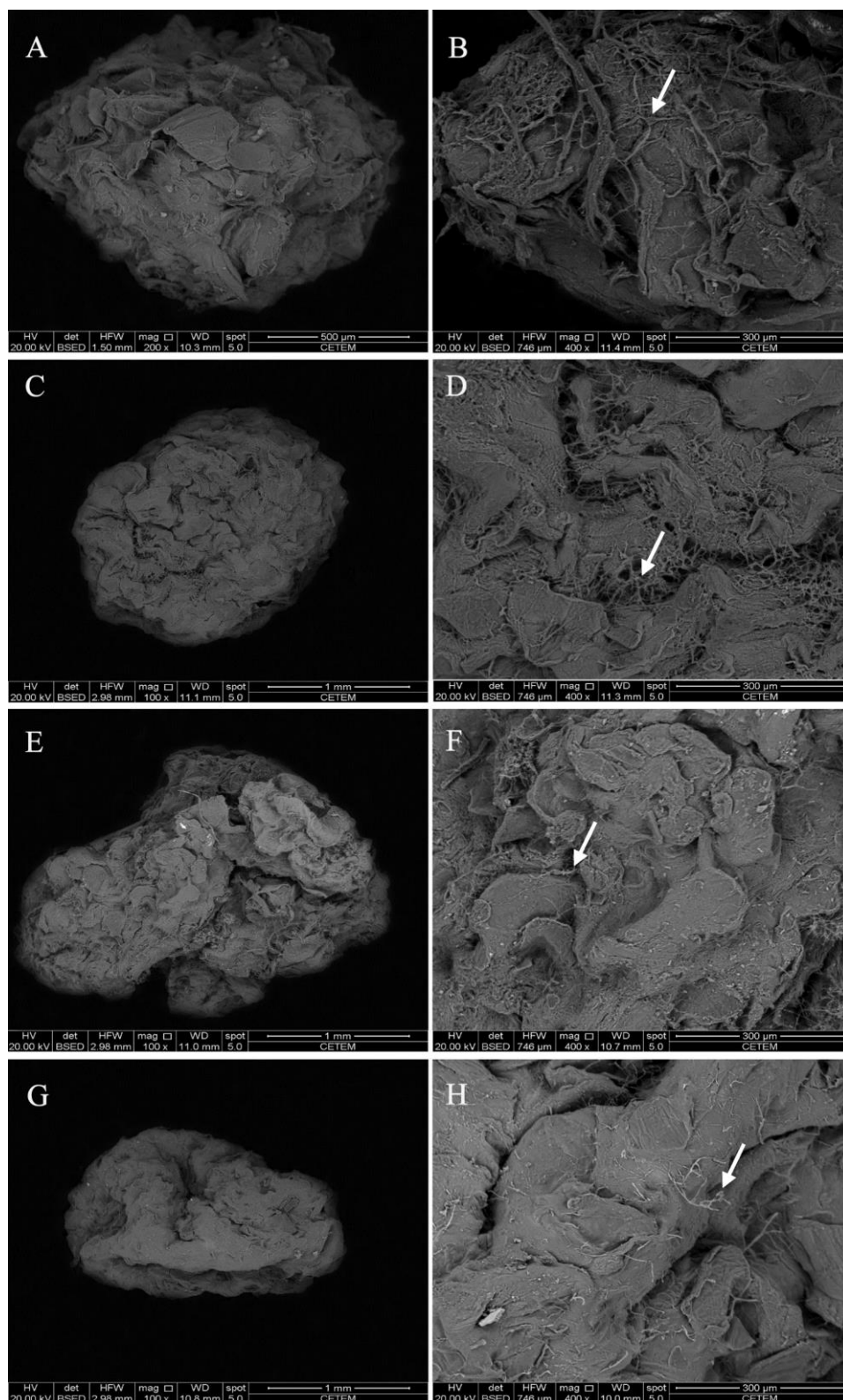


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados germinados. Micropartículas fúngicas Micropartículas fúngicas alginato de sódio + quitina (AQ; A e B); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ; C e D); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ; E e F) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ; G e H). Hifas sinalizadas pelas setas brancas.

4.3.3 Análise por espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As bandas e os modos de vibração de cada componente independente (A, P, G, Q e Ma) são brevemente descritos a seguir. O alginato de sódio apresentou bandas características em diferentes regiões do espectro: em 3338 e 3226 cm^{-1} , atribuídas à vibração do grupo -OH; em 2927 cm^{-1} , correspondente a $\nu(\text{C-H})$; em 1594 e 1405 cm^{-1} , referentes, respectivamente, aos estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ dos grupos carboxilato; em 1297 cm^{-1} , associada ao $\nu(\text{C-O})$ do sacarídeo; em 1155 cm^{-1} , atribuída à oscilação C-O; em 1110 cm^{-1} , relacionada ao $\nu(\text{C-O})$ das unidades manurônicas do sacarídeo; em 1054 cm^{-1} , correspondente ao $\nu(\text{C-O})$; em 1026 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{C-O-C})$ do sacarídeo e $\nu(\text{C-O-C})$ das unidades gulturônicas; em 948 cm^{-1} , relacionada a $\delta(\text{OH})$; em 883 cm^{-1} , associada a $\delta(\text{C-H})$; em 813 cm^{-1} , atribuída à vibração $\nu(\text{C-O})$ característica da configuração das unidades gulturônicas do sacarídeo; e em 754 cm^{-1} , correspondente à vibração de respiração do anel nos fragmentos da cadeia manurônico-manurônica (Figura 9).

A pectina apresentou bandas características em diferentes regiões do espectro: em 3305 cm^{-1} , atribuídas ao $\nu(\text{OH})$ associado a ligações de hidrogênio intramoleculares; em 2929 cm^{-1} , correspondentes ao $\nu(\text{CH}_x)$; em 1735 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento C=O de grupos metil-éster (COOCH_3) e de ácido carboxílico não dissociado (COOH); em 1604 cm^{-1} , atribuída ao $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ do ácido poligalacturônico; em 1421 e 1404 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$; em 1336 cm^{-1} , associada ao grupo COO^- ; em 1328 cm^{-1} , relacionada às vibrações de estiramento do anel; em 1230 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{C-O})$; em 1143 cm^{-1} , correspondente ao $\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$; em 1095 cm^{-1} , associada ao $\nu(\text{C-O})$; em 1074 cm^{-1} , relacionada a $\delta(\text{-OH})$; em 1033 cm^{-1} , atribuída à presença de frutose; em 1012 cm^{-1} , relacionada aos estiramentos $\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-C}, \text{C2-C3}, \text{C2-O2} \text{ e } \text{C1-O1})$; entre 900 e 1200 cm^{-1} , associadas ao estiramento das ligações glicosídicas da estrutura da pectina; em 954 cm^{-1} atribuídas a $\delta(\text{CO})$; em 918 cm^{-1} , referente a $\delta_{\text{fora-do-plano}}(\text{-OH})$; em 889 cm^{-1} , correspondente ao $\nu(\text{C-O})$ do anel de xiloglucano; em 885 cm^{-1} , associada a álcoois secundários (-CH-OH em estruturas cíclicas, $\nu(\text{C-O})$); em 831 cm^{-1} , relacionadas a $\delta_{\text{fora-do-plano}}(\text{-CH})$; e em 757 e 624 cm^{-1} , atribuídas às vibrações do grupo (-C=C-H) (Figura 9).

O glicerol apresentou bandas em: em 3272 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{O-H})$; em 2927 e 2879 cm^{-1} , relacionadas ao $\nu(\text{C-H})$; em 1643 cm^{-1} , associada ao $\nu(\text{C=O})$; em 1411 cm^{-1} , referente à deformação $\delta(\text{C-O-H})$ de grupos carboxila e ao estiramento $\nu(\text{C-O})$ de álcoois primários; em 1323 cm^{-1} , atribuída a $\rho(\text{C-O-H})$; em 1207 cm^{-1} , relacionada a grupos ésteres; em 1108 e 1029 cm^{-1} , correspondentes ao $\nu(\text{C-O})$ [5]; e em 993, 921 e 850 cm^{-1} , referentes às vibrações esqueléticas da ligação C-C (Figura 9).

A quitina apresentou bandas características em diferentes regiões do espectro: em 3423 cm^{-1} , atribuídas às vibrações dos grupos N-H e O-H; em 3253 cm^{-1} , correspondentes ao $\nu(\text{N-H})$ de amina secundária; em 3100 cm^{-1} , relacionado à vibração do grupo NH-CO; em 2935, 2933 e 2875 cm^{-1} , atribuídas aos grupos metileno e metil, associados ao estiramento C-H de carbonos hibridizados sp^3 , típicos de compostos alifáticos; em 1629 e 1620 cm^{-1} , referentes ao $\nu(\text{C=O})$ da amida I; em 1552 cm^{-1} , relacionado à deformação $\delta(\text{N-H})$ e ao estiramento $\nu(\text{C-N})$ da amida II; em 1413 cm^{-1} , atribuída a $\delta(\text{C-H})$ de grupos CH_2 ; em 1375 cm^{-1} , associada a $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$; em 1309 cm^{-1} , correspondente ao modo vibracional no plano do grupo CONH da amida III; em 1259 cm^{-1} , relacionada ao estiramento $\nu(\text{C-N})$ e a deformação $\delta(\text{N-H})$ da amida III; em 1201 cm^{-1} , atribuída a amida III; em 1187 cm^{-1} , correspondente ao $\nu(\text{N-H})$; em 1153 cm^{-1} , associada ao $\nu(\text{C-O})$; em 1130 cm^{-1} , relacionada à estrutura do polissacarídeo; em 1085 cm^{-1} , atribuída ao $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$; em 1068 cm^{-1} , correspondente a C-O-C; em 1010 cm^{-1} , referente a C-O; em 952 cm^{-1} , associada a $\omega(\text{CH}_3)$; em 902 cm^{-1} , relacionada à deformação $\delta(\text{CH})$ da ligação β -glicosídica; e em 894 cm^{-1} , atribuída à vibração C-H em anéis de sacarídeos (Figura 9).

O conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148 apresentaram bandas características em diferentes regiões do espectro: em 3355 e 3274 cm^{-1} , atribuídas à presença de dímero OH; em 2939 cm^{-1} , relacionadas ao $\nu(\text{C-H})$; em 2927 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{N-H})$ de aminas; em 2854 cm^{-1} , referente ao $\nu(\text{O-H})$; em 1635 cm^{-1} , relacionada ao $\nu(\text{C=O})$; em 1546 cm^{-1} , atribuída à $\delta(\text{N-H})$ de amina primária; em 1452 cm^{-1} , associada às vibrações C=C de compostos aromáticos; em 1378 cm^{-1} , relacionada às vibrações C=C de alceno; em 1232 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C-O})$ de éteres; e em 1035 cm^{-1} , associada à vibração do grupo carboxila (COO-H) (Figura 9).

Os resultados indicaram que as amostras de AQ apresentaram predominantemente bandas características do alginato de sódio, além de algumas bandas atribuídas à quitina (1373, 1257, 1182 e 1130 cm^{-1}). A incorporação do fungo foi evidenciada pela presença da banda em $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento $\nu(\text{N-H})$ de aminas. Com a adição do fungo, observou-se um deslocamento da banda em 1593 cm^{-1} e o surgimento de bandas intensas em 1417 e 1026 cm^{-1} nas amostras AQ/Ma, conforme indicado pelas setas (Figura 9-A).

Na amostra APQ, a presença de pectina foi identificada pelas bandas em 1735, 1240 e 1093 cm^{-1} . A incorporação do fungo na amostra APQ/Ma foi evidenciada pela banda em aproximadamente 2937 cm^{-1} . Pequenos deslocamentos de banda foram observados ao comparar as posições das bandas dessa amostra com as dos componentes isolados, o que pode ser atribuído à sobreposição de bandas (Figura 9-B).

As amostras de AGQ apresentaram predominantemente bandas características do alginato de sódio, além de bandas sobrepostas correspondentes aos diferentes componentes da formulação, bem como bandas atribuídas à quitina ($\sim 1370 \text{ cm}^{-1}$) e ao glicerol ($\sim 2933 \text{ cm}^{-1}$). Com a adição do fungo, observou-se um deslocamento da banda em 1596 cm^{-1} e o surgimento de uma banda intensa em 1417 cm^{-1} , conforme indicado pelas setas. Adicionalmente, verificou-se uma tendência na amostra AGQ/Ma na região de $\sim 2930 \text{ cm}^{-1}$, em que o perfil espectral acompanha o observado para o fungo (Figura 9-C).

A amostra APGQ/Ma apresentou bandas características de todos os componentes, como, por exemplo, a banda da pectina em 1740 cm^{-1} . No entanto, considerando que diversas bandas podem ser atribuídas a mais de um constituinte, como a banda em $\sim 2927 \text{ cm}^{-1}$, observada tanto no fungo quanto no glicerol, a sobreposição espectral pode refletir tanto interações entre os componentes quanto a contribuição individual (Figura 9-D).

A presença de novas bandas, bem como a sobreposição e os deslocamentos observados nos espectros das amostras AQ/Ma, APQ/Ma, AGQ/Ma e APGQ/Ma, correspondentes às micropartículas fúngicas, podem ser atribuídos a interações físicas entre a matriz polimérica e o fungo encapsulado.

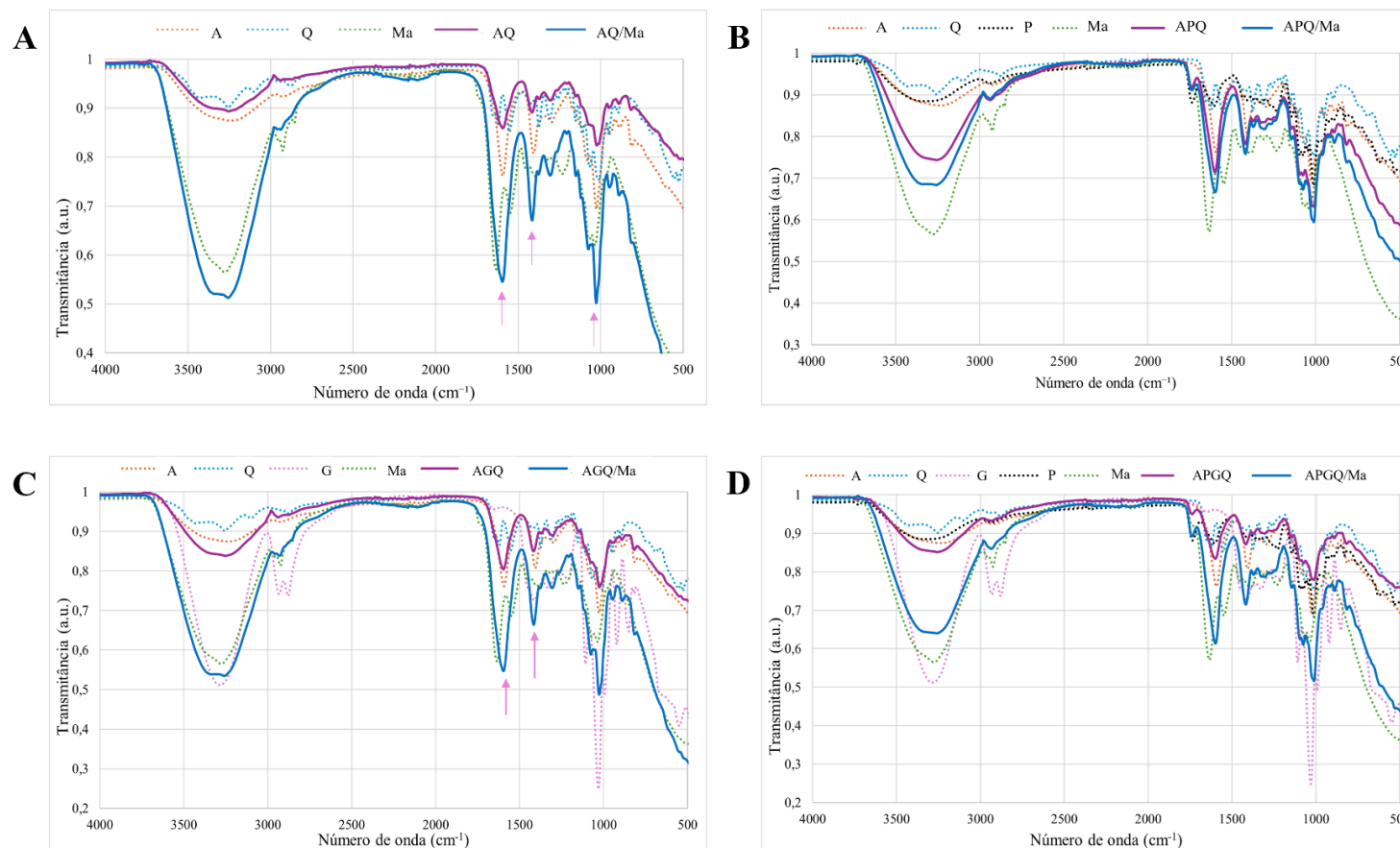


Figura 9: Espectros de FTIR das matrizes poliméricas isoladas e de suas respectivas formulações contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148. A- micropartículas de alginato de sódio + quitina sem fungo (AQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + quitina (AQ/Ma); B- micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (APQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + quitina (APQ/Ma); C- micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (AGQ); micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ/Ma); D- micropartículas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina sem fungo (APGQ); micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ/Ma). Alginato de sódio (A); pectina (P); glicerol (G); quitina (Q) e conídios fúngicos (Ma). As setas indicam alterações nas bandas, sugerindo interações físicas entre a matriz polimérica e o fungo.

4.4 Avaliação do Tempo de Prateleira das Micropartículas Fúngicas

Os valores médios de temperatura monitoradas durante o armazenamento em ambiente e sob refrigeração, foram 24,8 e 5,0 °C, respectivamente. No ambiente a temperatura mínima atingiu 22,5 °C, enquanto a máxima chegou a 28,8 °C. Já no armazenamento sob refrigeração, a temperatura mínima e máxima atingiram -0,9 e 8,8 °C, respectivamente.

Em temperatura ambiente (Figura 10-A), os conídios NEC mantiveram percentuais de germinação próximos a 100%, apresentaram viabilidade significativamente superior à dos conídios encapsulados ao longo dos dois meses de armazenamento. Após um mês de armazenamento, os conídios AQ, APQ, AGQ e APGQ apresentaram redução significativa da germinação, com valores iguais a $59,44 \pm 4,94\%$; $2,44 \pm 0,62\%$; $18,56 \pm 1,28\%$ e $3,00 \pm 0,69\%$, respectivamente. Ainda, foi observada uma maior eficiência do encapsulamento com AQ na manutenção da viabilidade fúngica após o mesmo período de estocagem. No 2º mês de armazenamento, os conídios APQ não apresentaram germinação, enquanto aqueles dos demais grupos encapsulados exibiram percentuais inferiores a 1%, evidenciando acentuada perda da viabilidade (Figura 10-A).

Já em condições de armazenamento sob refrigeração (Figura 10-B), os conídios NEC tiveram a viabilidade preservada durante os 2 meses de avaliação, exibindo percentuais de germinação significativamente superiores aos dos conídios encapsulados, os quais, ainda assim, exibiram valores acima de 80%. No 1º mês de armazenamento, os conídios dos grupos APQ e AGQ mantiveram-se viáveis, enquanto os grupos AQ e APGQ apresentaram redução significativa da germinação. No 1º mês, apenas o grupo APQ apresentou diminuição dos percentuais de germinação em relação ao mês anterior, ao passo que os demais grupos (AQ, AGQ e APGQ) mantiveram valores semelhantes (Figura 10-B).

De modo geral, os NEC mantiveram-se viáveis em ambas as condições de armazenamento ao longo de todo o período avaliado. Em contraste, a conservação em temperatura ambiente mostrou-se inadequada para a preservação da viabilidade dos conídios encapsulados. Por sua vez, o armazenamento em geladeira, sob refrigeração, foi mais eficaz na manutenção da viabilidade dos conídios encapsulados nas diferentes combinações poliméricas, resultando em aumento significativo da germinação fúngica quando comparado à estocagem em temperatura ambiente (Figura 10).

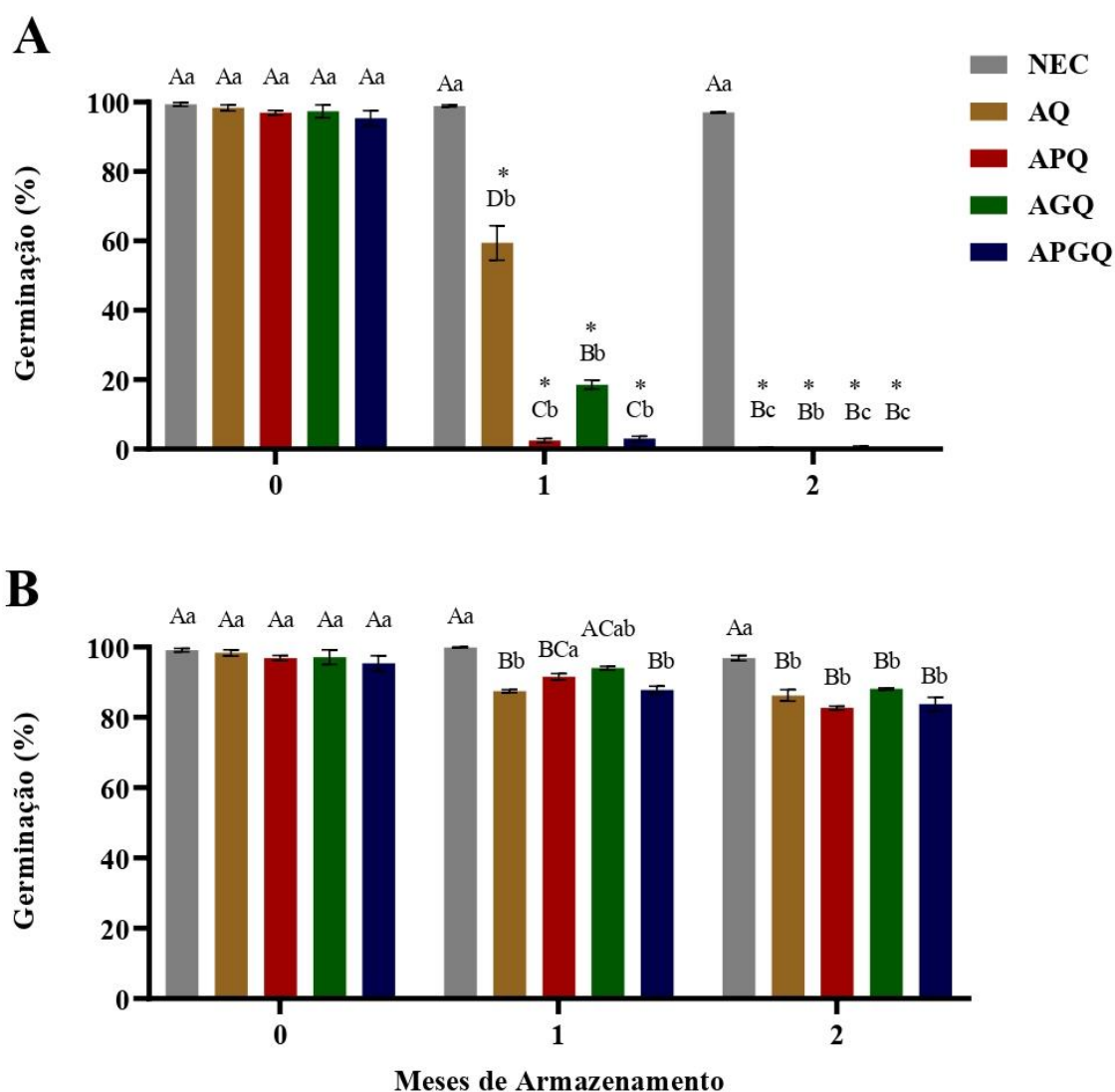


Figura 10: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após armazenamento em temperatura ambiente (A) e sob refrigeração (B) por um período de dois meses. Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos expostos ao mesmo período de armazenamento, e barras com a mesma letra minúscula dos mesmos grupos expostos a diferentes períodos de armazenamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$). (*) em A indica uma diferença estatística ($p < 0,0001$) na germinação de conídios do mesmo grupo em relação a B, considerando as diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) para o mesmo período.

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

A aplicação de radiação UV-B ($6,0 \text{ kJ m}^{-2}$) comprometeu a viabilidade dos conídios não encapsulados (NEC) do isolado de *M. anisopliae* s.l. CG148 ($59,08 \pm 6,33\%$; $p < 0,0001$), quando comparado aos conídios encapsulados AQ ($98,59 \pm 0,66\%$; $p < 0,0001$), APQ ($95,48 \pm 1,10\%$; $p < 0,0001$), AGQ ($94,37 \pm 1,26\%$; $p < 0,0001$) e AGQ ($97,95 \pm 0,25\%$; $p < 0,0001$), que

mantiveram índices de germinação superiores a 90%. Não foram observadas diferenças na viabilidade entre os conídios formulados com diferentes componentes da matriz encapsulante (Figura 11).

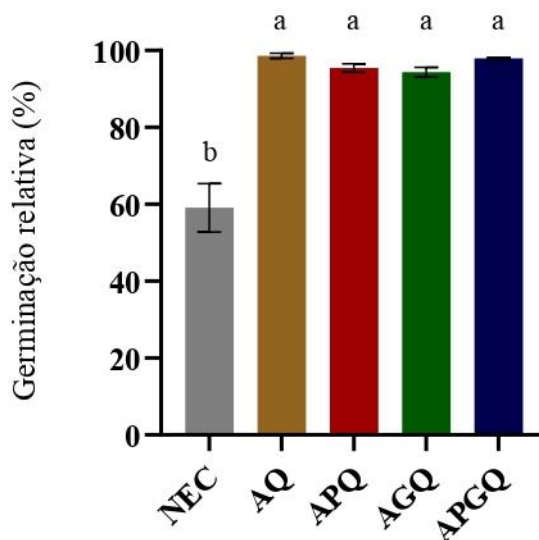


Figura 11: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ) alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após exposição à UV-B (6.0 kJ m⁻²). Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

4.6 Avaliação da Termotolerância dos Conídios Fúngicos Encapsulados

Após exposição à 45 °C por 4 horas, os conídios do isolado de *M. anisopliae* CG148 encapsulados, AQ (71,74 ± 11,87%; $p < 0,0001$), APQ (93,87 ± 2,59%; $p < 0,0001$), AGQ (68,18 ± 6,42%; $p < 0,0001$) e APGQ (77,75 ± 1,73%; $p < 0,0001$), apresentaram médias de germinação superiores aos conídios não encapsulados NEC (0,19 ± 0,11%). Entre os grupos de conídios formulados com diferentes componentes da matriz encapsulante, não foram observadas diferenças significativas na germinação dos conídios (Figura 12).

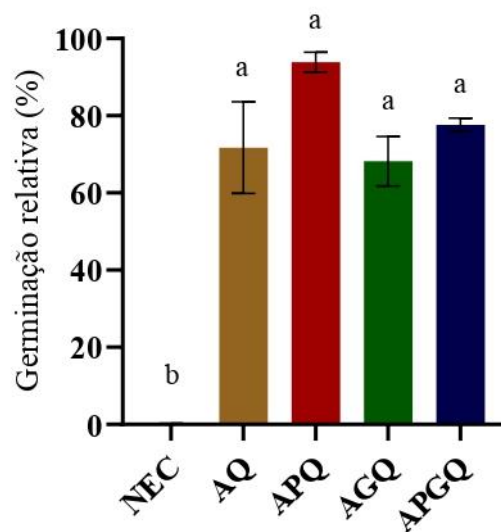


Figura 12: Média e erro padrão da germinação relativa de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 não encapsulados (NEC) ou encapsulados com alginato de sódio + quitina (AQ); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ) após exposição à 45 °C por 4 horas. Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

4.7 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em Condições de Laboratório

As curvas de sobrevivência dos carrapatos tratados com as micropartículas sem fungo foram semelhantes à do grupo CTR TWEEN e ambas maiores que as dos grupos tratados com as respectivas micropartículas fúngicas com conídios encapsulados (Figura 13; Tabela 1). A maior taxa de mortalidade (100%) foi registrada com 13 dias nos grupos expostos às micropartículas fúngicas AQ e à suspensão fúngica NEC (Figura 13). Este grupo apresentou sobrevivência menor que o grupo CTR TWEEN, maior que os tratados com micropartículas fúngicas AQ e APQ e semelhante aos grupos das micropartículas fúngicas AGQ e APGQ. Todos os grupos expostos às micropartículas fúngicas apresentaram sobrevivência menor em relação ao grupo CTR TWEEN (Figura 13; Tabela 1). O tempo de sobrevivência médio (S_{50}) das fêmeas do grupo NEC foi de 13 dias, maior em relação ao S_{50} das fêmeas dos grupos AQ, APQ, AGQ e APGQ, iguais respectivamente a 11, 7, 8 e 10 dias (Tabela 1).

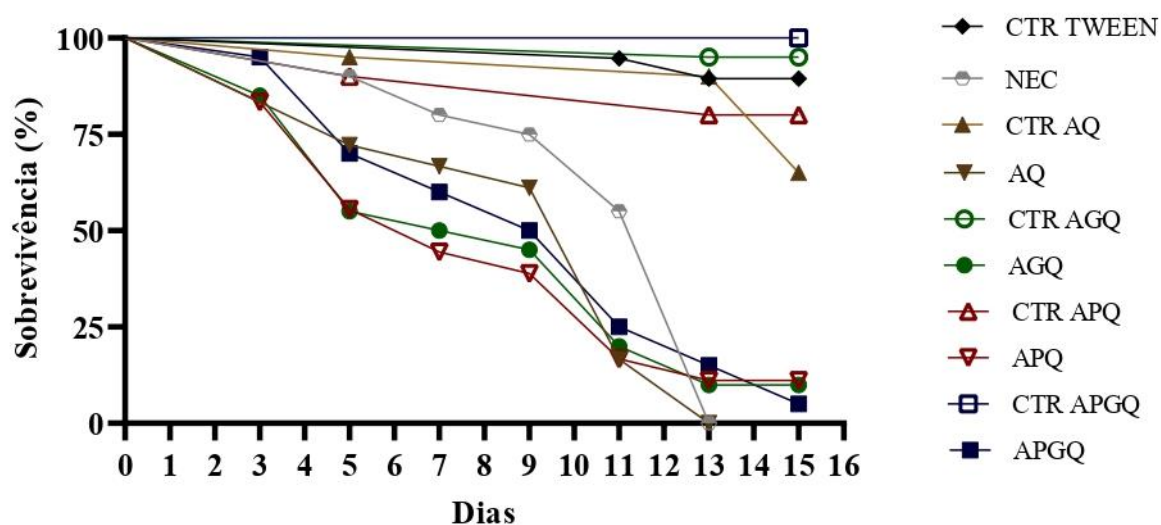


Figura 13: Curva de sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não em condições de laboratório. Controle aquoso Tween 80® (CTR TWEEN); suspensão fúngica com conídios não encapsulados (NEC); micropartículas de alginato de sódio + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AQ / AQ; CTR); micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ); micropartículas de alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APGQ / APGQ).

Tabela 1: Sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não, em condições de laboratório. Comparação entre os pares de grupos e tempo de sobrevivência médio (S50).

GRUPOS	NEC	CTR AQ	AQ	CTR APQ	APQ	CTR AGQ	AGQ	CTR APGQ	APGQ	S ₅₀ (Dias)
CTR TWEEN	$\chi^2=28,95$ $P<0,0001$	$\chi^2=2,733$ $P=0,0983$	$\chi^2=33,78$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,6761$ $P=0,4109$	$\chi^2=27,02$ $P<0,0001$	$\chi^2=2,163$ $P=0,1413$	$\chi^2=27,82$ $P<0,0001$	$\chi^2=2,163$ $P=0,1413$	$\chi^2=31,26$ $P<0,0001$	ND
NEC	-	$\chi^2=29,21$ $P<0,0001$	$\chi^2=4,741$ $P=0,0294$	$\chi^2=22,22$ $P<0,0001$	$\chi^2=3,949$ $P=0,0469$	$\chi^2=35,15$ $P<0,0001$	$\chi^2=3,218$ $P=0,0728$	$\chi^2=37,92$ $P<0,0001$	$\chi^2=1,081$ $P=0,2985$	13
CTR AQ	-	-	$\chi^2=33,95$ $P<0,0001$	$\chi^2=68,51$ $P=0,4078$	$\chi^2=21,70$ $P<0,0001$	$\chi^2=5,181$ $P=0,0228$	$\chi^2=23,02$ $P<0,0001$	$\chi^2=8,241$ $P=0,0041$	$\chi^2=24,97$ $P<0,0001$	ND
AQ	-	-	-	$\chi^2=26,59$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,2790$ $P=0,5974$	$\chi^2=39,13$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,0573$ $P=0,8108$	$\chi^2=41,03$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,2012$ $P=0,6538$	11
CTR APQ	-	-	-	-	$\chi^2=21,30$ $P<0,0001$	$\chi^2=2,087$ $P=0,1486$	$\chi^2=22,23$ $P<0,0001$	$\chi^2=4,333$ $P=0,0374$	$\chi^2=24,35$ $P<0,0001$	ND
APQ	-	-	-	-	-	$\chi^2=31,28$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,0365$ $P=0,8483$	$\chi^2=33,11$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,2325$ $P=0,6297$	7
CTR AGQ	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=32,34$ $P<0,0001$	$\chi^2=1$ $P=0,3173$	$\chi^2=36,50$ $P<0,0001$	ND
AGQ	-	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=34,38$ $P<0,0001$	$\chi^2=0,1010$ $P=0,7507$	8
CTR APGQ	-	-	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=39,22$ $P<0,0001$	ND
APGQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10

Controle aquoso Tween 80® (CTR TWEEN); suspensão fúngica com conídios não encapsulados (NEC); micropartículas de alginato + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AQ / AQ; CTR); micropartículas de alginato + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ); micropartículas de alginato + pectina + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APGQ / APGQ). Valor de $P < 0,05\%$ indica diferença estatística significativa entre os grupos comparados pelo teste long-rank. ND= não determinado e χ^2 = valor de qui-quadrado.

No que se refere aos parâmetros de peso da massa de ovos e índice de produção de ovos (IPO), os grupos controles tratados com Tween 80 e micropartículas sem fungo apresentaram resultados semelhantes entre si, mas diferentes dos grupos que receberam tratamento fúngico. Mesmo não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com o fungo, encapsulado ou não, as fêmeas tratadas com as micropartículas fúngicas apresentaram menor peso da massa de ovos e IPO em relação as expostas a suspensão fúngica (Tabela 2). Dessa forma, as formulações testadas na encapsulação dos conídios não impactaram a virulência do isolado.

Os tratamentos com as micropartículas fúngicas AQ, APQ, AGQ e APGQ reduziram, em média, 66,9% ($p < 0,0001$), 41,8% ($p = 0,0034$), 64,6% ($p < 0,0001$) e 54,3% ($p = 0,0003$) a quantidade de postura das fêmeas em relação aos tratamentos com as respectivas micropartículas controles sem fungo CTR AQ, CTR APQ, CTR AGQ e CTR APGQ. As fêmeas tratadas com as micropartículas fúngicas AQ ($20,20 \pm 4,74\%$; $p < 0,0001$), APQ ($22,01 \pm 4,33\%$; $p = 0,0047$), AGQ ($21,33 \pm 5,22\%$; $p = 0,0002$) e APGQ ($26,10 \pm 4,6\%$; $p = 0,0004$) produziram menor IPO quando comparadas com as fêmeas dos grupos que receberam as respectivas partículas sem fungo CTR AQ ($57,28 \pm 3,79\%$), CTR APQ ($51,85 \pm 4,41\%$), CTR AGQ ($59,10 \pm 1,33\%$) e CTR APGQ ($58,00 \pm 2,66\%$). Nenhuma diferença foi observada no IN das fêmeas de todos os grupos avaliados (Tabela 2).

Quanto ao percentual de eclosão das larvas, houve redução deste parâmetro nos grupos que receberam tratamento com as micropartículas fúngicas AGQ ($56,91 \pm 9,39$; $p = 0,0027$) e APGQ ($59,80 \pm 7,16$; $p = 0,0028$) em relação as respectivas partículas sem fungo CTR AGQ ($93,10 \pm 3,71\%$) e CTR APGQ ($92,60 \pm 2,24\%$). Os grupos tratados com as micropartículas fúngicas AQ (50,84%), AGQ (54,63%) e APGQ (62,42%) apresentaram percentual de controle superior ao do grupo tratado com a suspensão fúngica NEC (49,74%). O percentual de controle do grupo APQ foi igual a 40,71% (Tabela 2).

Nos grupos onde foram aplicados conídios encapsulados com APQ, AGQ e APGQ, foi possível observar fêmeas mortas e colonizadas com o fungo a partir de 3 dias após o início do experimento, enquanto no grupo formulado com AQ a morte das fêmeas foi observada após 5 dias de tratamento (Figura 14).

Tabela 2: Mediana e erro padrão dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição aos conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados ou não.

GRUPOS	Peso Inicial das Fêmeas (g)	Peso da Massa de Ovos (g)	Eclosão das Larvas (%)	IPO (%)	IN (%)	% CONTROLE
CTR TWEEN	0,2584 a ± 0,0056	0,1550 a ± 0,0054	88,00 abcde ± 3,32	60,09 a ± 1,72	87,87 a ± 4,06	-
NEC	0,2593 a ± 0,0053	0,0908 bc ± 0,0138	65,06 abce ± 7,25	34,86 bc ± 5,34	71,77 a ± 9,05	49,74
CTR AQ	0,2599 a ± 0,0054	0,1492 a ± 0,0097	84,84 abcde ± 4,89	57,28 a ± 3,79	79,45 a ± 4,99	-
AQ	0,2589 a ± 0,0060	0,0494 c ± 0,0114	74,91 abcde ± 7,35	20,20 c ± 4,74	68,60 a ± 17,50	50,84
CTR APQ	0,2593 a ± 0,0055	0,1325 ab ± 0,0108	92,61 a ± 3,87	51,85 ab ± 4,41	71,26 a ± 6,09	-
APQ	0,2584 a ± 0,0057	0,0552 c ± 0,0132	79,40 abce ± 8,15	22,01 c ± 4,33	49,53 a ± 10,91	40,71
CTR AGQ	0,2586 a ± 0,0054	0,1528 a ± 0,0004	93,10 ad ± 3,71	59,10 a ± 1,33	79,06 a ± 1,63	-
AGQ	0,2531 a ± 0,0076	0,0541 c ± 0,0131	56,91 ce ± 9,39	21,33 c ± 5,22	66,63 a ± 16,53	54,63
CTR APGQ	0,2592 a ± 0,0056	0,1486 a ± 0,0006	92,60 ab ± 2,24	58,00 a ± 2,66	87,36 a ± 5,46	-
APGQ	0,2586 a ± 0,0052	0,0679 c ± 0,0119	59,80 e ± 7,16	26,10 c ± 4,61	81,40 a ± 13,29	62,42

Controle aquoso Tween 80[®] (CTR TWEEN); suspensão fúngica com conídios não encapsulados (NEC); micropartículas de alginato + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AQ / AQ; CTR); micropartículas de alginato + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ); micropartículas de alginato + pectina + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APGQ / APGQ). Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). IPO: Índice de Produção de Ovos; IN: Índice Nutricional.

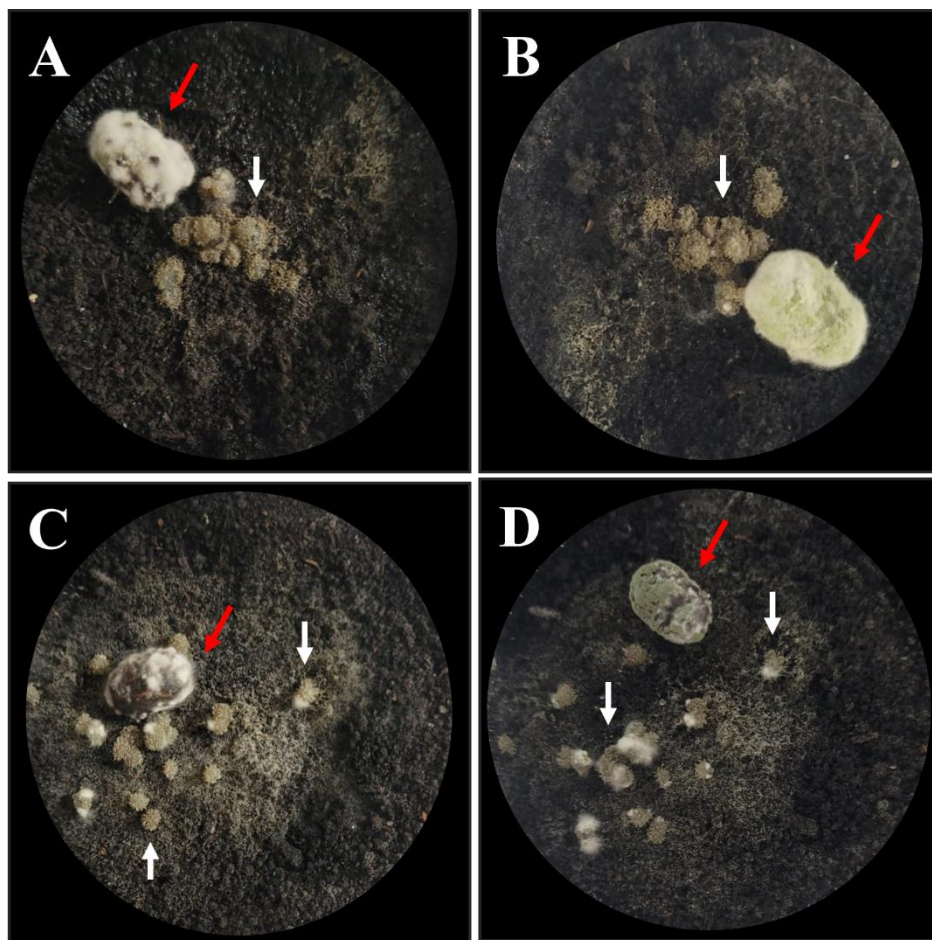


Figura 14: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* após exposição ao solo tratado com micropartículas fúngicas de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 contendo diferentes polímeros, em condições de laboratório. A. alginato de sódio + quitina (AQ); B. alginato de sódio + pectina + quitina (APQ); C. alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ); D. alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ). As setas brancas apontam as micropartículas fúngicas e as setas vermelhas apontam as fêmeas mortas e com fungo esporulado na superfície da cutícula.

4.7.1 Reisolamento fúngico das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Em relação ao reisolamento fúngico a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* provenientes do ensaio conduzido em laboratório, observou-se que as colônias apresentaram aspecto pulverulento e coloração verde-escura. Essas características macroscópicas foram semelhantes às do isolado *M. anisopliae* s.l. CG 148 utilizado na elaboração das micropartículas (Figura 15- A, B C D e E). As imagens microscópicas das colônias fúngicas reisoladas mostraram hifas septadas, conídios com o formato cilíndrico e conidióforos característicos de *Metarhizium* spp., em todos os grupos tratados com fungo, encapsulado ou não (Figura 15- F, G, H, I e J).

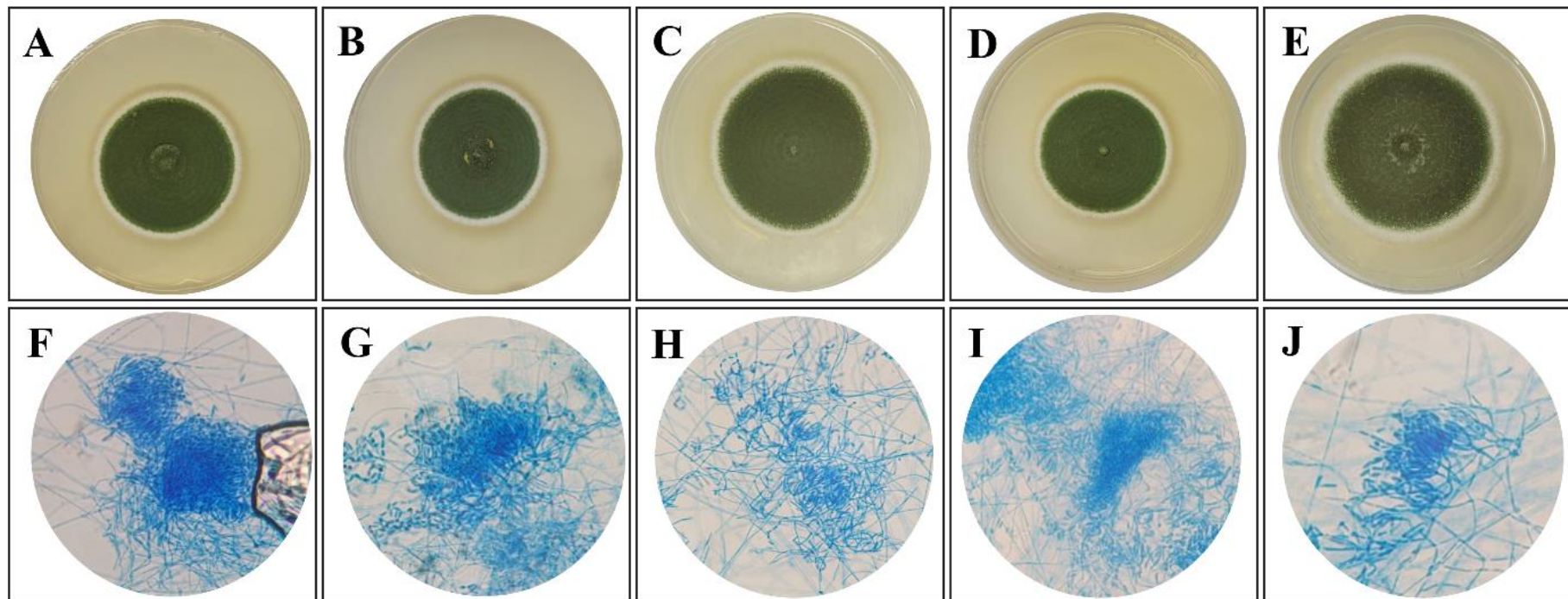


Figura 15: Aspectos macroscópicos (A-E) e microscópicos (F-J) de colônias de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 reisolados de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o isolado fúngico encapsulado ou não. Suspensão fúngica (A e F). Micropartículas fúngicas de alginato de sódio + quitina (AQ; B e G); alginato de sódio + pectina + quitina (APQ; C e H); alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ; D e I) e alginato de sódio + pectina + glicerol + quitina (APGQ; E e J). Ampliação de 400× (F-J).

4.8 Avaliação da Eficácia das Micropartículas Fúngicas sobre Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em Condições de Semi-campo

Após 23 dias da introdução das fêmeas ingurgitadas nos vasos cultivados com *U. decumbens*, foram observadas fêmeas vivas e realizando postura nos grupos sem tratamento (CTR) (Figura 16-A) e naqueles tratados com micropartículas sem fungo (CTR APQ e CTR AGQ) (Figura 16-B e C). Observou-se a ocorrência de fêmeas mortas nos grupos tratados. No grupo APQ, foi registrada a presença de fêmea morta próxima à massa de ovos (Figura 16-D), enquanto no grupo AGQ constatou-se fêmea morta colonizada pelo fungo (Figura 16-E).

O grupo CTR apresentou a maior média de recuperação larval ($4624 \pm 293,6$), seguido pelos grupos APQ ($3876 \pm 397,6$), CTR APQ ($3666 \pm 436,8$) e CTR AGQ ($3607 \pm 311,6$), os quais não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento do solo com micropartículas fúngicas AGQ ($1873 \pm 371,2$) resultou no menor número de larvas recuperadas, em comparação aos grupos CTR ($p < 0,0001$) e CTR AGQ ($p = 0,0136$). Não foi observada diferença significativa no número de larvas recuperadas entre o grupo tratado com micropartículas APQ e os grupos CTR e CTR APQ. Dessa forma, a eficácia na recuperação larval foi calculada apenas para o tratamento AGQ, apresentando valor de 59,5% e 48% quando calculada em relação aos grupos CTR e CTR AGQ, respectivamente (Figura 17).

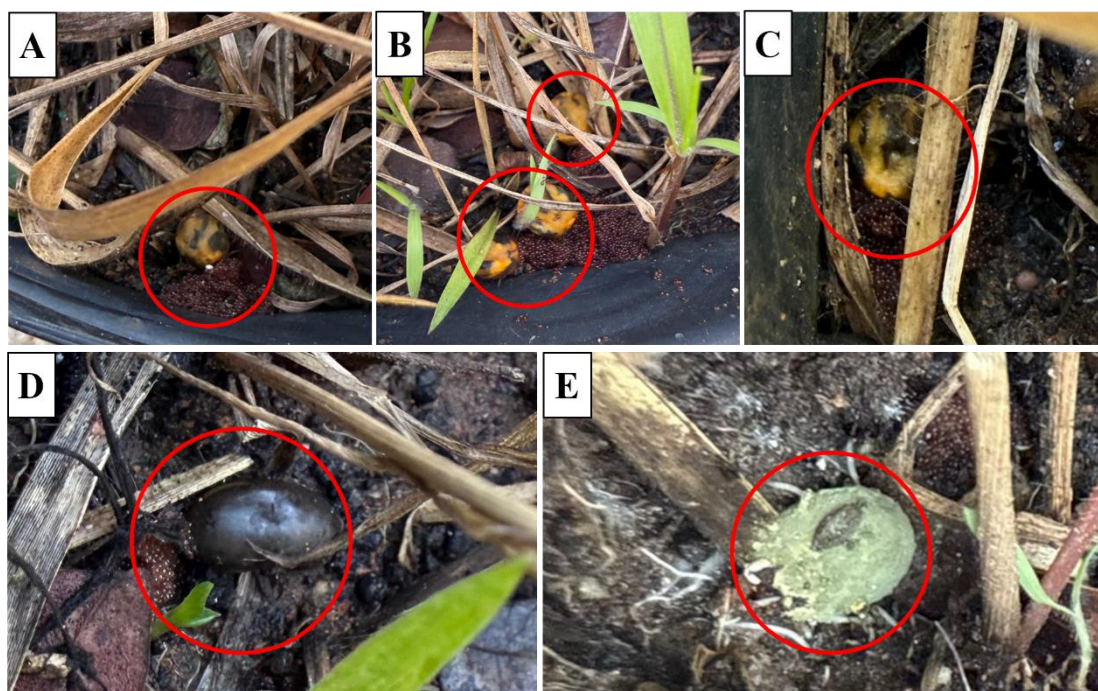


Figura 16: Fêmeas e massa de ovos de *Rhipicephalus microplus*, indicados pelos círculos vermelhos, 23 dias após a introdução das fêmeas ingurgitadas nos vasos cultivados com *Urochloa decumbens*. Fêmeas realizando postura nos grupos sem tratamento (A) e nos grupos tratados com micropartículas sem fungo de alginato de sódio + pectina + quitina (B) e alginato de sódio + glicerol + quitina (C); fêmea morta e ovos no grupo tratado com micropartículas fúngicas de alginato de sódio + pectina + quitina (D) e fêmea colonizada e morta pelo fungo no grupo tratado com micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (E).

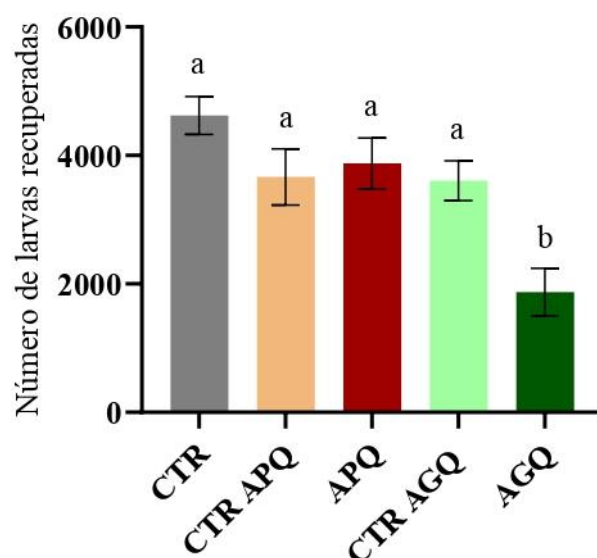


Figura 17: Média e erro padrão do número de larvas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas 48 dias após a introdução das fêmeas nos vasos cultivados com *Urochloa decumbens*, tratados com micropartículas contendo conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 encapsulados. Controle sem tratamento (CTR); micropartículas de alginato de sódio + pectina + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR APQ / APQ); micropartículas de alginato de sódio + glicerol + quitina sem fungo (controle) e com fungo (CTR AGQ / AGQ). Barras com a mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Durante o período experimental, compreendido entre os meses de maio e novembro do ano de 2025, abrangendo as estações de outono, inverno e primavera, foram observadas variações nos valores médios de temperatura (Figura 18) e umidade relativa do ar (UR) (Figura 19). Em maio, a temperatura média foi de 22,5 °C, com UR de 97%. Em junho, registraram-se 21,2 °C e 75,8% de UR, enquanto em julho os valores médios foram de 19,3 °C e 78,2% de UR. No mês de agosto, a temperatura média foi de 21,1 °C e UR de 92,9%. Setembro apresentou a maior temperatura média do período (29,0 °C), acompanhada de UR de 69,8%. Nos meses de outubro e novembro, as temperaturas médias foram de 22,8 °C e 23,5 °C, respectivamente. Foi observado que a maior temperatura foi registrada na primavera, enquanto a menor foi registrada durante o inverno.

No que se refere à chuva acumulada, observou-se que os meses de maio, junho, julho e agosto apresentaram baixos índices de precipitação, condição típica do período de inverno na região avaliada. Dentre esses meses, agosto destacou-se por registrar o menor volume de chuva com 22,8 mm. Em contrapartida, entre setembro a novembro verificou-se um aumento da pluviosidade, associado ao período da primavera. Nesse intervalo, o mês de outubro apresentou o maior acúmulo de chuva, atingindo 88,6 mm (Figura 20).

Estação: SEROPÉDICA-ECOLOGIA AGRÍCOLA (A601)

01/05/2025 – 30/11/2025

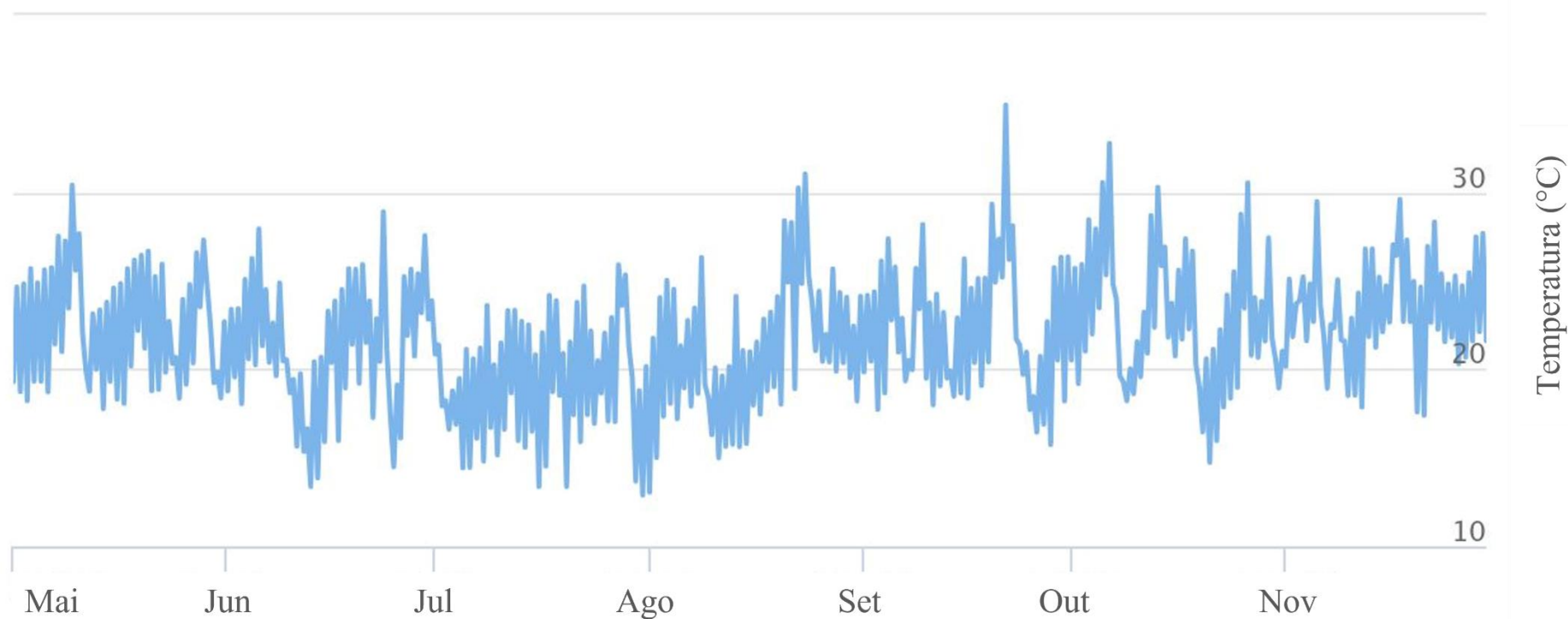


Figura 18: Temperaturas médias registradas de maio a novembro de 2025. As medições foram realizadas diariamente, em intervalos de 8 horas, pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Estação: SEROPÉDICA-ECOLOGIA AGRÍCOLA (A601)

01/05/2025 – 11/10/2025

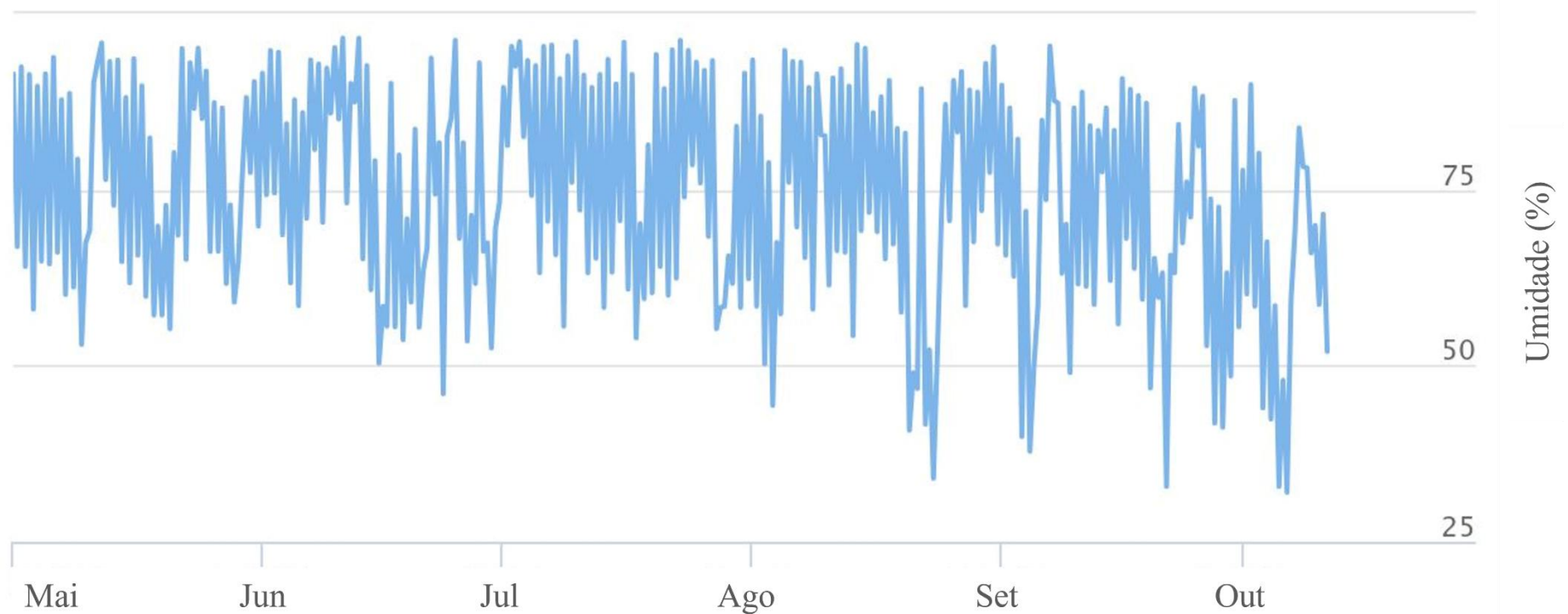


Figura 19: Valores médios de umidade relativa do ar registrados de maio a outubro de 2025. As medições foram realizadas diariamente, em intervalos de 8 horas, pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

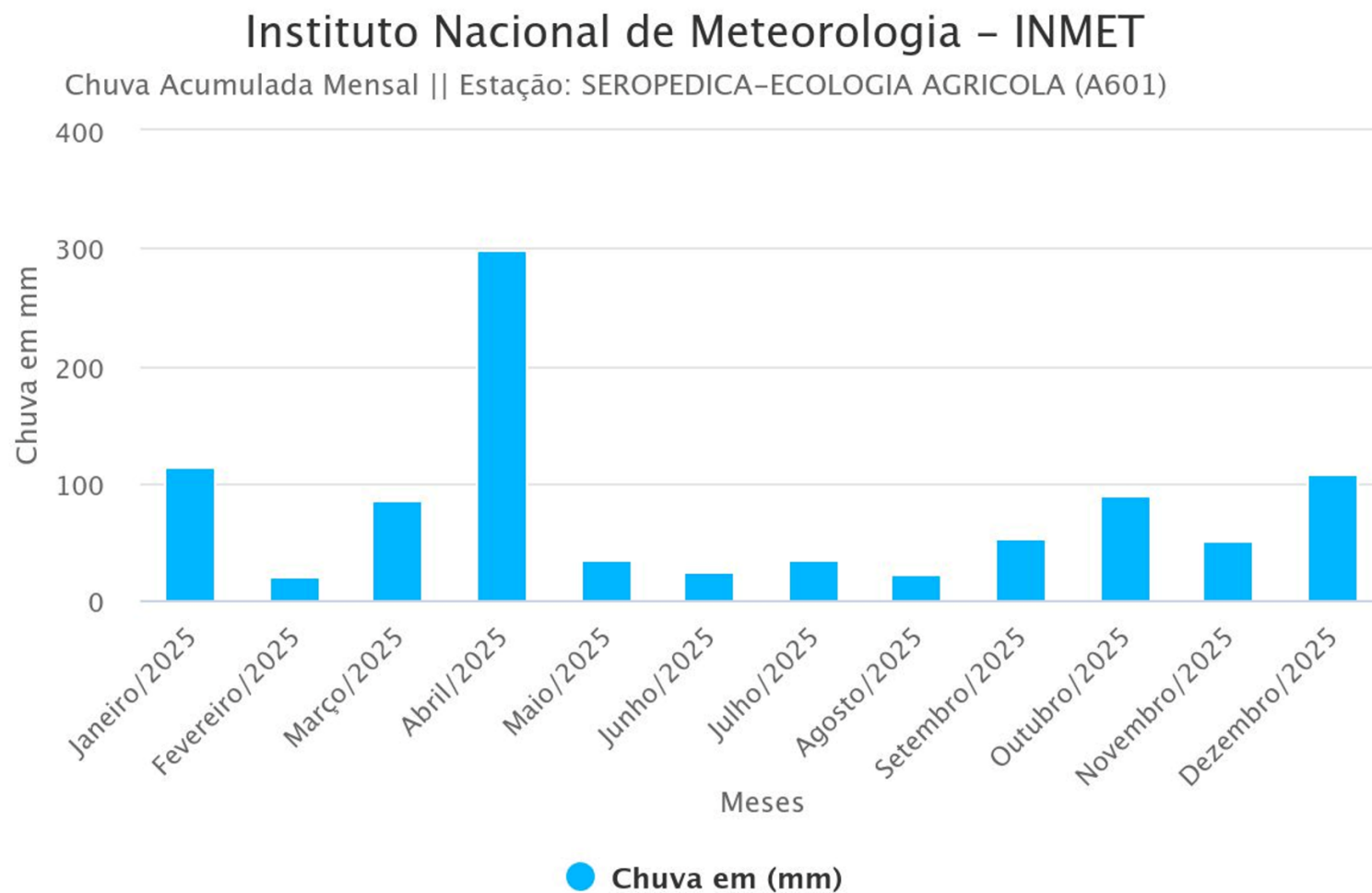


Figura 20: Valores de chuva acumulada mensal registrados no ano de 2025. As medições foram realizadas pela Estação Ecologia Agrícola de Seropédica (A601). Os dados são provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

4.8.1 Reisolamento fúngico de amostras do solo tratado

Nas amostras de solo coletadas antes da aplicação dos tratamentos, foi detectada apenas a presença de fungos saprófitas. Nas coletas realizadas após os tratamentos, observou-se crescimento ocasional de colônias de *Metarhizium* nas amostras provenientes dos grupos controle (CTR, CTR APG e CTR AGQ), o que era esperado, uma vez que o solo utilizado no experimento não foi previamente esterilizado. Essas colônias exibiram características macroscópicas distintas do isolado de *M. anisopliae* CG 148 empregado no ensaio.

Colônias de *Metarhizium anisopliae* CG 148 foram abundantes em todas as amostras de solo coletadas nos grupos tratados com micropartículas fúngicas (APQ e AGQ). Entretanto, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) apresentou variações ao longo das coletas. Na primeira coleta, observaram-se as menores recuperações de UFC por grama de solo, correspondendo a $0,03 \pm 0,01 \times 10^5$ para o grupo APQ e $0,12 \pm 0,03 \times 10^5$ para o grupo AGQ. Na segunda coleta, verificou-se um aumento expressivo no número de UFC em relação à coleta inicial, de aproximadamente 25,6× para APQ ($0,77 \pm 0,13 \times 10^5$; $p < 0,0001$) e 6,58× para AGQ ($0,79 \pm 0,13 \times 10^5$; $p < 0,0001$). Já na terceira coleta, foi observada uma redução significativa na recuperação de UFC no grupo APQ ($0,06 \pm 0,02 \times 10^5$; $p < 0,0001$) em comparação à segunda coleta, enquanto o grupo AGQ ($0,91 \pm 0,40 \times 10^5$; $p > 0,9999$) manteve valores semelhantes aos observados anteriormente. Somente na terceira coleta foi observada diferença significativa entre número de UFC recuperadas dos diferentes grupos ($p=0,0005$) (Figura 21).

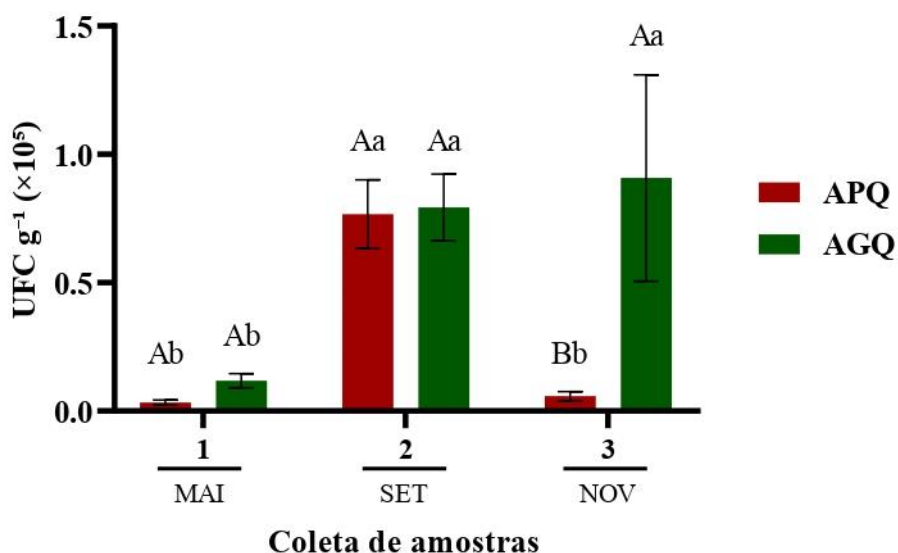


Figura 21: Mediana e erro padrão do número unidades formadoras de colônia (UFC) de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 reisoladas em 1 g de solo dos vasos tratados com micropartículas fúngicas alginato de sódio + pectina + quitina (APQ) e micropartículas fúngicas de alginato de sódio + glicerol + quitina (AGQ), coletadas em três momentos distintos: 13 (1), 117 (2) e 185 (3) dias após o tratamento com as micropartículas. A coleta 1 foi realizada em maio (MAI), a coleta 2 em setembro (SET) e a coleta 3 em novembro (NOV). Barras com a mesma letra maiúscula de diferentes grupos dentro da mesma coleta de amostra,

e barras com a mesma letra minúscula de grupos iguais, o mesmo grupo em coletas de amostras distintas, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de formulações inovadoras é essencial para viabilizar, no Brasil, a implementação efetiva de programas de biocontrole de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos. Neste contexto, os resultados obtidos aqui evidenciam que a elaboração de micropartículas de *M. anisopliae* s.l. CG 148, com diferentes composições de matriz encapsulante, representa um passo estratégico para o controle de *R. microplus*. Essa abordagem permite selecionar combinações capazes de conferir à formulação final não apenas virulência contra o carrapato, mas também características essenciais de um produto biológico destinado ao uso em campo, como estabilidade, facilidade de aplicação nas pastagens e potencial de persistência no ambiente frente aos fatores abióticos.

As propriedades funcionais dos componentes utilizados para a formação das partículas, foram determinantes para os achados obtidos. Acreditamos que o alginato de sódio, amplamente reconhecido pela capacidade de formar géis estáveis via gelificação iônica (Meirelles *et al.*, 2023), atuou como base estrutural, enquanto a pectina contribuiu para maior rigidez e organização da matriz (Locatelli *et al.*, 2018), a quitina desempenhou papel duplo, estrutural e nutricional (Lorenz; Humbert; Patel, 2020) e o glicerol conferiu propriedades higroscópicas e osmoprotetoras, (Sarma *et al.*, 2023). O emprego de polímeros (alginato de sódio, pectina e quitina) e/ou substância adjuvante (glicerol) de elevada compatibilidade biológica (Bejarano; Puopolo, 2021; Martau; Mihai; Vodnar, 2019; Martínez-Cano *et al.*, 2022; Pavithran *et al.*, 2024), resultou num processo de encapsulamento eficiente com a preservação da viabilidade do fúngica. A interação favorável entre os materiais utilizados na formulação de fungos entomopatogênicos é essencial, pois algumas substâncias podem inibir seu crescimento, como observado por Mwamburi, Laing e Miller (2015) com o surfactante Breakthru® e por Rodrigues *et al.* (2017), que constataram efeito moderadamente tóxico do polímero maltodextrina a 1,5% e do solvente DMSO a 2 e 3%, evidenciando que até excipientes comuns podem comprometer a viabilidade fúngica conforme a concentração. Além disso, a gelificação iônica é uma técnica que não requer a aplicação de altas temperaturas, o que preserva a viabilidade do microrganismo. Essa característica representa uma vantagem em relação ao encapsulamento por *spray drying*, no qual as altas temperaturas utilizadas podem comprometer a vida útil do fungo encapsulado, como observado por Acuña-Jiménez *et al.* (2015), Liu e Liu, (2009a) e Muñoz-Celaya *et al.* (2012). Meirelles *et al.* (2023), ao utilizarem alginato de sódio para encapsular conídios de *M. anisopliae* LCM S01 por gelificação iônica, também observaram que a viabilidade do fungo foi mantida. No entanto, registraram uma redução de conídios um pouco maior que a encontrada neste estudo, em média $4,8 \times$ em relação à concentração inicial da suspensão fúngica. Essa diferença pode ser atribuída ao uso do alginato de sódio de forma isolada, já que sua associação com outros polímeros e/ou substância adjuvante tende a aumentar a integridade da matriz encapsulante.

Dentre os componentes avaliados, a quitina se destacou por promover aumento expressivo na esporulação a partir das micropartículas de *M. anisopliae* s.l. CG 148. Por essa razão, as formulações com quitina foram selecionadas para compor os grupos das análises seguintes, considerando que o uso estratégico desse polímero tem potencial de transformar os grânulos em microfermentadores, capazes de multiplicar a produção de conídios no ambiente. Esse efeito também foi encontrado por Gerding-González *et al.* (2007), que incorporaram 2% de quitina na formulação de pellets de alginato contendo *B. bassiana* e observaram aumento na produção de conídios, chegando a triplicar o número inicial. De forma semelhante, Lorenz, Humbert e Patel (2020) utilizaram a gelificação iônica para encapsular blastosporos de *M. pempighi* em grânulos de alginato de sódio contendo quitina ou amido, verificando que as esferas com quitina apresentaram uma conidiação significativamente maior em comparação às que continham amido. Nesse âmbito, o desenvolvimento de formulações capazes de aumentar

a quantidade de propágulos encapsulados pode representar uma vantagem econômica, uma vez que reduz a necessidade de produzir grandes volumes de micropartículas. Essa otimização no uso de insumos poder refletir na diminuição dos custos da formulação, ampliando a viabilidade comercial da tecnologia de encapsulamento de fungos entomopatogênicos e favorecendo sua aplicação em programas de controle de artrópodes em larga escala.

As características físicas das formulações também se mostraram alinhadas com os objetivos de uso em campo. As micropartículas apresentaram formato e distribuição de tamanho típicos da técnica de encapsulamento por gelificação iônica, uma vez que método de extrusão por gotejamento é reconhecido por gerar partículas esféricas com dimensões variadas (Ali *et al.*, 2023; Vemmer; Patel, 2013). Do ponto de vista prático, a forma granular das micropartículas desenvolvidas aqui facilita o manuseio, o armazenamento e a aplicação direta no solo, o que é altamente desejável no controle de *R. microplus*, considerando que cerca de 95% da população do carrapato encontra-se na pastagem (Powell; Reid, 1982). Desta forma, as formulações elaboradas podem contribuir para a maior eficácia no controle da fase não parasitária presente no solo, reforçando a relevância dessa estratégia para o manejo do carrapato do boi (Marciano *et al.*, 2021). Observou-se que as formulações contendo pectina (APQ e APGQ) apresentaram superfície mais regular, resultado semelhante ao descrito por Bekhit *et al.*, 2016, que encapsularam *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* em microesferas compostas de alginato e pectina. Esse padrão estrutural pode ser atribuído à interação da pectina com a matriz polimérica de alginato de sódio, que promove a formação de uma rede tridimensional mais estável, conferindo homogeneidade e reduzindo a porosidade superficial (Rosales; Fabi, 2023; Souza Almeida *et al.*, 2020).

As análises de FTIR complementam os achados ao indicar alterações na intensidade e no posicionamento de bandas associadas a grupos hidroxilas, aminas e carbonila nas micropartículas contendo conídios fúngicos, quando comparadas às matrizes isoladas. Essas alterações sugerem a ocorrência de interações físicas, possivelmente mediadas por ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas entre a matriz polimérica e a parede celular do fungo. Tais interações podem ter contribuído para uma maior coesão estrutural da matriz encapsulante, favorecendo a proteção dos conídios contra fatores ambientais (Locatelli *et al.*, 2018; Maruyama *et al.*, 2020), como radiação UV-B e calor, conforme observado nos ensaios de tolerância.

O tempo de prateleira constitui um dos principais entraves à comercialização de produtos biológicos empregados no controle de pragas, uma vez que a manutenção da viabilidade dos propágulos é fortemente dependente das condições ambientais (Morgan *et al.*, 2006; Sarma *et al.*, 2023). A estabilidade durante o armazenamento também foi diretamente influenciada pela formulação desenvolvida. Os achados deste estudo demonstraram que o armazenamento sob refrigeração foi significativamente mais eficaz na preservação da viabilidade das micropartículas de *M. anisopliae* s.l. CG 148, quando comparado ao armazenamento em temperatura ambiente. Nesta última condição, observou-se uma redução drástica da viabilidade dos conídios encapsulados após um mês de armazenamento. Resultados semelhantes foram reportados por Meirelles *et al.* (2023), que observaram maior viabilidade de conídios de *M. anisopliae* encapsulados em alginato de sódio quando armazenados em freezer, em comparação à temperatura ambiente. Esses achados reforçam que o armazenamento em baixas temperaturas é mais adequado e recomendado para produtos biológicos, uma vez que retarda reações de degradação celular, prolongando a vida útil do microrganismo (Guo; Zhang, 2024). Os conídios não encapsulados apresentaram maior germinação em relação aos encapsulados e se mantiveram viáveis com germinação próxima a 100% durante os dois meses de armazenamento em ambas as condições avaliadas. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de conídios secos raspados da superfície do meio de cultura estarem em estado de dormência sendo capazes de resistir a condições adversas de armazenamento e permanecer

viáveis por longos períodos quando secos, com metabolismo reduzido até serem reidratados (Feofilova et al., 2012).

A absorção de irradiação UV-B pelas células fúngicas desencadeia reações de degradação irreversíveis, resultando na formação de dímeros de pirimidina que podem reduzir a germinação, comprometer a virulência e, em casos extremos, levar à morte do fungo (Braga et al., 2015; Brancini; Bachmann; Braga, 2021). Assim, a exposição excessiva à irradiação UV-B é um importante fator limitante para o uso de fungos entomopatogênicos como agentes de biocontrole. Aqui, o encapsulamento com as formulações AQ, APQ, AGQ e APGQ conferiu proteção significativa contra irradiação UV-B, em contraste com os conídios não encapsulados, cuja germinação foi reduzida. De maneira semelhante, Shin et al. (2023) verificaram que o encapsulamento de conídios de *B. bassiana* em emulsão de Pickering estabilizada com nanomateriais de celulose (CNM) preservou a viabilidade celular e manteve a atividade inseticida após exposição à irradiação UV. Apesar das diferentes abordagens, ambos os estudos confirmam que a matriz encapsulante garante proteção ao propágulo encapsulado, atenuando ou evitando os danos celulares induzidos pela radiação ultravioleta.

A proteção conferida pela cápsula, também se refletiu na tolerância do fungo formulado ao calor, com manutenção da viabilidade dos conídios expostos a altas temperaturas, independente da composição das micropartículas. Os conídios de *M. anisopliae* CG 148 encapsulados apresentaram germinação superior a 65%, enquanto os conídios não encapsulados exibiram menos de 1% de germinação, após 4 h de exposição a 45 °C. A termotolerância é uma condição fundamental para que fungos entomopatogênicos mantenham sua viabilidade e eficácia no controle biológico, especialmente em regiões tropicais (Quesada-Moraga et al., 2024). A exposição a temperaturas elevadas pode comprometer funções metabólicas, provocar desnaturação proteica e alterar a integridade da membrana dos conídios, resultando em redução da germinação, da esporulação e da capacidade de infecção no hospedeiro (Paixão; Fernandes; Pedrini, 2019; Rangel et al., 2010). Utilizando outras técnicas, Felizatti et al. (2021) encapsularam conídios de *B. bassiana* com uso de *spray drier* e gelificação iônica, concluindo que ambas possibilitaram a obtenção de micropartículas fúngicas estáveis quando submetidas à temperatura de 60 °C por 4 h, em comparação aos conídios não formulados. Já De Jesus Seabra et al. (2024) observaram que, após exposição a 45 °C por 60 h, os conídios de *B. bassiana* encapsulados em 2% de alginato de sódio e 8% de maltodextrina, pelo método de *spray drier*, mantiveram 45,02% de viabilidade conidial, enquanto a suspensão fúngica perdeu totalmente sua viabilidade já nas primeiras 4 h. Esses resultados reforçam que, independentemente da técnica empregada, o encapsulamento em matrizes poliméricas é capaz de preservar a viabilidade dos conídios sob estresse térmico.

Estudos de mercado apontam que o setor de bioinsumos deverá expandir de forma significativa nos próximos anos, resultado da crescente demanda por alternativas sustentáveis no manejo de pragas (Da Silva Medina; Rotondo; Rodríguez, 2024; Felipe de Lima Andreatta et al., 2025; Medina; Rotondo; Rodríguez, 2023; Soares et al., 2023). No Brasil, durante o verão, é comum que as temperaturas ultrapassem 35 °C, o que representa um desafio para a sobrevivência e o desempenho de microrganismos aplicados no controle biológico. Nesse cenário, marcado pelo agravamento da crise climática, o aprimoramento de formulações é indispensável para o sucesso desses agentes de biocontrole. As diferentes composições da matriz encapsulante testadas aqui atuaram como barreira física eficiente, protegendo o microrganismo encapsulado contra exposições excessivas à radiação UV-B e a temperaturas elevadas. Esses resultados reforçam que estratégias de encapsulamento podem não apenas potencializar a eficácia dos fungos entomopatogênicos em condições ambientais adversas, mas também atender às demandas do mercado por produtos biológicos mais estáveis. A preservação da vida útil desse entomopatógeno em etapas críticas da cadeia de manutenção e logística, como armazenamento e transporte, mostra-se essencial para assegurar a qualidade do produto final e

atender às expectativas dos consumidores (Jenkins; Grzywacz, 2000; Quesada-Moraga *et al.*, 2024).

A eficácia das micropartículas fúngicas AQ, APQ, AGQ e APGQ desenvolvidas no presente estudo foi evidente no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em condições controladas, com redução significativa do peso total da massa de ovos e índice de produção de ovos (IPO) em comparação aos grupos controle (Tween 80 e micropartículas sem fungo). Entretanto, o tratamento com os conídios encapsulados não afetou os parâmetros biológicos em relação aos conídios não encapsulados. Resultados distintos foram relatados por Meirelles *et al.* (2023), que observaram redução significativa dos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus* ao utilizar conídios encapsulados com 2 e 3% de alginato de sódio em comparação ao tratamento com a suspensão fúngica. Essa diferença pode ser atribuída, em parte, à ação dos distintos isolados fúngicos de *M. anisopliae* empregados em cada estudo. Embora a associação do alginato com outros polímeros, proposta neste trabalho, pode não ter exercido efeito na potencialização da ação do fungo, o processo de encapsulamento não comprometeu a virulência do isolado fúngico utilizado, ao mesmo tempo que agregou valor tecnológico à formulação desenvolvida. Outro ponto relevante foi a observação da colonização do solo pelas micropartículas, seguida da infecção e morte das fêmeas, o que evidencia que o encapsulamento não comprometeu o ciclo infectivo do fungo. Tal capacidade de completar seu desenvolvimento no hospedeiro é uma característica desejável para agentes de controle biológico, pois contribui para a autoperpetuação do patógeno no ambiente, reduzindo a necessidade de reaplicações frequentes (Bidochka; St. Leger; Roberts, 1997; Roberts; St. Leger, 2004).

Para otimizar a execução do ensaio em condições de semi-campo, e com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores, foram selecionadas as formulações APQ e AGQ, com o objetivo de avaliar o efeito específico da pectina e do glicerol quando incorporados a uma matriz polimérica de alginato de sódio e quitina. Os ensaios de semi-campo desenvolvidos neste estudo demonstraram que o tratamento do solo de vasos cultivados com *U. decumbens* com micropartículas AGQ reduziu em 59,5% o número de larvas de *R. microplus* recuperadas no ápice das forrageiras em relação ao grupo que não recebeu tratamento algum. Dessa forma, as micropartículas AGQ mostraram-se eficazes no controle do carrapato, enquanto a formulação APQ não apresentou resposta nas condições avaliadas. Os resultados obtidos podem ser atribuídos à influência da composição da matriz polimérica na criação de um ambiente favorável à germinação dos conídios de *M. anisopliae* s.l. CG 148 e à sua liberação a partir das partículas aplicadas no solo, sob condições sujeitas a variações extremas de temperatura, umidade, radiação, dentre outros fatores ambientais. A presença de glicerol na formulação AGQ, com suas propriedades higroscópica e osmoprotetora, pode ter favorecido a retenção de água e a formação de um ambiente mais úmido e estável, condição essencial para a germinação dos conídios e o crescimento micelial (Locatelli *et al.*, 2018; Sarma *et al.*, 2023). Em contrapartida, a matriz APQ, por conter pectina, tende a formar géis mais rígidos quando reticulada por íons cálcio durante o processo de gelificação iônica, o que pode limitar a difusão de água e a germinação dos conídios encapsulados, reduzindo a liberação destes propágulos (Bekhit *et al.*, 2016; Ekesi; Maniania; Lux, 2003; Krell *et al.*, 2018). Essa limitação pode resultar em menor quantidade de fungo no solo e, conseqüentemente, em uma menor taxa de infecção dos diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato ali presentes. Desta forma, considerando a capacidade dos conídios de esporular a partir da matriz encapsulante, estabelecer-se e crescer no solo, bem como infectar e causar a morte de fêmeas ingurgitadas, conforme demonstrado nos ensaios laboratoriais deste estudo, a maior eficiência das partículas AGQ pode ser atribuída à criação de um ambiente favorável ao desenvolvimento dos conídios encapsulados, associada à maior quantidade de conídios liberados e à manutenção do fungo no solo a longo prazo. Esse conjunto de fatores pode ter contribuído para a intensificação do

contato entre os propágulos fúngicos e o carrapato, favorecendo a infecção não apenas das fêmeas ingurgitadas introduzidas no solo, mas também dos ovos e larvas presentes ali.

Quanto ao reisolamento de *M. anisopliae* a partir das amostras de solo dos ensaios em semi-campo, foram registradas as menores recuperações de UFC por grama de solo na coleta realizada no dia da introdução das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nos vasos, correspondente a 13 dias após o tratamento com as micropartículas fúngicas. Essa baixa recuperação fúngica, observada em ambos os grupos avaliados (APQ e AGQ), pode ser atribuída à exposição das partículas a condições ambientais não controladas, caracterizadas por variações expressivas de temperatura e umidade relativa. Esses 13 dias do mês de maio apresentaram registros de temperatura máxima de 31,8 °C e mínima de 15,4 °C, bem como umidade relativa máxima de 92,2% e mínima de 29%, associadas à ocorrência de precipitação pluviométrica em apenas dois dias durante o período. A exposição a essas condições pouco favoráveis ao desenvolvimento fúngico, cujo desempenho ideal ocorre em torno de 25 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, pode ter impactado negativamente a germinação dos conídios encapsulados, contribuindo para a redução da esporulação a partir da superfície das partículas e, consequentemente, para a baixa recuperação de UFC do solo (Couceiro *et al.*, 2021).

Na segunda coleta de amostras de solo, realizada no mês de setembro, ao final do período de recuperação larval, observou-se um aumento expressivo no número de UFC tanto para as micropartículas APQ quanto para as AGQ. Esse aumento pode ser atribuído a condições mais favoráveis ao crescimento fúngico, proporcionadas pelo aumento da umidade do solo, uma vez que setembro se caracteriza como um período de transição marcado pelo término da estação seca e fria (inverno) e pelo início das primeiras chuvas da primavera. A umidade do solo é reconhecidamente um dos fatores determinantes para a germinação dos conídios e o crescimento micelial de fungos entomopatogênicos (Ekesi; Maniania; Lux, 2003). Assim, as condições ideais de umidade no solo podem ter contribuído para que ambas as formulações proporcionassem adequado desenvolvimento do fungo, independentemente das características estruturais da matriz polimérica, resultando em elevada recuperação de unidades formadoras de colônias. A terceira coleta evidenciou uma redução acentuada no número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas das amostras de solo do grupo APQ. Em contraste, o solo do grupo AGQ manteve valores de colônias reisoladas semelhantes aos observados na coleta anterior. Esse fato pode estar associado à capacidade da matriz polimérica constituída por alginato de sódio, glicerol e quitina de proporcionar um ambiente interno fisiologicamente mais estável aos conídios encapsulados, favorecendo a manutenção da viabilidade e da atividade fúngica mesmo após exposição prolongada a condições ambientais desfavoráveis.

Nos ensaios biológicos com *R. microplus*, conduzidos tanto em laboratório quanto em condições de semi-campo, os tratamentos com micropartículas sem fungo indicaram que os diferentes componentes da matriz encapsulante não exerceram efeitos negativos sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos. Esses achados reforçam a natureza biocompatível dos polímeros e do adjuvante empregados neste estudo, os quais interagiram com o fungo e o artrópode sem provocar danos. Além disso, por serem biodegradáveis, esses componentes se decompõem naturalmente, sem gerar resíduos tóxicos no ambiente (Harrazi *et al.*, 2024; Martau; Mihai; Vodnar, 2019). Tal característica é de grande relevância para a pecuária, uma vez que a presença de resíduos químicos pode contaminar o solo e comprometer a qualidade da carne e do leite.

Dando continuidade aos estudos realizados anteriormente com o uso de alginato de sódio como matriz encapsulante utilizando-se o método de gelificação iônica (Meirelles *et al.*, 2023), esta tese avançou ao incorporar outros polímeros e adjuvante com o objetivo de aprimorar as propriedades da formulação. Os achados encontrados aqui oferecem subsídios relevantes para o desenvolvimento de produtos comerciais à base de fungos entomopatogênicos destinados ao controle da fase não parasitária de *R. microplus*. Além da praticidade associada

à aplicação direta nas pastagens, o encapsulamento empregado na formulação de fungos demonstra capacidade de conferir maior estabilidade aos propágulos encapsulados, característica indispensável em etapas críticas da cadeia industrial, como armazenamento, manutenção e transporte. Adicionalmente, os testes realizados com diferentes combinações de matrizes poliméricas avaliadas, constituem uma base sólida para o aprimoramento de formulações granulares com potencial promissor de aumentar a resistência e a persistência do fungo frente a condições ambientais adversas encontradas no campo. Dessa forma, os resultados obtidos aqui não apenas reforçam o encapsulamento como uma ferramenta tecnológica eficaz para a formulação de fungos entomopatogênicos, mas também evidenciam sua viabilidade como estratégia a ser incorporada em programas de manejo integrado de *R.microplus*, contribuindo para sistemas de controle mais sustentáveis e eficientes.

6 CONCLUSÕES

O encapsulamento por gelificação iônica utilizando as combinações A, AQ, AP, APQ, AG, AGQ, APG e APGQ é eficiente, pois resultou em baixa perda de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.l. CG 148 e preservou a viabilidade do propágulo fúngico.

A quitina incorporada nas formulações promove o aumento de conídios esporulados a partir das micropartículas fúngicas.

O encapsulamento de conídios em AQ, APQ, AGQ e APGQ produz micropartículas fúngicas esféricas com distribuição variada de tamanho, apresentando superfície mais homogênea e com menor porosidade (APQ e APGQ) ou heterogênea e com maior porosidade (AQ e AGQ), evidenciando que a composição da matriz encapsulante influencia na morfologia das micropartículas.

Em temperatura ambiente e em condição de refrigeração, as formulações em AQ, APQ, AGQ e APGQ não aumentam a vida útil dos conídios encapsulados quando comparados aos conídios não encapsulados. O armazenamento sob refrigeração é mais eficiente na preservação da viabilidade fúngica de conídios encapsulados.

O encapsulamento em AQ, APQ, AGQ e APGQ fornece proteção aos conídios fúngicos contra os efeitos da exposição à irradiação UV-B ($6,0 \text{ kJ m}^{-2}$) e ao calor (45°C por 4 horas), demonstrando que a matriz encapsulante funciona como uma barreira física contra esses fatores ambientais adversos.

Os diferentes componentes da matriz encapsulante, alginato de sódio, pectina, glicerol ou quitina não exercem efeitos negativos sobre a biologia das fêmeas ingurgitadas em condições de laboratório e semi-campo.

O tratamento com micropartículas fúngicas AQ, APQ, AGQ e APGQ apresenta eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório.

O processo de encapsulamento não afeta a capacidade do fungo em completar seu ciclo infectivo em fêmeas ingurgitadas em condições de laboratório.

O tratamento do solo de vasos cultivados com *Urochloa decumbens* com micropartículas fúngicas AGQ apresenta eficácia na redução do número de larvas *R. microplus* recuperadas das forrageiras em condições de semi-campo. O tratamento com APQ não reduz o número de larvas recuperadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. Beef Report 2025: Perfil da Pecuária no Brasil. [S.l.]: **ABIEC**, 2025. Disponível em: <https://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2025-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- 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.
- ALI, M., CYBULSKA, J., FRAC, M., ZDUNEK, A. Application of polysaccharides for the encapsulation of beneficial microorganisms for agricultural purposes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 244, p. 125366, 2023.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ: [s. n.], 1998.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V, KOLLER, W. W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Resistência dos carrapatos aos acaricidas. **Embrapa**, p. 138-145, 2019.
- 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.
- BALDIVIEZO, L. V., PEDRINI, N., NIEVA, L. B., GENTILE, A., Cardozo, R. M. Microencapsulation of a native strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and bioinsecticide activity against pyrethroid-resistant *Triatoma infestans* to vector control of Chagas disease in the Argentine Gran Chaco region. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 245, 2023.
- BEJARANO, A., PUOPOLO, G. Bioformulation of microbial biocontrol agents for a sustainable agriculture. In: **How research can stimulate the development of commercial biological control against plant diseases**. Cham: Springer International Publishing, p. 275–293, 2021.
- BEKHIT, M., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., MESSAOUD, G. B., DESOBRY, S. Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release. **Journal of food engineering**, v. 180, p. 1-9, 2016.
- BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE): influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, p. 52–61, 1974.
- BERNARDO, C. C., PEREIRA-JUNIOR, R. A., LUZ, C., MASCARIN, G. M., FERNANDES, É. K. K. Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. **Fungal Biology**, v. 124, n. 8, p. 714-722, 2020.
- 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. D. O. B., DE SOUSA QUEIROZ Sousa, R. R., RIBEIRO, A., DE SOUZA RIBEIRO, Y. R., BOECHAT, M. S. B., Carolino, A. T.; SANTA-CATARINA, C., SAMUELS, R. I. Encapsulation of *Beauveria bassiana* conidia as a new strategy for the biological control of *Aedes aegypti* larvae. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 31894, 2024.

BITTENCOURT, V. R. E. P., BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K., SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 38–42, 2003.

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.

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.

BRANCINI, G. T., HALLSWORTH, J. E., CORROCHANO, L. M., BRAGA, G. Ú. Photobiology of the keystone genus *Metarhizium*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 226, p. 112374, 2022.

BRANCINI, G. T. P.; BACHMANN, L.; BRAGA, G. Ú. L. Timing and duration of light exposure during conidia development determine tolerance to ultraviolet radiation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 19, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Mapa do Leite**. Brasília: MAPA, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 25 ago. 2025.

CALVANO, M. P. C. A., BRUMATTI, R. C., GARCIA, M. V., BARROS, J. C., ANDREOTTI, R. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. **Experimental and Applied Acarology**, v. 79, n. 3, p. 459–471, 2019.

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.

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.

CELESTINO, M. F.; OLIVEIRA, J. A. S. CELESTINO, Matheus Felipe; DOS SANTOS OLIVEIRA, João Arthur. Métodos de encapsulamento de fungos entomopatogênicos para sua aplicação no controle biológico. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e123111638031-e123111638031, 2022.

CHOUDHURY, N.; MEGHWAL, M.; DAS, K. Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. **Food Frontiers**, v. 2, n. 4, p. 426–442, 2021.

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.

COUCEIRO, J. D. C., FATORETTO, M. B., DEMÉTRIO, C. G. B., MEYLING, N. V., DELALIBERA JR, Í. UV-B radiation tolerance and temperature-dependent activity within the entomopathogenic fungal genus *Metarhizium* in Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 645737, 2021.

DA SILVA MEDINA, G; ROTONDO, R.; RODRÍGUEZ, G. R. Innovations in agricultural bio-inputs: commercial products developed in Argentina and Brazil. **Sustainability**, v. 16, n. 7, p. 2763, 2024.

DE JESUS SEABRA, M. G., SANTOD, T. S., de SOUZA VIREZE, C., SOUTO, E. B., SEVERINO, P., DA COSTA MENDONÇA, M. New *Beauveria bassiana* aerial conidia-based bioinsecticide obtained by spray-dried microencapsulation of the entomopathogenic fungi in biopolymers for crop protection. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 34, n. 1, p. 58, 2024.

DELGADO, P. A. M.; MURCIA-ORDOÑEZ, B. Hongos entomopatogênicos como alternativa para el control biológico de plagas. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 77–90, 2011., v. 6, n. 2, p. 77–90, 31 ago. 2011.

DIAS, L. P., SOUZA, R. K. F., PIPIN, B., & RANGEL, D. E. N. Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses. **Fungal Biology**, v. 125, n. 11, p. 891–904, 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.

DZEMO, W. D., VUDRIKO, P., RAMATLA, T., THEKIDOE, O. Acaricide resistance development in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations against amitraz and deltamethrin on communal farms of the King Sabata Dalindyebo Municipality, South Africa. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 875, 2023.

EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 2, p. 157–167, 2003.

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.; WRIGHT, 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.

FELIPE DE LIMA ANDREATA, M., ALVES, S. M., ANDREDE, G., BUENO, A., VENTURA, M. U., MARCONDES DE ALMEIDA, J. E., IVAN, E. A. F., MOSELA, M., SIMIONATO, A. S., ROBAINA, R. R., GONÇALVES, L. S. A. (2025). The current increase and future perspectives of the microbial pesticides market in agriculture: the Brazilian example. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1574269, 2025.

FELIZATTI, A. P., MANZANO, R. M., RODRIGUES, I. M. W., DA SILVA, M. F. D. G. F., FERNANDES, J. B., FORIM, M. R. Encapsulation of *B. bassiana* in biopolymers: improving microbiology of insect pest control. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 704812, 2021.

FEOFILOVA, E. P., IVASHECHKIN, A. A., ALEKHIN, A. I., SERGEEVA, Y. E. Fungal spores: dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 1–11, 2012.

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

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.

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.

GUO, S., ZHANG, A. Review of different temperatures for biopreservation. **International Journal of Refrigeration**, v. 157, p. 53-59, 2024.

HARRAZI, N., OZBEK, H. N., YANIK, D. K., ZAGHBIB, I., & GOGUS, F. Development and characterization of gelatin-based biodegradable films incorporated with pistachio shell hemicellulose. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, n. 10, p. 1919–1929, 1 out. 2024.

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.

JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 753–777, 2000.

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.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 1–2, p. 1–10, 2006.

JYOTHI, N. V. N., PRASANNA, P. M., SAKARKAR, S. N., PRABHA, K. S., RAMAIAH, P. S., SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.

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.

KIDANU, S.; HAGOS, L. Research and application of entomopathogenic fungi as pest management option: a review. **Journal of Environment and Earth Science**, v. 10, n. 3, p. 31-39, 2020.

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.

KLAFKE, G. M.; GOLO, P. S.; MONTEIRO, C. M. O.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; RECK, J. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, p. e001423, 2024.

KRELL, Vivien *et al.* Cellulase enhances endophytism of encapsulated *Metarhizium brunneum* in potato plants. *Fungal Biology*, v. 122, n. 5, p. 373–378, 1 maio 2018.

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 pempighi* blastospores for *Ixodes ricinus* control. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, . 6, p. 101537, 2020.

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Management Science*, v. 74, n. 4, p. 781–789, 1 abr. 2018.

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.

MARTAU, G. Ad.; MIHAI, M.; VODNAR, D. C. The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. **Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1837, 2019.

MARUYAMA, C. R.; BILESKEY-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.

MARTÍNEZ-CANO, B.; MENDOZA-MENESES, C. J.; GARCÍA-TREJO, J. F.; MACÍAS-BOBADILLA, G.; AGUIERRE-, H.; SOTO-ZARAZÚA, G. M.; FERREGRINO-PÉREZ, A. A. Review and Perspectives of the Use of Alginate as a Polymer Matrix for Microorganisms Applied in Agro-Industry. **MoleculesMDPI**, v.27, n. 13, p. 4248, 2022.

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.

MEDINA, G. D. S.; ROTONDO, R.; RODRÍGUEZ, G. R. Agricultural bio-inputs as an innovative area of opportunity for agro-industrial growth in developing countries: lessons from Argentina. **World**, v. 4, n. 4, p. 709–725, 2023.

MEIRELLES, L. N.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; BITENCOURT, R. D. O. B.; OLIVEIRA, J. L.; FRACETO, L. F.; CAMARGO, M. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 14, n. 4, p. 102184, 2023.

MELO, F. O.; CONSTANT, P. B. L. Microencapsulação por Gelificação Iônica: uma prospecção tecnológica com base no INPI. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, n. 4, p. 1236–1247, 2021.

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.

MILKPOINT. **Situação e principais desafios da produção de leite no Brasil**. 6 fev. 2025. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/situacao-e-principais-desafios-da-producao-de-leite-no-brasil-238126/>. Acesso em: 25 ago. 2025.

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.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. e0552015, 2017.

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.

MWAMBURI, L. A.; LAING, M. D.; MILLER, R. M. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *beauveria bassiana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 67–74, 2015.

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.

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.

PAVITHRAN, R. K.; REDDY, S. G.; KUMAR, B. S.; KUGABALASOORIAR, S. Enhancing sustainability in agriculture: natural polymer-based controlled release systems for effective pest management and environmental protection. **ES Food & Agroforestry**, v. 18, p. 1276, 2024.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S. B.; CAMARGO, M. G.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS DA SILVA, W. O.; SALLES, C. M. C. BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: Biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 123-132, 2014.

POLICARPO, M. A.; SAMBUICHI, R. H. R., ALVES, F.; PACÍFICO, D. A.; GUALDANI, C.; BRATZ, F. Desafios e oportunidades para o avanço da produção de bioinsumos no Brasil. Brasília, DF: Ipea, junho 2025. 68 p.: il. (Texto para Discussão, n. 3133).

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.

QUESADA-MORAGA, E.; GONZÁLEZ-MAS, N.; YOUSEF-YOUSEF, M.; GARRIDO-JURADO, I.; FERNÁNDEZ-BRAVO, M. Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. **Journal of Pest Science**, v. 97, n. 1, p. 1-15, 2024.

RAJPUT, M.; SAJID, M. S.; RAJPUT, N. A.; GEORE, D. R.; USMAN, M.; ZEESHAN, M.; IQBAL, O.; BHUTTO, B.; ATIQ, M.; Rizwan, H. M.; DANIEL I. K.; SPARAGANO, O. A. Entomopathogenic fungi as alternatives to chemical acaricides: Challenges, opportunities and prospects for sustainable tick control. **Insects**, v. 15, n. 12, p. 1017, 2024.

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.; FERNANDES, É. K.; BRAGA, G. U.; ROBERTS, D. Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. **FEMS microbiology letters**, v. 315, n. 2, p. 81-86, 2011.

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

RODRIGUES, Inajá Marchizeli Wenzel *et al.* 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, 2017a.

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.

ROSALES, T. K. O.; FABÍ, J. P. Pectin-based nanoencapsulation strategy to improve the bioavailability of bioactive compounds. **International journal of biological macromolecules**, v. 229, p. 11-21, 2023.

SABERI-RISEH, R.; MORADI-POUR, M.; MOHAMMADINEJAD, R.; THAKUR, V. K. Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. **Polymers**, v. 13, n. 12, p. 1938, 2021.

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

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.

SANTOS, A. C. D. S.; LOPES, R. D. S.; DE OLIVEIRA, L. G.; DINIZ, A. G.; SHAKEEL, M.; LIMA, E. Á.; D. L. A.; COSTA, A. F.; LIMA, V. L. D. M. Entomopathogenic fungi: current status and prospects. **New and future development in biopesticide research: Biotechnological exploration**, p. 55-91, 2022.

SARMA, B. D.; PUZARI, K. C.; DUTTA, P.; PANDEY, A. K. An alginate-based encapsulation enhances shelf life and bioactivity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2023.

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

SENBILL, H.; HAZARIKA, L. K.; BARUAH, A.; BORAH, D. K.; BHATTACHARYYA, B.; RAHMAN, S. Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini 1888 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 6, p. 1169-1179, 2018.

SHIN, J.; SHIN, S.; CHOI, J.; JEONG, W.; KIM, J. E.; KI, C. S.; YOUN, H. J.; SON, H.; KWAK, S. Y. Encapsulation of the Biocontrol Agent *Beauveria bassiana* in Cellulose Nanomaterial-Stabilized Pickering Emulsion for Foliar Application. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 3, n. 10, p. 894-905, 2023.

SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. **Integrated pest management**, p. 169-191, 2014.

SLOWIK, A. R.; HESKETH, H.; SAIT, S. M.; LICHT, H. H. D. F. Thermal ecology shapes disease outcomes of entomopathogenic fungi infecting warm-adapted insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 204, p. 108106, 2024.

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

SOARES, C. R. F. S.; HERNÁNDEZ, A. G.; DA SILVA, E. P.; DE SOUZA, J. E. A.; BoNFIM, D. F.; ZABOT, G. L.; FERREIRA, P. A. A.; Brunetto, G. Applications and market of micro-organism-based and plant-based inputs in Brazilian agriculture. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 3844, 2023.

SOUZA ALMEIDA, F.; GUEDES SILVA, K. C.; MATIAS NAVARRETE DE TOLEDO A.; KAWAZOE Sato, A. C. Modulating porosity and mechanical properties of pectin hydrogels by starch addition. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 302-310, 2021.

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.

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.

VANNUCCHI, M. A.; TEIXEIRA, M. M. Impactos econômicos e sanitários na infestação de *Rhipicephalus (Boophiplus) microplus*: desafios e soluções sustentáveis–Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 14, n. 5, p. e11514548910-e11514548910, 2025.

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.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, p. 311–346, 2001.

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.

VINDAS-REYES, E.; CHACÓN-CERDAS, R.; RIVERA-MÉNDEZ, W. *Trichoderma* production and encapsulation methods for agricultural applications. **AgriEngineering**, v. 6, n. 3, p. 2366-2384, 2024.

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

ZABOT, G. L.; SCHAEFER RODRIGUES, F.; POLANO ODY, L.; VINÍCIUS TRES, M.; HERRERA, E., PALACIN, H.; CÓRDOVA-RAMOS, J. S.; BEST, I.; OLIVERA-MONTENEGRO, L. Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. **Polymers**, v. 14, n. 19, p. 4194, 2022.

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

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, 2007b.