

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

Gabriela Santos de Paula

**Fungos encapsulados em matriz de pectina visando o controle de formigas-
cortadeiras**

ARARAS
Outubro / 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

Fungos encapsulados em matriz de pectina visando o controle de formigas-cortadeiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara
Coorientador: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

ARARAS
Agosto / 2022

Paula, Gabriela Santos de

Fungos encapsulados em matriz de pectina visando o controle de formigas-cortadeiras / Gabriela Santos de Paula, Renato Nallin Montagnolli, Mariana Altenhofen da Silva -- 2022.
69f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Ricardo Toshio Fujihara

Banca Examinadora: Ricardo Toshio Fujihara, Fernando Ribeiro Sujimoto, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, Renato Nallin Montagnolli

Bibliografia

1. Controle biológico de formigas-cortadeiras . I. Paula, Gabriela Santos de. II. Montagnolli, Renato Nallin. III. Silva, Mariana Altenhofen da. IV. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 Centro de Ciências Agrárias
 Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriela Santos de Paula, realizada em 29/08/2022.

Comissão Julgadora:

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO TOSHIO FUJIHARA**
 Data: 06/09/2022 15:52:26-0300
 Verifique em <https://verificador.it.br>

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara (UFSCar)

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDO RIBEIRO SUJIMOTO**
 Data: 06/09/2022 15:24:42-0300
 Verifique em <https://verificador.it.br>

Prof. Dr. Fernando Ribeiro Sujimoto (USP)

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Documento assinado digitalmente
 **ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI**
 Data: 05/09/2022 15:14:36-0300
 Verifique em <https://verificador.it.br>

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

Documento assinado digitalmente
 **RENATO NALLIN MONTAGNOLLI**
 Data: 06/09/2022 15:04:33-0300
 Verifique em <https://verificador.it.br>

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

Aos meus pais Simonal e Cristiane e meus irmãos e sobrinhos por todo amor, compreensão, respeito e apoio; e a todos os cientistas, pesquisadores e admiradores do controle biológico.

DEDICO

Agradecimentos

Concluir uma dissertação de mestrado, para mim é um grande privilégio. Depois de vários meses de dedicação exclusiva à estudos e laboratórios, estou finalizando mais uma etapa da vida acadêmica com o sentimento de dever cumprido. Durante esse processo, aprendi muito e me moldei para enfim me tornar uma pesquisadora. Além disso, pude contar com o apoio de pessoas excepcionais que se tornaram especiais e fundamentais para que eu alcançasse meus objetivos nessa caminhada.

Gostaria de agradecer, primeiramente e especialmente, ao Prof. Dr. Ricardo T. Fujihara, pela orientação, ensinamentos, parceria e confiança desde o início dessa caminhada, e em cada passo que permitiu a minha formação pessoal, e principalmente minha introdução ao campo da entomologia permitindo conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato N. Montagnolli, agradeço por aceitar-me como coorientada, me ensinando a transitar pela a área da microbiologia e me mostrando todos os “segredos” da área; sendo sempre presente em todas as etapas do mestrado e contribuindo com sugestões e ideias para os próximos passos.

A Prof. Dra. Mariana A. da Silva, agradeço imensamente pelos ensinamentos, perseverança, compreensão e auxílio na produção dos encapsulados, onde foi extremamente presente em cada produção, muitas vezes abrindo mão de sua vida pessoal para estar presente.

Vocês, são grandes exemplos de professores e pesquisadores! Sempre serei imensamente grata. Muito obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos, do qual sou grata. Agradeço aos professores, à Coordenação, à Secretaria do PPGAA e à turma do ano de 2020. Fazer parte desse Programa foi muito importante para minha vida pessoal e profissional.

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

Ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, por ceder o espaço para a realização dos experimentos.

Ao Grupo de Estudos e Pesquisa em Entomologia Geral (GEPEG), que sempre me auxiliou no que fosse necessário, e aos demais laboratórios: Laboratório de Biologia, Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC), Laboratório de

Microscopia e Caracterização de Materiais (LabMiCam), e ao Laboratório de Ensino de Química, pela disponibilidade e interesse em contribuir nas atividades do experimento e pela amizade.

Aos parceiros de mestrado e amigos, Biana e Mariano, com quem tive grandes momentos trabalhando juntos no experimento, nas disciplinas e no dia a dia.

Aos amigos, em especial: Matheus F., João Paulo, Leonardo, Isabela, Keli, Thamires, Carol Cunha e Carol Goulart, que me apresentou o programa, meu muito obrigada por toda presença, todo apoio, paciência, compreensão e incentivo durante esses dois anos e meio de mestrado. Vocês são muito especiais!

À banca examinadora: Dr. Fernando Ribeiro Sujimoto e, em especial, à Prof. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, agradeço por todas as contribuições. E também ao Prof. Dr. Rodrigo Marques (suplente) e ao Prof. Dr. Marcílio S. Barbosa (suplente), agradeço pelo aceite e pela disponibilidade.

E, finalmente, à minha família, à minha mãe Cristiane e meu pai Simonal, meus irmãos, Livia e Octávio, e meus sobrinhos queridos, por todo amor incondicional; por abraçarem todas as dificuldades e alegrias junto comigo nessa caminhada. Sou muito grata por estarem sempre comigo, amo vocês!

Agradeço ainda a todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma nessa trajetória.

Muito Obrigada!

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém
nunca pensou sobre algo que todo mundo vê”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A principal forma de controle de formigas-cortadeiras é por meio de iscas granuladas à base do ingrediente ativo sulfluramida, porém seu uso está associado a diversos danos ambientais. O controle biológico com fungos pode ser uma alternativa sustentável, mas que depende do desenvolvimento de veículos efetivos de transmissão. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento dos fungos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Trichoderma harzianum* encapsulados em matriz biopolimérica de pectina, visando o controle de formigas-cortadeiras e de seu fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* em escala de laboratório. Para tanto, foram realizados os seguintes procedimentos: i) avaliação da toxicidade tópica dos fungos comerciais sobre operárias de formigas-cortadeiras; ii) avaliação do crescimento de fungos comerciais sobre as operárias de formigas-cortadeiras; iii) produção dos encapsulados; iv) avaliação do crescimento de fungos encapsulados em meio de cultura; v) avaliação da atividade antagônica de fungos encapsulados sobre o fungo mutualista; vi) caracterização de fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV); vii) análise da aceitação de fungos encapsulados em subcolônias. Pelo teste tópico foi possível observar a estabilidade na sobrevivência das operárias do controle e do tratamento com *M. anisopliae* nas oito horas iniciais de avaliação. Nos demais tratamentos, a mortalidade já ocorreu na primeira hora. Após oito dias de avaliação, os tratamentos *T. harzianum*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* ocasionaram a maior mortalidade de operárias, e *B. bassiana*, a menor. Quanto ao crescimento de fungos comerciais sobre as operárias, nos tratamentos com as suspensões fúngicas, observou-se a germinação dos conídios na cutícula das formigas e contaminação horizontal do fungo mutualista. Após seis dias de avaliação, os fungos encapsulados plaqueados em meio de cultura BDA apresentaram crescimento similar aos fungos comerciais plaqueados. Após a oferta dos encapsulados durante cinco dias consecutivos observou-se baixos valores de carregamento em todos os tratamentos e no controle. Assim, pode-se concluir que o processo de encapsulamento não interferiu na esporulação e germinação dos fungos comerciais. Contudo, ainda se faz necessária novas avaliações para tornar os encapsulados mais atrativos para as formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: biopolímero, encapsulamento, controle microbiano, *Atta* spp.

ABSTRACT

The main form of control of leaf-cutting ants is through granulated baits based on the active ingredient sulfluramid, but its use is associated with several environmental damages. Biological control with fungi can be a sustainable alternative, but it depends on the development of effective transmission vehicles. Therefore, the objective of this work was to evaluate the development of the fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, and *Trichoderma harzianum* encapsulated in a biopolymeric pectin matrix, aiming at the control of leaf-cutting ants and their mutualistic fungus *Leucocoprinus gongylophorus* on a laboratory scale. For that, the following procedures were carried out: i) evaluation of the topical toxicity of commercial fungi on workers of leaf-cutting ants; ii) evaluation of the growth of commercial fungi on leaf-cutting ant workers; iii) production of the encapsulates; iv) evaluation of the growth of fungi encapsulated in culture medium; v) evaluation of the antagonistic activity of encapsulated fungi on the mutualistic fungus; vi) characterization of encapsulated fungi using scanning electron microscopy (SEM); vii) analysis of the acceptance of encapsulated fungi in subcolonies. By the topical test, it was possible to observe the stability in the survival of the workers of the control and the treatment with *M. anisopliae* during the eight initial hours of evaluation. In the other treatments, mortality already occurred in the first hour. After eight days of evaluation, the treatments *T. harzianum*, *M. anisopliae*, and *I. fumosorosea* caused the highest worker mortality, and *B. bassiana* the lowest. As for the growth of commercial fungi on the workers, in the treatments with the fungal suspensions, it was observed the germination of the conidia in the cuticle of the ants and horizontal contamination of the mutualistic fungus. After six days of evaluation, the encapsulated fungi plated in the PDA culture medium showed similar growth to the commercially plated fungi. After offering the encapsulated for five consecutive days, low loading values were observed in all treatments and the control. Thus, it can be concluded that the encapsulation process did not interfere with the sporulation and germination of commercial fungi. However, further evaluations are still necessary to make the encapsulated more attractive to leaf-cutting ants.

Keywords: biopolymer, encapsulation, microbial control, *Atta* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo de colônia de *Atta* sp. mantida no laboratório do GEPEG - CCA/UFSCar.....10
- Figura 2.** Etapas de processamento do encapsulado no modelo de gelificação iônica.....11
- Figura 3.** Encapsulados após 24 horas de secagem à 26°C em estufa com circulação de ar.....11
- Figura 4.** Plaqueamento de fungos encapsulados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. a) Placa de Petri contendo somente um encapsulado. b) Placa de Petri contendo 1g de encapsulados.....14
- Figura 5.** Crescimento pareado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. À esquerda: fungo mutualista *Leucocopinus gongylophorus*. No centro: fungo encapsulado.....15
- Figura 6.** Subcolônias com aproximadamente 200mL de jardim de fungos, operárias e formas jovens de *Atta laevigata*.....17
- Figura 7.** Avaliação da atratividade de encapsulados constituídos por matriz biopolimérica de pectina por operárias de *Atta sexdens*. a) Oferta dos encapsulados na câmara de forrageamento. b) Operárias transportando o encapsulado sobre o jardim de fungos de *Atta sexdens*.....18
- Figura 8.** Mortalidade (%) de operárias de *Atta laevigata* após oito horas de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum*.....19
- Figura 9.** Mortalidade (%) de operárias de *Atta laevigata* após oito dias de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum*.....20
- Figura 10.** Tratamento com o fungo *Beauveria bassiana*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando o crescimento de hifas no entorno do corpo e extrusão fúngica nas articulações das pernas das formigas.....21
- Figura 11.** Tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica na região do clipeo, mandíbulas e gáster. c) Operária de *Atta laevigata* com sinais de contaminação e perda de membros, como as pernas.....21
- Figura 12.** Tratamento com o fungo *Isaria fumosorosea*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica em diversas partes do corpo, como clipeo, mandíbulas e gáster.....22
- Figura 13.** Tratamento com o fungo *Trichoderma harzianum*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica em diversas partes do corpo, como clipeo, mandíbulas, gáster e pernas.....22

- Figura 14.** Crescimento visual dos fungos comerciais plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 144 horas de avaliação. A) *Beauveria bassiana*. B) *Trichoderma harzianum*. C) *Metarhizium anisopliae*. D) *Isaria fumosorosea*.....23
- Figura 15.** Crescimento visual de um encapsulado de *Beauveria bassiana* plaqueado em meio de cultura BDA com 48, 96 e 144 horas de observação.....24
- Figura 16.** Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Beauveria bassiana* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....24
- Figura 17.** Crescimento visual de um encapsulado de *Metarhizium anisopliae* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....25
- Figura 18.** Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Metarhizium anisopliae* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....25
- Figura 19.** Crescimento visual de um encapsulado de *Isaria fumosorosea* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....26
- Figura 20.** Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Isaria fumosorosea* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....26
- Figura 21.** Crescimento visual de um encapsulado de *Trichoderma harzianum* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....27
- Figura 22.** Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Trichoderma harzianum* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....27
- Figura 23.** Crescimento visual do fungo mutualista plaqueado em meio de cultura BDA. F1, F2 e F3: repetições.....28
- Figura 24.** Pareamento do encapsulado controle (sem fungo) ao centro e do fungo mutualista à direita plaqueados em meio de cultura BDA. C1, C2 e C3: repetições.....29
- Figura 25.** Crescimento visual do encapsulado de *Beauveria bassiana* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....29
- Figura 26.** Crescimento visual do encapsulado de *Metarhizium anisopliae* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....30
- Figura 27.** Crescimento visual do encapsulado de *Isaria fumosorosea* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....31
- Figura 28.** Crescimento visual do encapsulado de *Trichoderma harzianum* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.....32
- Figura 29.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando a matriz polimérica de pectina no encapsulado controle (sem fungo).....33
- Figura 30.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Beauveria bassiana*. a) Presença de *Beauveria bassiana* junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Beauveria bassiana*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Beauveria bassiana*.....34

Figura 31. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Metarhizium anisopliae*. a) Presença de *Metarhizium anisopliae*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Metarhizium anisopliae*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Metarhizium anisopliae*......35

Figura 32. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Isaria fumosorosea*. a) Presença de *Isaria fumosorosea*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Isaria fumosorosea*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Isaria fumosorosea*......36

Figura 33. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Trichoderma harzianum*. a) Presença de *Trichoderma harzianum*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Trichoderma harzianum*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Trichoderma harzianum*......37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Fungos comerciais selecionados e as respectivas concentrações e doses utilizadas, considerando o preparo para 50ml de suspensão.....12
- Tabela 2.** Mortalidade acumulada (%) e mediana (Md) de operárias de *A. laevigata* após oito dias de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Trichoderma harzianum*.....21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO TEÓRICA	2
2.1 As formigas-cortadeiras	2
2.2 Danos e prejuízos provocados por formigas-cortadeiras	3
2.3 Métodos de controle de formigas-cortadeiras	4
2.4 Controle microbiano de formigas-cortadeiras	5
2.5 Encapsulamento e biopolímeros no controle de pragas agrícolas	7
3 OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Manutenção das colônias de formigas-cortadeiras	9
4.2 Produção dos encapsulados	10
4.3 Avaliação da atratividade de encapsulados sem fungo por operárias de formigas-cortadeiras	11
4.4 Seleção dos fungos comerciais	12
4.5 Toxicidade tópica de fungos comerciais sobre operárias de formigas-cortadeiras.....	12
4.5.1 Avaliação do crescimento de fungos comerciais sobre as operárias de formigas-cortadeiras	13
4.6 Avaliação do crescimento de fungos encapsulados em meio de cultura	14
4.7 Avaliação da atividade antagônica de fungos encapsulados sobre o fungo mutualista	15
4.8 Caracterização de fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	16
4.9 Análise da aceitação de fungos encapsulados em subcolônias de <i>Atta laevigata</i>	16
5 ANÁLISE DOS DADOS	17
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1 Avaliação da atratividade de encapsulados sem fungo por operárias de formigas-cortadeiras	18
6.2 Toxicidade tópica de fungos comerciais sobre operárias de formigas-cortadeiras.....	18
6.3 Avaliação do crescimento de fungos comerciais sobre as operárias de formigas-cortadeiras	20
6.4 Avaliação do crescimento de fungos encapsulados em meio de cultura	23
6.5 Avaliação da atividade antagônica de fungos encapsulados sobre o fungo mutualista	29
6.6 Caracterização de fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
6.7 Análise da aceitação de fungos encapsulados em subcolônias de <i>Atta laevigata</i>	38
7 CONCLUSÕES	39
8 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras pertencem a subfamília Myrmicinae, tribo Attini, subtribo Attina, e são representadas pelos gêneros *Atta* (saúvas), *Acromyrmex* (quenquéns), e *Amoimyrmex*. Como todas as demais espécies de formigas, são insetos eussociais, pois apresentam divisão de trabalho e sobreposição de gerações; atividades coletivas que colaboram para sua sobrevivência (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; SCHOEREDER et al., 2012; BRITO et al., 2016; MUELLER et al., 2017).

A denominação de cortadeiras advém do fato de as operárias forragearem exclusivamente material vegetal fresco para o cultivo de seu fungo mutualístico *Leucocroprinus gongylophorus*, que serve de alimento exclusivo para suas larvas, e como complemento para as operárias (MUELLER et al., 2017). Por este motivo, são consideradas importantes pragas de plantios florestais, agrícolas e pastagens, pois causam danos que comprometem o desenvolvimento das plantas, gerando perdas significativas e grande impacto econômico (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; SCHOEREDER et al., 2012; BRITO et al., 2016).

Atualmente, o principal método de controle de formigas-cortadeiras é com o uso de iscas granuladas à base de ingredientes ativos, como a sulfluramida e fipronil. Contudo, apesar de se destacarem pela praticidade e eficácia, ambos são considerados pesticidas altamente perigosos e podem acarretar problemas à saúde humana e ao meio ambiente (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; FSC, 2012; ROQUES et al., 2013; KHAN et al., 2015).

Assim, a busca por métodos mais sustentáveis na tentativa de mitigar os danos causados pelas formigas-cortadeiras tem sido frequente (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014; ZANETTI et al., 2014). Fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, e antagonistas, como *Trichoderma harzianum*, apresentam potencial como agentes microbianos visando o controle de formigas-cortadeiras.

Entretanto, apesar da eficácia comprovada em laboratório, tem se conhecimento que fatores abióticos e bióticos podem interferir na sobrevivência e disseminação desses fungos, dificultando sua aplicação no campo. O encapsulamento com matrizes poliméricas tem se mostrado extremamente promissor, com potencial para garantir uma maior proteção e viabilidade aos fungos (NAGAMOTO et al., 2011; TRAVAGLINI et al., 2016; LOCATELLI et al. 2017).

Frente a importância de se desenvolver novos métodos de controle para promover uma agricultura mais sustentável, este trabalho pretende viabilizar a produção e o uso de fungos entomopatogênicos e antagonistas encapsulados em uma matriz polimérica de pectina para o controle de formigas-cortadeiras.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 As formigas-cortadeiras

As formigas (Hymenoptera, Formicidae) são insetos eussociais classificados em 17 subfamílias, 39 tribos, e aproximadamente 17.000 espécies existentes (ANTWEB, 2021; BOLTON, 2021). Na subfamília Myrmicinae, tribo Attini, subtribo Attina, encontram-se as formigas cultivadoras de fungos, um grupo monofilético constituído por 19 gêneros e 250 espécies descritas (SCHULTZ, 2020).

Dentre elas, os gêneros *Atta* Fabricius, 1804 (saúvas), *Acromyrmex* Mayr, 1865 (quenquéns), e *Amoimyrmex* Cristiano et al., 2020, popularmente conhecidos como formigas-cortadeiras, são encontrados exclusivamente no Novo Mundo e estão presentes em todos os ecossistemas brasileiros (FORTI et al., 2020; COLOMBARI et al., 2023). Juntos representam 53 espécies e 26 subespécies, sendo 17 espécies e uma subespécie do gênero *Atta*, 33 espécies e 22 subespécies de *Acromyrmex*, e três espécies de *Amoimyrmex* (BOLTON, 2021).

As formigas-cortadeiras podem proporcionar benefícios ecológicos, como no aumento da fertilidade e promoção do crescimento de árvores (FARJI-BRENER; SILVA, 1995), na modificação das propriedades físicas e químicas do solo, na dispersão de sementes (MOUTINHO et al., 2003; SOUSA-SOUTO; SCHOEREDER; SCHAEFER, 2007), além do papel fundamental que desempenham na formação da ciclagem biogeoquímica (SOPER et al., 2019).

Porém, são reconhecidas principalmente por sua intensa herbivoria, pois utilizam material vegetal fresco, como folhas, ramos e flores, para o cultivo de seu fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (Leucocoprini, Agaricales) (MUELLER et al., 2017), alimento exclusivo das larvas, e complemento para as operárias, cuja alimentação se baseia em líquidos extraídos das folhas durante a coleta e processamento de substrato (ANDRADE et al., 2002; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

Por esta razão, são consideradas importantes pragas de ecossistemas agrícolas e florestais em várias regiões do Brasil e da América (MATRANGOLO et al., 2010;

BRITTO et al., 2016), causando o desfolhamento excessivo e comprometendo o desenvolvimento das plantas, com perdas significativas e de grande impacto econômico (MONTROYA-LERMA et al., 2012; MUELLER et al., 2018).

2.2 Danos e prejuízos provocados por formigas-cortadeiras

É sabido que as espécies de formigas-cortadeiras possuem predileções por três tipos de substratos: as que cortam apenas plantas de folhas largas, as especialistas em gramíneas e aquelas que usam ambos os materiais vegetais (AMARAL et al., 2020; DIONISI; OZIER-LAFONTAINE; LAPLACE, 2021).

Vinha et al. (2020) estimam que os gastos globais com danos provocados por formigas-cortadeiras atinjam bilhões de dólares anualmente, e são ainda mais agravados no mercado de florestas plantadas, onde o manejo deve ser feito antes que se atinja o nível de dano econômico, calculado entre 13,4 a 39,2 m² de ninhos/ha. Nas culturas de *Eucalyptus* e *Pinus* são gastos, somente com o manejo de formigas-cortadeiras, aproximadamente 30% dos custos, ao ponto que uma única colônia pode reduzir o crescimento anual das árvores entre 5% a 10% (SOUZA; ZANETTI; CALEGARIO, 2011; ZANETTI et al., 2014).

Nas Savanas da Venezuela, estudos indicam a perda de 14% da produção de madeira em plantios jovens de *Pinus caribaea* var. hondurenses, quando atacadas por *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), um número médio de 5 ninhos/ha. Além disso, a perda pode atingir 50% do volume em áreas com densidade superiores à 30 ninhos/ha (HERNÁNDES; JAFFÉ, 1995). Em Trinidad, populações de *Acromyrmex octospinosus* (Reich, 1793) ocasionaram a morte de 6 a 17% das árvores em pomares de cacau e citros (DIONISI; OZIER-LAFONTAINE; LAPLACE, 2021). Dados de 1968 indicaram perdas médias anuais de US\$ 250.000 devido às atividades de *A. octospinosus* (BOULOGNE; LAFONTAINE; LORANGER-MERCIRIS, 2014).

Na cultura de cana-de-açúcar, as perdas pelo ataque de formigas-cortadeiras podem chegar à 1,74 toneladas de cana/colônia o que representa uma média de 4 toneladas de cana/ha e perda da produção de até 383,5 kg açúcar/ha (AMANTE, 1972).

Dessa forma, os problemas associados às formigas-cortadeiras têm suscitado o desenvolvimento de diversos métodos de controle, associados ao custo operacional, condições climáticas e implicações que podem causar ao ambiente. Dentre eles, podem ser citados o controle mecânico, o cultural, o biológico e o químico, sendo este

efetivamente utilizado desde a década de 50 do século passado (BOARETTO; FORTI, 1997).

2.3 Métodos de controle de formigas-cortadeiras

A atuação como um superorganismo com alta complexidade de organização social, estrutura colonial, intenso forrageamento, cultivo do fungo mutualístico, rainha de longa vida (indivíduo-chave) e várias adaptações, como a higiene do ninho, são fatores responsáveis pela alta eficiência e sobrevivência desses insetos. Todavia, estes motivos são os grandes dificultadores do manejo e controle das formigas-cortadeiras (DELLA LÚCIA; GRANDA; GUEDES, 2013, ZANUNCIO et al., 2016; DONATO et al., 2021).

A aplicação de iscas tóxicas ou formicidas/pesticidas para o controle de formigas-cortadeiras é considerada a técnica mais prática, eficiente e econômica dentre as utilizadas, pois são processadas pelas operárias assemelhando-se aos comportamentos realizados com os substratos vegetais (ZANETTI et al., 2003). A sulfluramida ainda é o ingrediente ativo mais utilizado, pois apresenta como principais características modo de ação lento e mortalidade em baixas concentrações (NAGAMOTO; FORTI; RAETANO, 2007; BRITTO et al., 2016; SILVA et al., 2015; CATALANI, 2019). Apesar de eficiente, é precursora do composto químico perfluorooctano-1-sulfonato (PFOS), extremamente persistente no ambiente e bioacumulativo nas teias alimentares (KEY et al., 1997; ZABALETA et al., 2018).

Por isso, existe uma forte pressão do mercado para reduzir o uso de pesticidas químicos para o controle de formigas-cortadeiras em povoamentos florestais (SILVA et al., 2020) e nas demais áreas cultivadas. Visando reduzir o uso de produtos químicos considerados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), o Plano Nacional de Implementação (NIP, na sigla em inglês), da Convenção de Estocolmo de 2015, incluiu a sulfluramida em seu anexo B, sendo considerada como um poluente orgânico permanente e com perspectivas de eliminação de uso (NIP, 2015).

Além da sulfluramida, o fipronil também é outro ingrediente ativo utilizado para o controle de formigas-cortadeiras. Este é considerado altamente perigoso ao meio ambiente e a saúde humana, podendo causar efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e citotóxicos sendo ainda desregulador hormonal, provocando alterações em sistemas reprodutivos e endócrinos em animais e humanos (DAS et al., 2006; ROQUES et al., 2013; ROMERO et al., 2016; ZANUNCIO et al., 2016). Assim, o FSC

(Forest Stewardship Council – Conselho de Manejo Florestal) listou a sulfluramida e o fipronil como pesticidas “altamente perigosos” (FSC, 2015).

Logo, com a consciência dos efeitos negativos provocados por estes agroquímicos, e a restrição das certificadoras florestais, houve um aumento na busca por novos métodos para o controle de formigas-cortadeiras, que sejam eficientes, porém sustentáveis, e o uso de agentes biológicos se destaca como uma alternativa (FSC, 2012; ZANUNCIO et al., 2016; TAVARES et al., 2019). O fato dos ninhos de formigas-cortadeiras abrigarem uma diversidade de outros microrganismos é um aspecto a ser considerado, pois alguns deles podem apresentar potencial de controle, porém é necessário um maior entendimento de como as formigas-cortadeiras interagem com os mesmos (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

2.4 Controle microbiano de formigas-cortadeiras

A associação formiga-fungo beneficia a ambos os organismos. O fungo *L. gongylophorus* possui na porção terminal de seus filamentos estruturas de reserva nutritivas, ricas em glicogênio, chamadas gongilídios. Em contrapartida, o fungo é cultivado em um ambiente favorável para o seu desenvolvimento e, dentro do possível, livre de competidores e patógenos (NASCIMENTO, 2017), pois as formigas realizam processos de limpeza chamados de *autogrooming* (autolimpeza) e *allogrooming* (limpeza entre diferentes indivíduos), que contribuem para a defesa da colônia por meio da disseminação de secreções antimicrobianas produzidas por suas glândulas metapleurais (RODRIGUES et al., 2008; OTTI et al., 2014).

Entretanto, por não se tratar de um ambiente estéril, no interior dos ninhos de formigas-cortadeiras é frequente a presença de fungos filamentosos, sendo a maioria deles de solo, e já reconhecidos pela alta patogenicidade em diferentes estágios de desenvolvimento (ovos, larvas, pupas e adultos). As rainhas, inclusive, podem adquirir fungos patogênicos e/ou saprófagos após a revoada (RODRIGUES et al., 2009; CARDOSO et al., 2020).

Estes fungos produzem enzimas, como proteases, aminopeptidases, esterases e quitinases, que modificam o exoesqueleto do inseto, permitindo a fixação de suas hifas no tegumento (ST. LEGER et al., 1986; BIDOCHKA; SMALL; SPIRONELLO, 2005). Algumas espécies de fungos, como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin,

1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae), conseguem aderir, germinar e penetrar no tegumento dos insetos entre 48 a 72 horas após o contato (FERRON 1978). Além disso, dependendo da espécie fúngica, existem locais específicos no qual ocorre maior adesão de conídios, com consequente infecção e morte do inseto (TRAVAGLINI et al., 2016).

Em testes tópicos com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, verificou-se que estes fungos foram altamente patogênicos em soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758), causando elevadas taxas de mortalidade (80%), e levando às formigas à morte nos quatro primeiros dias após a aplicação (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005). Mota Filho et al. (2021) verificou que a pulverização direta de fungos, como *B. bassiana*, nos jardins de fungos das colônias de *Atta sexdens* apresentou promissoras respostas de controle, embora também tenha destacado que existam dificuldades quanto ao uso de tecnologias de aplicação.

A espécie *Isaria fumosorosea* Wize, 1904 (Hypocreales: Clavicipitaceae), linhagem IBTOT 25, também é citada como agente patogênico às operárias de *A. sexdens*, causando mortalidade significativa após duas aplicações quando testado em forma de isca granulada (CARDOSO, 2012). Cardoso et al. (2020) ao isolarem fungos entomopatogênicos, como *I. fumosorosea* de fêmeas aladas de *Atta*, verificaram altas taxas de crescimento micelial *in vitro*, indicando que possui potencial como agente de controle biológico contra formigas-cortadeiras.

Além de fungos filamentosos entomopatogênicos, fungos como *Trichoderma* spp. (Hypocreales: Hypocreaceae) também têm sido explorados, pois já se tem conhecimento sobre seu potencial antagonista sobre *L. gongylophorus*. Acredita-se que o modo de interação entre os dois fungos gere produção de substâncias antifúngicas, ou até mesmo tóxicas, que impediriam o crescimento micelial do fungo mutualista (AUGUSTIN, 2011; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Além disso, o gênero é considerado seguro e não agressivo ao meio ambiente e a organismos não-alvo (SILVA et al., 2006).

Em testes *in vitro*, Silva et al. (2006), Nascimento et al. (2017) e Rocha et al. (2017), obtiveram resultados significativos na inibição do fungo mutualista por espécies de *Trichoderma*. Castrillo et al. (2016) verificaram que, quando aplicado diretamente nas colônias, *Trichoderma koningiopsis* Samuels, C. Suarez & H.C. Evans, 2006, provocou inibição do crescimento micelial de *L. gongylophorus*.

Além disso, alguns trabalhos também demonstraram a ação do gênero *Trichoderma* sobre as operárias. Lopez e Orduz (2003), ao aplicarem *Trichoderma viride* Pers.ex. S.F.

Gray, 1801, sobre o jardim de fungos de colônias de *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758), observaram rápidas e descontroladas mudanças comportamentais das operárias, com posterior morte das mesmas e do fungo mutualista. Stefanelli et al. (2021) testaram a patogenicidade de *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) sobre larvas, pupas e operárias de *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908, levando-as a morte rápida, e reforçando seu potencial patogênico sobre as formigas.

Todavia, apesar da eficácia comprovada em laboratório, existe uma grande dificuldade quanto ao uso desses fungos em campo e em escala comercial (NAGAMOTO et al., 2011). Folgarait, Goffré e Osorio (2020), ao avaliarem a ação de três cepas de *B. bassiana* em forma de iscas sobre operárias de *Acromyrmex*, observaram que todas foram patogênicas. Porém, cabe ressaltar que os ninhos de quenquês são relativamente pequenos, diferentemente dos ninhos adultos de *Atta*, que possuem centenas a milhares de túneis e câmaras subterrâneas (CAMARGO; LOPES; FORTI, 2013). Além disso, os cuidados cooperativos e a divisão de trabalho, possibilitam a realização de atividades coletivas que contribuem para o sucesso de sua sobrevivência (DELLA LUCIA, 2011).

Por esta e outras razões, um dos maiores desafios no uso de fungos ou outros agentes microbianos para o controle de formigas-cortadeiras é o desenvolvimento de um veículo eficiente de transporte e capaz de contaminar a colônia (TRAVAGLINI et al., 2016). Fatores abióticos, como temperatura elevada, radiação ultravioleta, umidade e chuva, podem causar alterações de DNA, diminuir a qualidade dos conídios e até mesmo interferir em processos de produção enzimáticas (BRAGA et al., 2001a; 2001b; 2001c; CHELICO; KHACHATOURIANS, 2008; KIM; ROH, 2010), influenciando na sobrevivência e disseminação eficiente desses microrganismos.

2.5 Encapsulamento e biopolímeros no controle de pragas agrícolas

Em virtude da necessidade do desenvolvimento de novos métodos que sejam eficazes no transporte e disseminação de agentes biológicos visando o controle de insetos-praga, novas técnicas, como o encapsulamento, têm permitido avanços em laboratório. O encapsulamento é amplamente utilizado na medicina e na indústria de fertilizantes para a liberação controlada de compostos de interesse (DE OLIVEIRA et al. 2018; QIU et al., 2018).

No controle de pragas agrícolas, o encapsulamento permite diversas vantagens, tais como: aumentar a estabilidade e viabilidade de um agente de controle microbiano

pelo microambiente formado dentro da cápsula; proteger o agente de fatores bióticos e abióticos, como contaminações, antagonistas do solo, variações de temperatura, falta de umidade, luz ultravioleta e estresse mecânico, perdurando assim sua atividade metabólica por maiores períodos de tempo; aumentar o potencial de armazenamento e a viabilidade em campo, favorecendo o lado econômico da produção e a aplicação; e minimizar os riscos de intoxicação e os danos ambientais (VEMMER; PATEL, 2013; RODRIGUES et al., 2017; GUSTANI et al., 2021; LEDO et al., 2021).

Neste contexto, trabalhos como os de Travaglini et al. (2017), Locatelli et al. (2017), Silva et al. (2020) e Gustani et al. (2021), demonstraram que o método de encapsulamento é promissor, e pode garantir uma maior proteção e viabilidade aos microrganismos, como fungos entomopatogênicos e antagonistas, podendo ser transportados pelas operárias forrageiras até o interior dos ninhos. Os conídios, ao serem encapsulados por biopolímeros, podem ser liberados pelo processo de relaxação, por meio da hidratação do polímero ou após o mesmo sofrer processos de degradação, sendo ela por reação com oxigênio, luz, temperatura ambiente e, sobretudo, degradação enzimática por microrganismos presentes no solo (RODRIGUES et al., 2017).

Dentre os potenciais biopolímeros para o encapsulamento de fungos visando o controle de formigas-cortadeiras, a pectina é um polissacarídeo complexo, solúvel em água, formado predominantemente por resíduos do ácido galacturônico, extraída principalmente de resíduos de frutas cítricas, e amplamente utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica como agente gelificante e estabilizante, por sua capacidade de formar gel na presença de íons Ca^{2+} em ampla faixa de pH (BRACCINI; PÉREZ; 2001; NISHIJIMA et al., 2009). A pectina possui propriedades como biodegradabilidade, e é altamente compatível com outras substâncias químicas, possibilitando máxima proteção ao material ativo (fungos) contra condições adversas, como raios ultravioleta, pH, oxigênio, oscilações de temperatura e ingredientes reativos, além de possuir baixo custo devido à sua abundância (KISTLER, 1931; HÜSING, 1998; WU et al., 2012).

Sendo assim, o uso de uma matriz biopolimérica de pectina pode viabilizar a produção de encapsulados que protejam, da ação de fatores abióticos e bióticos, microrganismos com potencial entomopatogênico e/ou antagonista para o controle de formigas-cortadeiras, promovendo uma agricultura mais sustentável.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do encapsulamento dos fungos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Trichoderma harzianum* em matriz biopolimérica de pectina, visando o controle de formigas-cortadeiras e de seu fungo mutualístico *L. gongylophorus* em escala de laboratório.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a toxicidade tóxica e o crescimento dos fungos supracitados sobre operárias de formigas-cortadeiras;
2. Desenvolver encapsulados em matriz biopolimérica de pectina, suco de laranja e polpa cítrica contendo os isolados fúngicos;
3. Mensurar o crescimento dos isolados encapsulados em meio de cultura (BDA);
4. Avaliar o potencial antagonista dos isolados encapsulados sobre o fungo mutualista das formigas-cortadeiras;
5. Caracterizar os fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
6. Avaliar o transporte e a incorporação dos fungos encapsulados no jardim de fungos de subcolônias de formigas-cortadeiras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

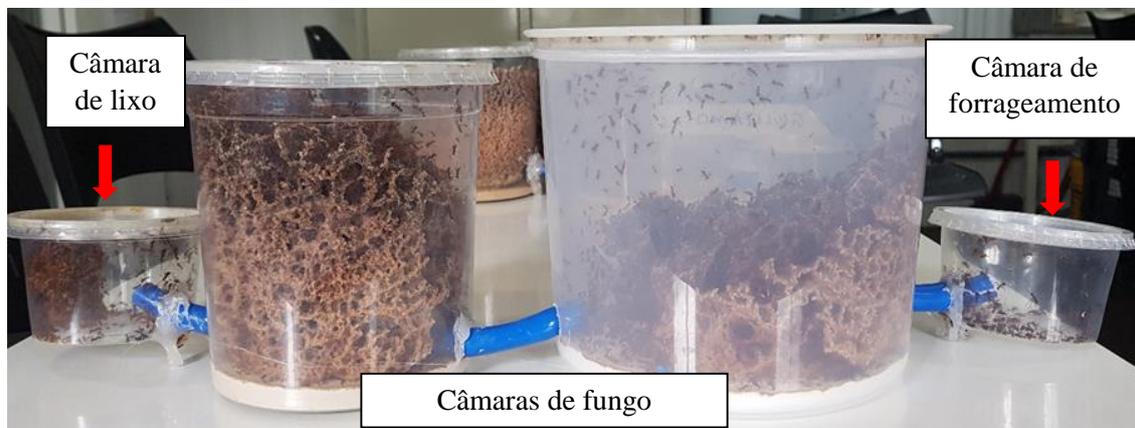
4.1 Manutenção das colônias de formigas-cortadeiras

Colônias de *Atta* spp. (entre dois a três anos de idade) estão sendo mantidas no Laboratório do GEPEG (Grupo de Estudos e Pesquisa em Entomologia Geral), CCA/UFSCar, em sala climatizada ($T = 24 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{UR} = 70 \pm 10\%$), no interior de recipientes plásticos, que correspondem à câmara de fungo, com o fundo preenchido com uma camada de 1 cm de gesso para a manutenção da umidade.

Além disso, tubos plásticos foram conectados em outros dois recipientes (250 mL cada), que correspondem às câmaras de forrageamento e de lixo, que é limpa periodicamente (Figura 1). Recebem, em dias alternados, folhas frescas de ligustro [*Ligustrum lucidum* W.T. Aiton (Lamiales: Oleaceae)] e pedaços de maçã; aveia laminada é ofertada uma vez por semana. As folhas e a aveia são utilizadas pelas formigas

como substrato para a manutenção do fungo mutualístico, e as maçãs servem como suplemento alimentar e de líquidos para as formigas.

Figura 1. Exemplo de colônia de *Atta* sp. mantida no laboratório do GEPEG - CCA/UFSCar.



Fonte: O Autor (2021).

4.2 Produção dos encapsulados

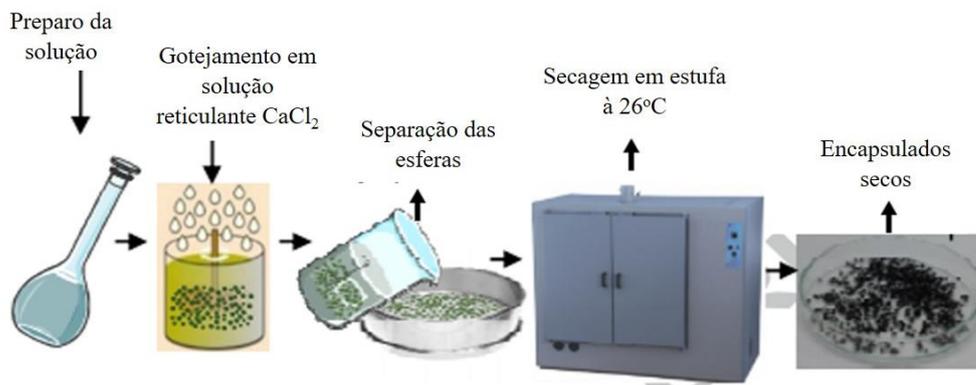
O protocolo para a produção dos encapsulados foi adaptado de ROCHA et al. (2020) (Processo FAPESP 2019/12657-0). Foram produzidos no LABMAC - Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle - CCA/UFSCar, pelo método de gelificação iônica, que consiste em misturar uma solução polimérica gotejada sobre uma solução reticulante. Em comparação com outras técnicas, é um método descrito como simples, de fácil reprodução, baixo custo e eficaz (PATIL et al., 2010; SILVA; ANDRADE; NEVES, 2012).

Os encapsulados foram produzidos a partir de uma solução de pectina (3,5g), água destilada (150 ml), suco de laranja concentrado sem açúcar (50ml) e polpa cítrica seca e triturada (4,0g), sendo os dois últimos utilizados para a impregnação do aroma cítrico, atrativo para as formigas. É importante ressaltar que a proporção de sólidos foi devidamente ajustada de acordo com o acréscimo das soluções fúngicas para que não perdessem a consistência gelatinosa.

Todos os componentes foram colocados em um béquer à temperatura de 25°C em agitador mecânico (1.000 rpm) por 30 minutos. A solução polimérica resultante foi gotejada em solução reticulante (200ml) de CaCl₂ (2, 5 e 10% m/v) sob agitação magnética. O gotejamento foi feito através de bomba peristáltica com mangueira acoplada de silicone ($\varnothing = 0,5$ mm). As esferas foram mantidas na solução reticulante por 30

minutos para estabilização (Figura 2), e então foram recolhidas com o auxílio de peneira, lavadas em água destilada e transferidas para placas de Petri para secagem em estufa com circulação de ar à 26°C por 24 horas (Figura 3).

Figura 2. Etapas de processamento dos encapsulados pela técnica de gelificação iônica.



Fonte: Adaptado e traduzido de Locatelli et al. (2017).

Figura 3. Encapsulados após 24 horas de secagem à 26°C em estufa com circulação de ar.



Fonte: O Autor (2022).

4.3 Avaliação da atratividade de encapsulados sem fungo por operárias de formigas-cortadeiras

Para verificar se os encapsulados sem fungo (controle) seriam aceitos e transportados pelas operárias de *A. sexdens* foi realizado um experimento preliminar. Foram selecionadas quatro colônias: duas com cerca de dois anos de idade e outras duas

com aproximadamente três anos. As colônias permaneceram por um período de 24 horas sem receber folhas, para estimular o forrageamento e evitar a influência de outros substratos (NORONHA et al., 2011).

Antes da oferta dos encapsulados, as câmaras de lixo foram limpas para facilitar a observação da possível rejeição dos encapsulados. Foram ofertadas, na câmara de forrageamento, 10 unidades (encapsulados) por colônia durante 30 minutos. A oferta foi realizada por três dias consecutivos para confirmação de possível rejeição ao longo dos dias.

4.4 Seleção dos fungos comerciais

Foram selecionados, a partir da base de dados do Agrofit (http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons), os fungos entomopatogênicos comerciais *B. bassiana* (cepa ESALQ PL63), *M. anisopliae* (cepa ESALQ E9), *I. fumosorosea* (cepa ESALQ 1296), e o fungo *T. harzianum* (cepa ESALQ 1306), com ação fungicida e nematicida. Cada suspensão foi preparada em um béquer (50ml) de acordo com as recomendações dos fabricantes para pulverização costal, e posteriormente agitadas (Tabela 1).

Tabela 1. Fungos comerciais selecionados e as respectivas concentrações e doses utilizadas, considerando o preparo para 50ml de suspensão.

FUNGOS COMERCIAIS	CONCENTRAÇÃO	DOSES (50ML)
<i>Beauveria bassiana</i> (cepa ESALQ PL63)	1 x 10 ⁸ conídios viáveis/g	0,66g
<i>Metarhizium anisopliae</i> (cepa ESALQ E9)	1,39 x 10 ⁸ conídios viáveis/g	0,625g
<i>Isaria fumosorosea</i> (cepa ESALQ 1296)	1,0 x 10 ⁹ UFC/mL conídios viáveis/g	0,2ml
<i>Trichoderma harzianum</i> (cepa ESALQ 1306)	2,0 x 10 ⁹ conídios viáveis p/ml	6,475 ml

Fonte: O Autor (2022).

4.5 Toxicidade tóxica de fungos comerciais sobre operárias de formigas-cortadeiras

Foram coletadas 500 operárias de *A. laevigata* oriundas de oito colônias com aproximadamente três anos de idade. Optou-se por esta espécie, ao invés de *A. sexdens*, devido à melhor condição das colônias para o experimento. Cada repetição foi representada por um recipiente plástico de 250 mL com o fundo coberto por 0,8 cm de gesso para manutenção da umidade (NAGAMOTO et al., 2004); e 12 operárias

(forrageiras) com largura de cápsula cefálica de $2,0 \pm 0,2$ mm, valor dentro do proposto por Wilson (1980). O gesso foi umedecido com água destilada previamente à inclusão das operárias.

Após 24 horas, foram retiradas duas operárias, incluindo as mortas ou moribundas. As operárias foram então mergulhadas por dois segundos (STEFANELLI et al., 2021) nas respectivas suspensões e no controle (água destilada). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *T. harzianum* (Tabela 1), além do controle, e com dez repetições, sendo cada uma composta por um grupo de 10 indivíduos.

Foram realizadas duas observações: nas primeiras oito horas, e por um período de oito dias, sendo realizada a contagem do número de operárias mortas/hora ou dia em cada repetição. No quinto dia foi ofertado a cada repetição uma porção de fungo ($\approx 1 \text{ cm}^3$) de sua respectiva colônia para manutenção dos hábitos alimentares das operárias.

A taxa de mortalidade das operárias foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925), visando reduzir a influência de fatores, como a idade do inseto e a mortalidade natural, e desta forma, ser possível calcular a taxa de sobrevivência de cada tratamento. Neste caso, o controle foi utilizado para a obtenção da mortalidade.

$$\text{MCoorr} = [(MT - MC) / (100 - MC)] * 100 \quad (1)$$

onde: MCoorr: Mortalidade corrigida (%); MT: Mortalidade do tratamento (%); MC: Mortalidade do controle (%).

4.5.1 Avaliação do crescimento de fungos comerciais sobre as operárias de formigas-cortadeiras

O objetivo foi confirmar se os fungos comerciais (tratamentos) utilizados no teste tópico iriam se desenvolver no tegumento/corpo das operárias de *A. laevigata*. No oitavo dia de avaliação do teste tópico, foram separadas aleatoriamente três operárias de cada tratamento, incluindo o controle, juntamente com a porção do fungo mutualista.

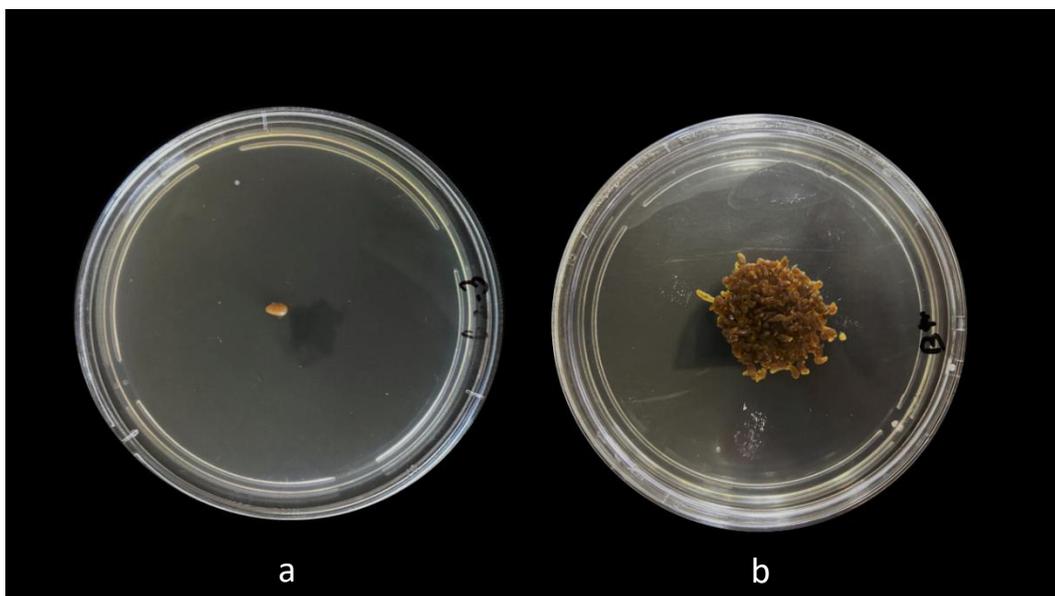
Foi realizada a confirmação visual da morfologia do crescimento fúngico, de cada tratamento, bem como análises de dados qualitativos.

A análise foi baseada na observação de caracteres morfológicos das colônias, associada a microscopia óptica.

4.6 Avaliação do crescimento de fungos encapsulados em meio de cultura

A produção dos encapsulados contendo os fungos seguiu o mesmo método descrito no item 4.2, com a única diferença da adição posterior das suspensões fúngicas. Os encapsulados foram selecionados aleatoriamente e plaqueados em meio de cultura BDA para verificar o crescimento fúngico ao longo de seis dias. A fim de se obter um resultado comparativo de crescimento, considerando 1g a massa média ofertada em ensaios experimentais com colônias/subcolônias acima de 300g de jardim de fungos, foram realizados dois procedimentos. No primeiro, foi inoculado somente um encapsulado de cada tratamento em placa de Petri contendo meio BDA e, no segundo, 1g de encapsulados de cada tratamento (Figura 4), totalizando doze repetições em cada procedimento por tratamento.

Figura 4. Exemplificação de plaqueamento de encapsulados fungico em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. a) Placa de Petri contendo somente um encapsulado. b) Placa de Petri contendo 1g de encapsulados.



Fonte: O Autor (2022).

As placas de Petri contendo os fungos encapsulados foram identificadas, lacradas e armazenadas em B.O.D. a 28°C. No Laboratório de Biologia do CCA/UFSCar foi realizada a avaliação diária do crescimento dos fungos encapsulados por um período de 144 horas (seis dias). As análises foram realizadas qualitativamente e quantitativamente por meio de observação visual e fotografias; a área de crescimento foi quantificada em

cm² com o uso do software ImageJ (versão 1.53, National Institutes of Health) e convertida em porcentagem.

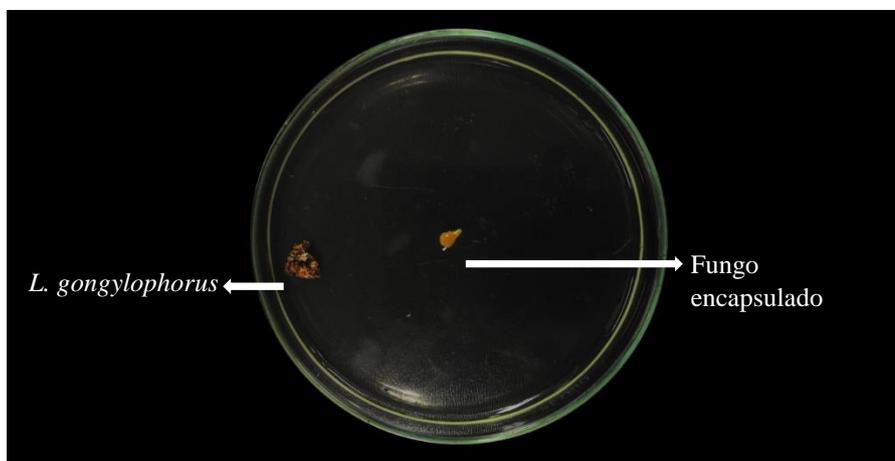
4.7 Avaliação da atividade antagônica de fungos encapsulados sobre o fungo mutualista

A potencial atividade antagônica dos fungos encapsulados sobre o fungo mutualista foi realizada *in vitro* por meio de crescimento pareado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Figura 5), adaptada da metodologia de Rocha et al. (2017).

Cada um dos quatro tratamentos consistiu em um confronto FM (Fungo Mutualista) x FE (Fungo Encapsulado), com três repetições. Foi realizado ainda o confronto FM x EC (encapsulado controle - sem fungo) para a comparação do crescimento dos fungos em confronto direto. Foram feitas também cinco placas contendo somente o FM para servir de comparativo com os demais tratamentos, uma vez que o crescimento dos fungos encapsulados já haviam sido analisados.

As análises qualitativas por meio de observação visual e fotografias foram realizadas por 144 horas (seis dias). A área de crescimento foi quantificada em cm² com o uso do software ImageJ e convertida em porcentagem. As placas foram mantidas em B.O.D. à 28°C na ausência de luz. Como os fungos encapsulados apresentaram crescimento diferenciado, as medições foram realizadas a cada 48 horas por 144 horas (seis dias) após a inoculação para melhor concretização dos resultado.

Figura 5. Crescimento pareado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. À esquerda: fungo mutualista *Leucocropinus gongylophorus*. No centro: fungo encapsulado.



Fonte: O Autor (2022).

4.8 Caracterização de fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os seis dias de avaliação dos encapsulados plaqueados (item 4.6), foram separados aleatoriamente um exemplar de cada tratamento, incluindo o controle, e transportados ao LabMiCam - CCA/UFSCar para análises no MEV – Microscópio de Varredura Eletrônica (Thermo Scientific Prisma E®).

A metodologia foi adaptada de Castro (2002), não sendo necessária a cristalização das amostras. Os fungos encapsulados foram preparados frescos por meio de raspagem com o auxílio de bisturi, e esfregados em fita de carbono sob os stabs (suporte para as amostras), pois a quantidade necessária para as análises foi mínima, não sendo viável a utilização de todo o encapsulado.

As imagens foram obtidas por meio de ação de alto vácuo do equipamento, o que permitiu melhor qualidade de imagem com pouco comprometimento das amostras. As avaliações do encapsulado controle exigiram o uso do encapsulado inteiro, pois como não havia crescimento fúngico, não foi possível ser feito o esfregaço.

Durante as análises, também foram utilizadas as imagens do plaqueamento dos fungos comerciais puros (preparados em BDA - Agar Batata Dextrose – KASVI®) conforme concentração indicada em 4.4), com a intenção de servirem como meios comparativos do desenvolvimento dos fungos, além do suporte literário de Samson, Evans e Latge (1988).

4.9 Análise da aceitação de fungos encapsulados em subcolônias de *Atta laevigata*

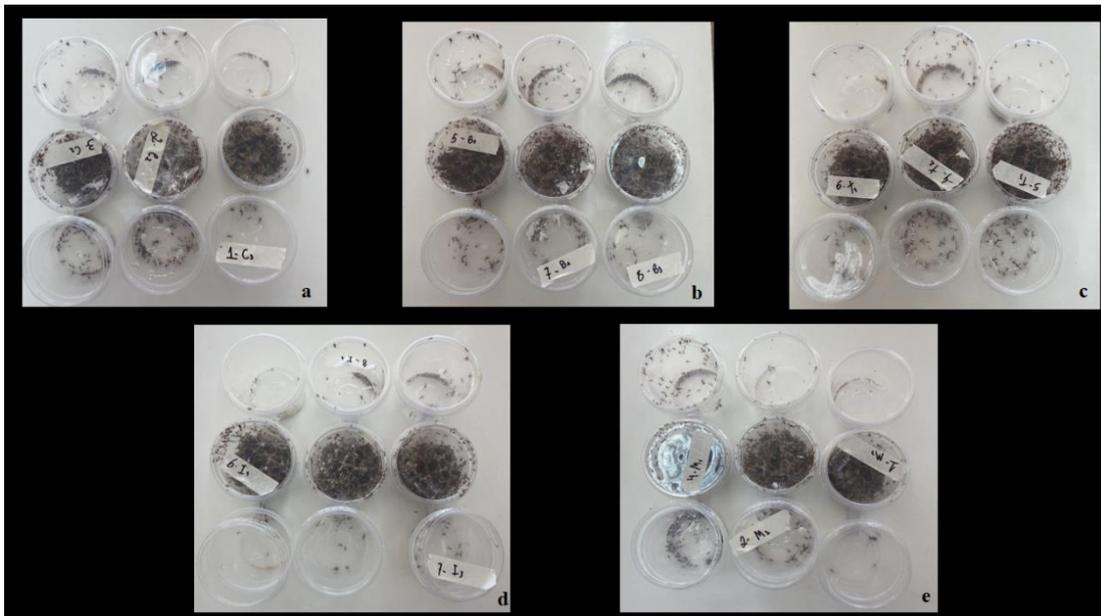
Foram selecionadas oito colônias de *A. laevigata* com aproximadamente 4L de jardim de fungos para a montagem das subcolônias, de acordo com a metodologia de Jaccoud et al. (1999). De cada colônia, foram extraídos cerca de 200mL de jardim de fungos, operárias de diversas castas e formas jovens, sendo acondicionados em recipientes plásticos de 250mL (Figura 6) e mantidas em condições de laboratório conforme descrito no item 4.1, onde passaram por um período de 7 dias para a estabilização (regulagem de hábitos comuns- corte de substratos, limpeza da colônias, etc.) no novo meio.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (fungos encapsulados), além do controle (encapsulado sem fungo), e três repetições (subcolônias).

O carregamento e a incorporação dos fungos encapsulados foram analisados pelo método descrito por Cardoso et al. (2012).

Antes da oferta, as subcolônias permaneceram por um período de 24 horas sem receber folhas, também para estimular o forrageamento e evitar a influência de outros substratos, como descrito no item 4.3 (NORONHA et al., 2011). Em cada subcolônia, 0,5g de encapsulados foram ofertados na câmara de forrageamento durante três horas, onde o transporte foi avaliado, e as porcentagens de encapsulados carregados foram registradas. Também foi avaliado se o material foi incorporado no jardim de fungos ou rejeitado na câmara de lixo.

Figura 6. Subcolônias com aproximadamente 200mL de jardim de fungos, operárias e formas jovens de *Atta laevigata*.



Fonte: O Autor (2022).

5 ANÁLISE DOS DADOS

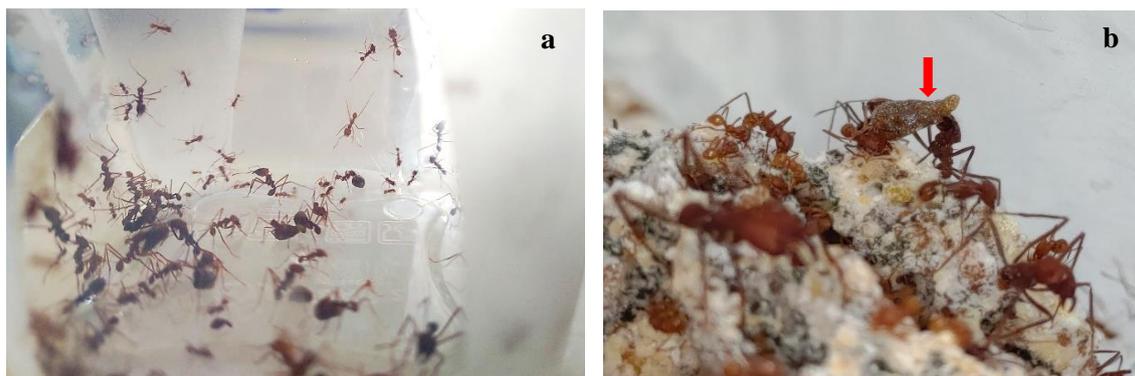
Para determinar a significância das diferenças quanto à mortalidade de operárias, os respectivos dados foram mensurados em análise de variância com comparação das médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Caso não apresentassem normalidade, foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman. As médias foram então comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) (WINER et al., 1991). Todas as análises foram realizadas por meio do software SigmaPlot 14 (Systat Software Ins, San Jose, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da atratividade de encapsulados sem fungo por operárias de formigas-cortadeiras

Por meio deste experimento preliminar, foi possível verificar que, independentemente da idade da colônia, todos os encapsulados foram transportados pelas operárias de *A. sexdens* nos três dias consecutivos de oferta. Ainda, observou-se que estes foram incorporados no jardim de fungos e não foram rejeitados posteriormente, demonstrando a viabilidade de uso da matriz biopolimérica de pectina em conjunto com o suco de laranja e a polpa cítrica (Figura 7).

Figura 7. Avaliação da atratividade de encapsulados constituídos por matriz biopolimérica de pectina por operárias de *Atta sexdens*. a) Oferta dos encapsulados na câmara de forrageamento. b) Operárias transportando o encapsulado sobre o jardim de fungos de *Atta sexdens*.



Fonte: O Autor (2021).

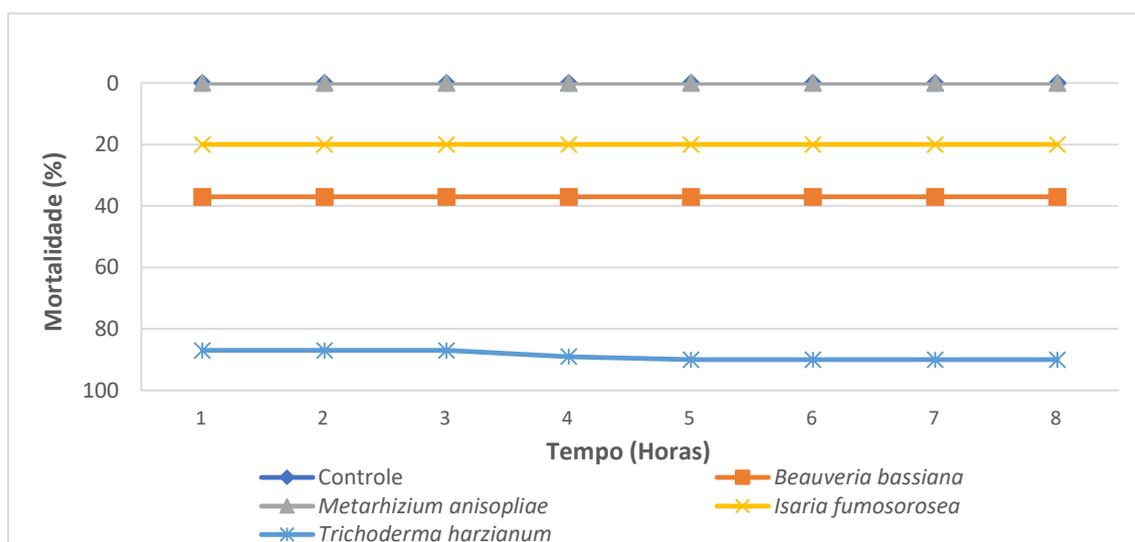
6.2 Toxicidade tóxica de fungos comerciais sobre operárias de formigas-cortadeiras

A partir dos dados coletados durante as primeiras oito horas de observação foi possível avaliar o desempenho de cada tratamento na mortalidade de operárias de *A. laevigata* (Figura 8).

Não ocorreu mortalidade de operárias no controle e no tratamento com *M. anisopliae* durante as primeiras oito horas. Nos demais tratamentos, *I. fumosorosea*, *B. bassiana* e *T. harzianum* a mortalidade de operárias ocorreu logo na primeira hora de avaliação, seguindo parcialmente estável até as demais horas subsequentes, sendo os resultados similares aos obtidos por Stefanelli et al. (2021), que ao imergirem

operárias de *A. sexdens* em suspensões com diferentes concentrações de *B. bassiana* e *T. harzianum*, observaram valores de TL₅₀ acima de nove horas.

Figura 8. Mortalidade (%) de operárias de *Atta laevigata* após oito horas de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum*.



Fonte: O Autor (2022).

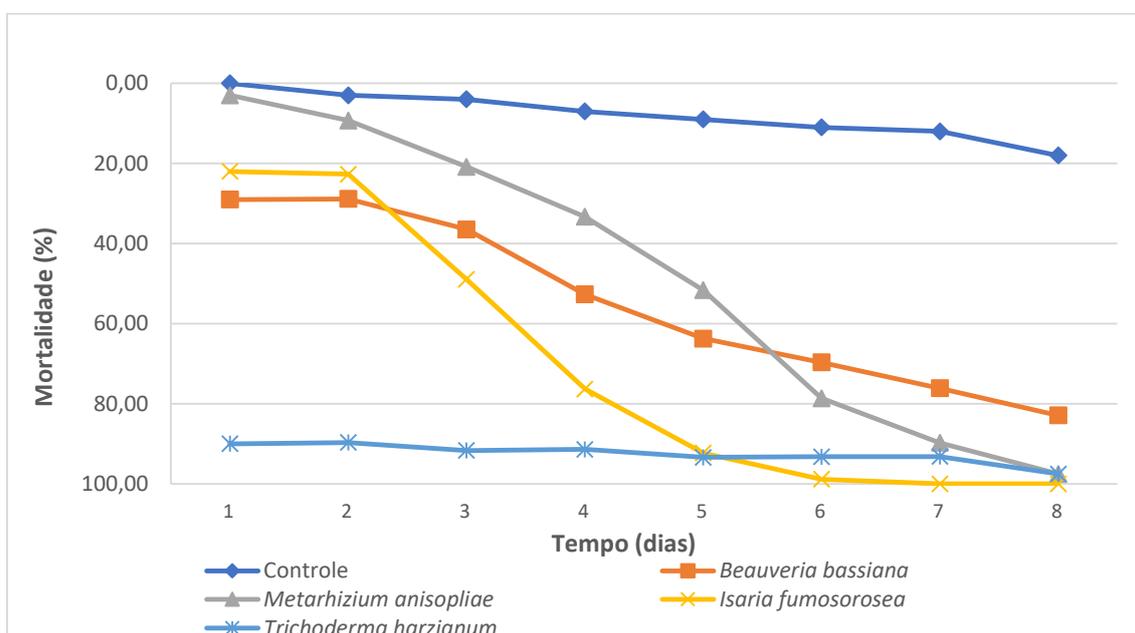
O desempenho de cada tratamento na mortalidade de operárias de *A. laevigata*, após oito dias de avaliação, pode ser observado na Figura 9. O tratamento controle apresentou mortalidade acumulada de 18% (Figura 9; Tabela 2), valor similar ao obtido em outros trabalhos, como Nagamoto et al. (2007) e Stefanelli et al. (2019).

No 8º dia, os tratamentos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum* apresentaram mortalidade acumulada de 82,93%, 97,56%, 100,00% e 97,56%, respectivamente. *T. harzianum*, como observado na figura 8, provocou elevada mortalidade logo nas primeiras horas, com a sobrevivência de poucas operárias. *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* não apresentaram diferenças estatísticas quanto à mortalidade, e *B. bassiana* apresentou o menor valor em comparação aos demais tratamentos (Figura 9; Tabela 2).

Os resultados obtidos foram semelhantes à Cardoso et al. (2020), que isolaram *I. fumosorosea* de fêmeas aladas de *Atta* spp., e a mesma apresentou altas taxas de crescimento micelial, indicando que possui potencial contra formigas-cortadeiras. Mota Filho et al. (2021), ao pulverizarem *T. harzianum* diretamente em

colônias de *A. sexdens*, obtiveram 100% de mortalidade de operárias em sete dias. Loureiro e Monteiro (2005) e Castilho (2010) que ao aplicarem *B. bassiana* e *M. anisopliae* em soldados de *Atta sexdens sexdens*, observaram elevadas taxas de mortalidade (80%), com a morte das formigas nos quatro primeiros dias após a aplicação, diferentes dos resultados obtidos por Travaglini et al. (2016), que obtiveram alta mortalidade dos indivíduos somente após 168 horas (7 dias).

Figura 9. Mortalidade (%) de operárias de *Atta laevigata* após oito dias de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum*.



Fonte: O Autor (2022).

Tabela 2. Mortalidade acumulada (%) e mediana (Md) de operárias de *A. laevigata* após oito dias de avaliação e de acordo com os tratamentos: controle (água destilada), suspensão de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Trichoderma harzianum*.

	Tratamento % da mortalidade corrigida acumulada por dia								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Md*
Controle	0,00	3,00	4,00	7,00	9,00	11,00	12,00	18,00	0 + 0,5 d
<i>Beauveria bassiana</i>	29,00	28,87	36,46	52,69	63,74	69,66	76,14	82,93	4 + 3,87 c
<i>Metarhizium anisopliae</i>	3,00	9,28	20,83	33,33	51,65	78,65	89,77	97,56	9 + 2,87 b
<i>Isaria fumosorosea</i>	22,00	22,68	48,96	76,34	92,31	98,88	100,00	100,00	8 + 2,5 b
<i>Trichoderma harzianum</i>	90,00	89,69	91,67	91,40	93,41	93,26	93,18	97,56	10 + 0,5 a

*Valores de mediana ± semi-amplitude interquartilica. As medianas seguidas por letras distintas indicam diferença significativa entre si, no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Fonte: O Autor (2022).

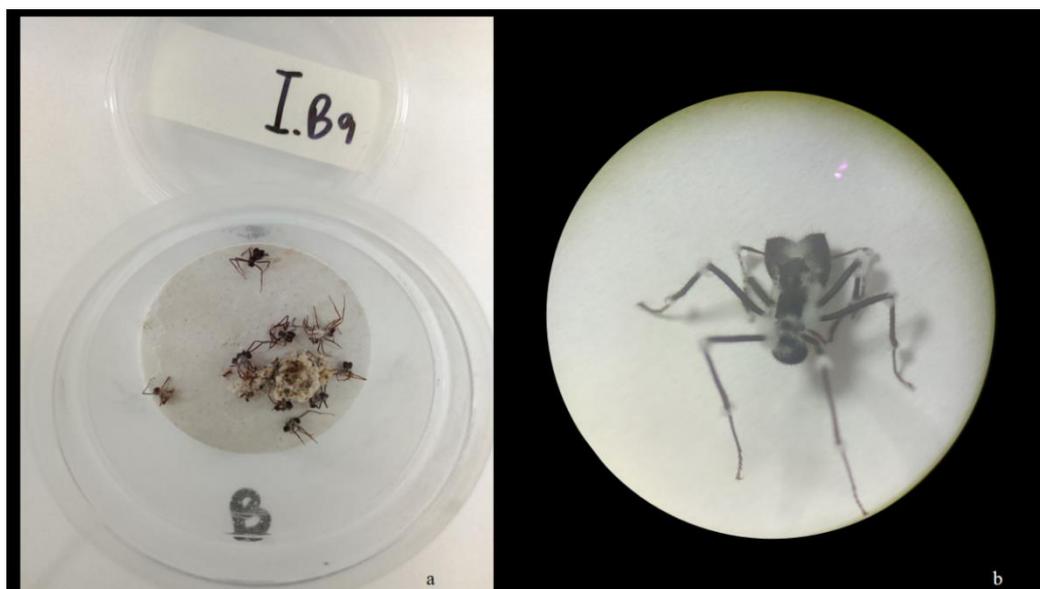
6.3 Avaliação do crescimento de fungos comerciais sobre as operárias de formigas-cortadeiras

No que se refere ao controle, não foi observado crescimento fúngico sobre as operárias de *A. laevigata*, indicando que a mortalidade provavelmente ocorreu em função do estresse provocado pelo isolamento social, e não devido a uma infecção cruzada (RIBEIRO et al., 2012; PALMA, 2016; SILVA, 2017).

Nos tratamentos com as suspensões fúngicas, observou-se a germinação de conídios na cutícula das formigas e contaminação horizontal do fungo mutualista, adicionado no quinto dia para a alimentação das operárias (HUMBER, 2008; 2012; SAMUELS et al., 2016).

É de conhecimento que *B. bassiana* ocasione “muscardine branca” nos insetos, quando aplicado por via tópica, com consideráveis taxas de mortalidade. No presente trabalho, as operárias de *A. laevigata* também apresentaram crescimento de hifas com aspecto algodinoso de coloração branca, com conídios simples e irregulares nas articulações do corpo e, principalmente, nas articulações das pernas, sendo estes os locais preferidos durante a infecção por *B. bassiana*; o que torna ainda mais nítido a extrusão fúngica (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; MOHAMMADBEIGI; PORT, 2005; PAULI et al., 2011; TRAVAGLINI et al., 2016) (Figura 10).

Figura 10. Tratamento com o fungo *Beauveria bassiana*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando o crescimento de hifas no entorno do corpo e extrusão fúngica nas articulações das pernas das formigas.

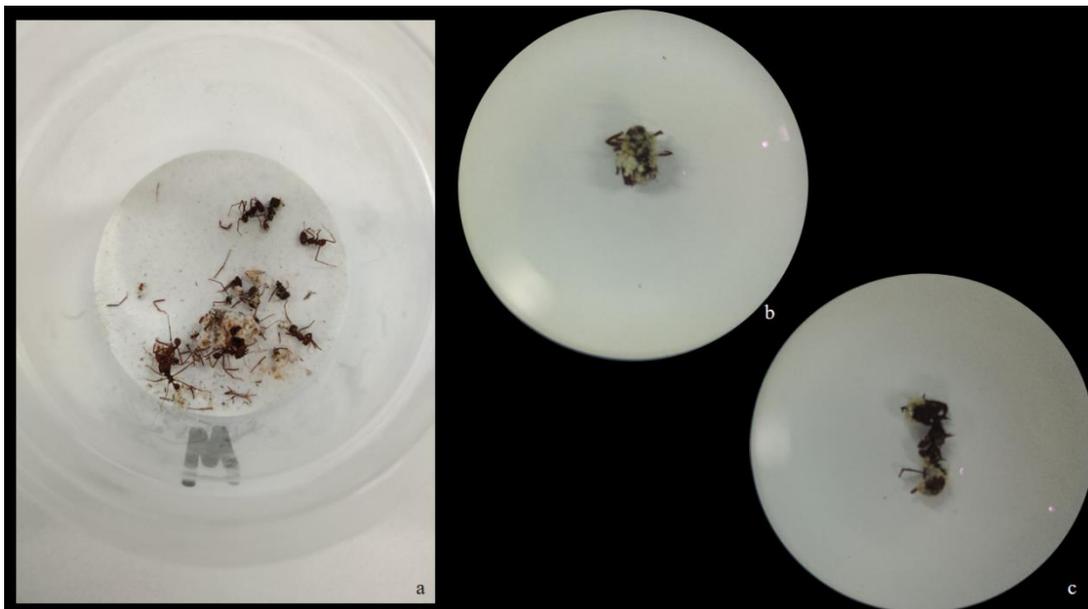


Fonte: O Autor (2022).

No tratamento com *M. anisopliae*, que causa a chamada “muscardine verde”, os hospedeiros tornam-se mumificados e cobertos por uma camada pulverulenta formada pela aglomeração de conídios, com crescimento denso e coloração verde por todo o corpo. (LOUREIRO, 2022). É possível afirmar que os conídios aderiram em toda a extensão dorsal da cabeça, tórax e gáster, assim como apresentado por Avery et al. e por Travaglini et al. (2016), onde o fungo demonstra claramente sua preferência por estas regiões para contaminação (2009) (Figura 11b).

Também foi observada a mutilação de diversas partes do corpo das operárias, como antenas e pernas (Figuras 11a e 11c), o que pode ser explicado pela penetração e concentração de conídios próximo às suturas (aberturas naturais) que facilitam a penetração de fungos como *M. anisopliae* no início da infecção, e também devido ao comportamento agressivo durante a autolimpeza (*autogrooming*) e a limpeza coletiva (*allogrooming*) que favorecem acúmulo de conídios na cavidade infrabucal (BOLTON, 2003; KONRAD et al., 2012; TRAVAGLINI et al., 2016).

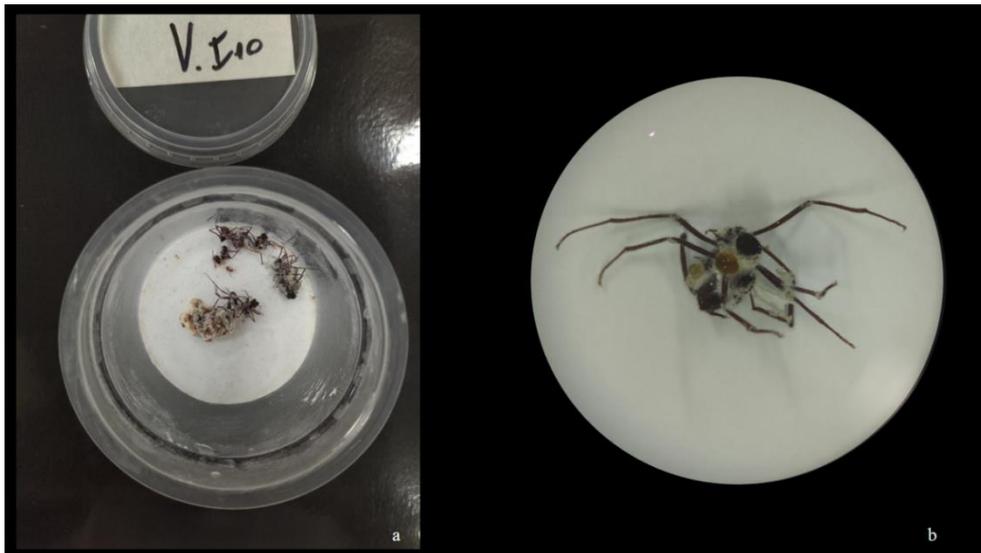
Figura 11. Tratamento com o fungo *Metarhizium anisopliae*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica na região do clipeo, mandíbulas e gáster. c) Operária de *Atta laevigata* com sinais de contaminação e perda de membros, como as pernas.



Fonte: O Autor (2022).

Para *I. fumosorosea* também foi constatada a extrusão no corpo das operárias. Além dos conídios visíveis no pronoto, foi possível observar a presença de pequenas gotículas que se assemelham a elementos estudados por Arnost et al. (2016) em *Diaphorina citri*, cujos elementos indicavam uma resposta de defesa via tegumento a fim de dificultar a germinação e penetração de hifas (Figura 12).

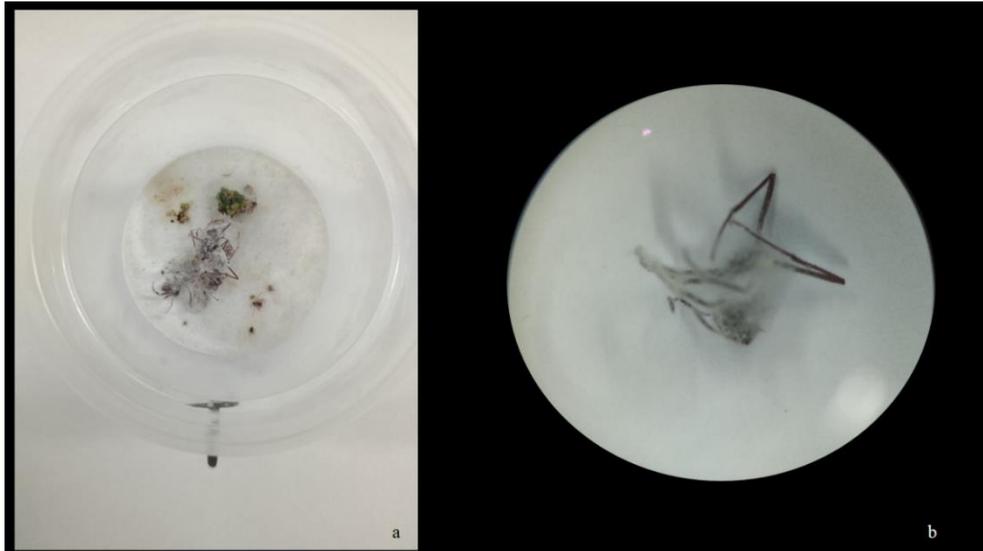
Figura 12. Tratamento com o fungo *Isaria fumosorosea*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica em diversas partes do corpo, como clipeo, mandíbulas e gáster.



Fonte: O Autor (2022).

As operárias expostas à suspensão de *T. harzianum* apresentaram alta taxa de esporulação de conídios (Figuras 13a e 13b). A elevada competição por espaço e nutrientes pode ser observada pelo rápido desenvolvimento de *T. harzianum* sobre as operárias e na pequena porção adicionada do fungo mutualista (Figura 13a) (BENÍTEZ et al., 2004; MOTA FILHO et al., 2022).

Figura 13. Tratamento com o fungo *Trichoderma harzianum*. a) Operárias de *Atta laevigata* e o fungo mutualista seis dias após a aplicação. b) Operária de *Atta laevigata* apresentando extrusão fúngica em diversas partes do corpo, como clipeo, mandíbulas, gáster e pernas.

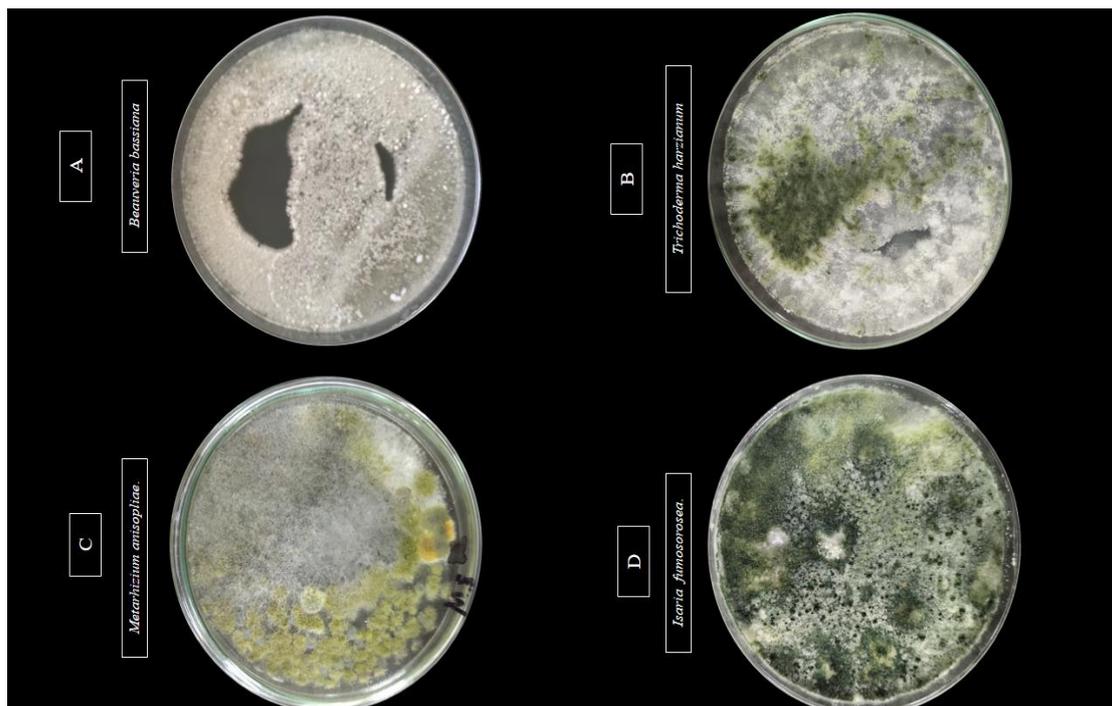


Fonte: O Autor (2022).

6.4 Avaliação do crescimento de fungos encapsulados em meio de cultura

A partir do plaqueamento dos encapsulados de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *T. harzianum*, foi possível observar tanto o recobrimento total dos encapsulados quanto o crescimento por toda a placa de Petri contendo o meio de cultura BDA. O resultado é similar ao observado no crescimento visual dos fungos comerciais plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 144 horas de avaliação (Figura 14).

Figura 14. Crescimento visual dos fungos comerciais plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 144 horas de avaliação. A) *Beauveria bassiana*. B) *Trichoderma harzianum*. C) *Metarhizium anisopliae*. D) *Isaria fumosorosea*.

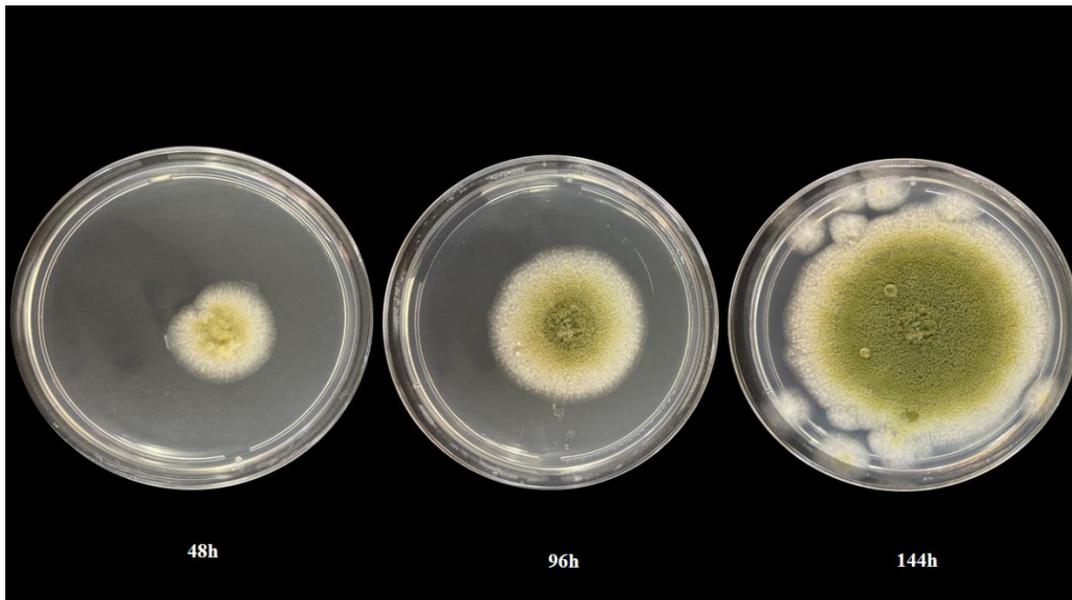


Fonte: O Autor (2022).

O crescimento de *B. bassiana* encapsulado pode ser observado a partir de 48 horas, com o recobrimento médio de 9,84% da área da placa de Petri, seguido de 36,96% (96 horas) e 86,8% (144 horas) (Figura 15), similar à média de crescimento do fungo comercial plaqueado, que foi de 91,14%, e que indica uma diferença de 4,34%.

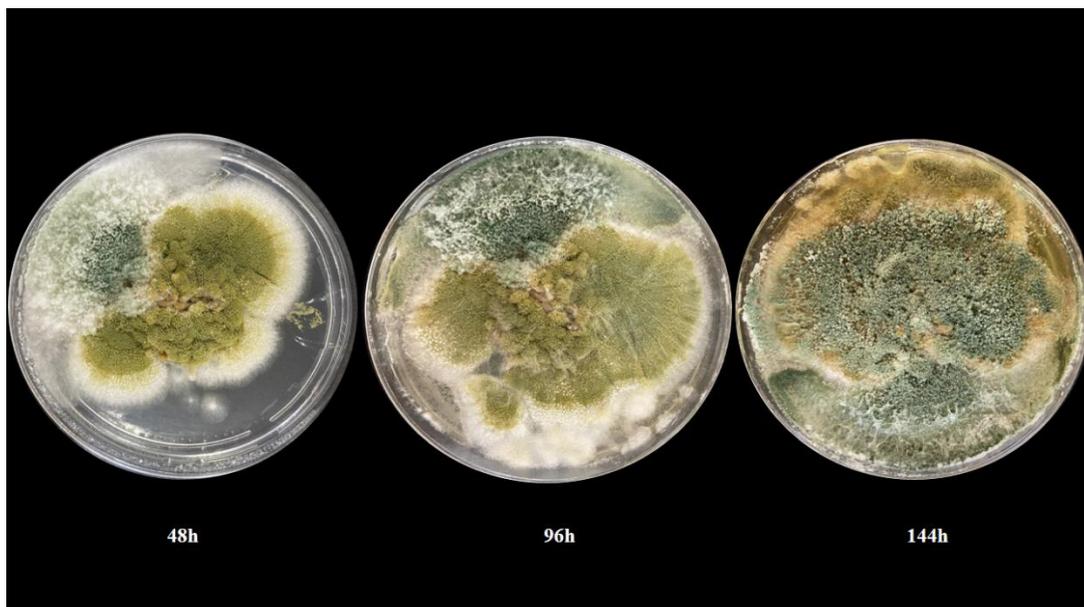
Já no plaqueamento de 1g de encapsulados de *B. bassiana* pode se observar elevado crescimento desde as primeiras 48 horas, o equivalente à média de 78% da área da placa de Petri, com 86,36% em 96 horas e 100% em 144 horas. No plaqueamento de 1g pode ter havido contaminação, o que, porém, não afetou o desenvolvimento de *B. bassiana* (Figura 16).

Figura 15. Crescimento visual de um encapsulado de *Beauveria bassiana* plaqueado em meio de cultura BDA com 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 16. Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Beauveria bassiana* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Com 48 horas de observação, o encapsulado de *M. anisopliae* apresentou recobrimento médio de 4,14% da área da placa de Petri, 43,9% com 96 horas, e 100% ao longo de 144 horas (Figura 17). Com 1g de encapsulados de *M. anisopliae*, 61,1% da área da placa de Petri já havia sido recoberta, atingindo 100% com 96 horas de observação (Figura 18).

Figura 17. Crescimento visual de um encapsulado de *Metarhizium anisopliae* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 18. Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Metarhizium anisopliae* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

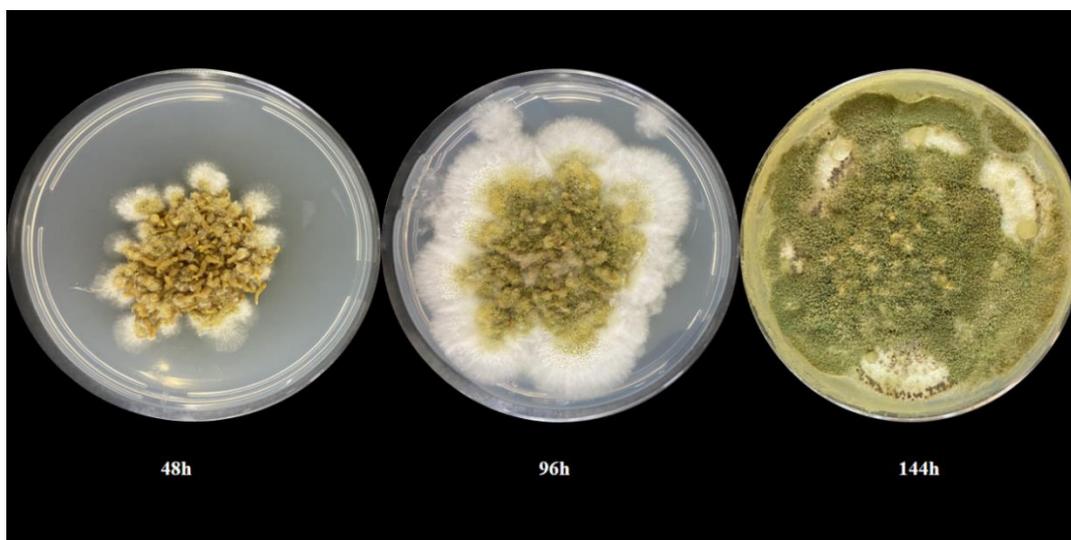
I. fumosorosea encapsulado apresentou, nas primeiras 48 horas, crescimento médio equivalente a somente 1,14% da área da placa de Petri, aumentando progressivamente (82,92%) ao longo de 96 horas de observação, até atingir 100% com 144 horas (Figura 19). No plaqueamento de 1g de encapsulados, 43,08% da área da placa de Petri encontrava-se recoberta por *I. fumosorosea*, seguido de 96,38% com 96 horas, e atingindo 100% com 144 horas de observação (Figura 220).

Figura 19. Crescimento visual de um encapsulado de *Isaria fumosorosea* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 20. Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Isaria fumosorosea* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

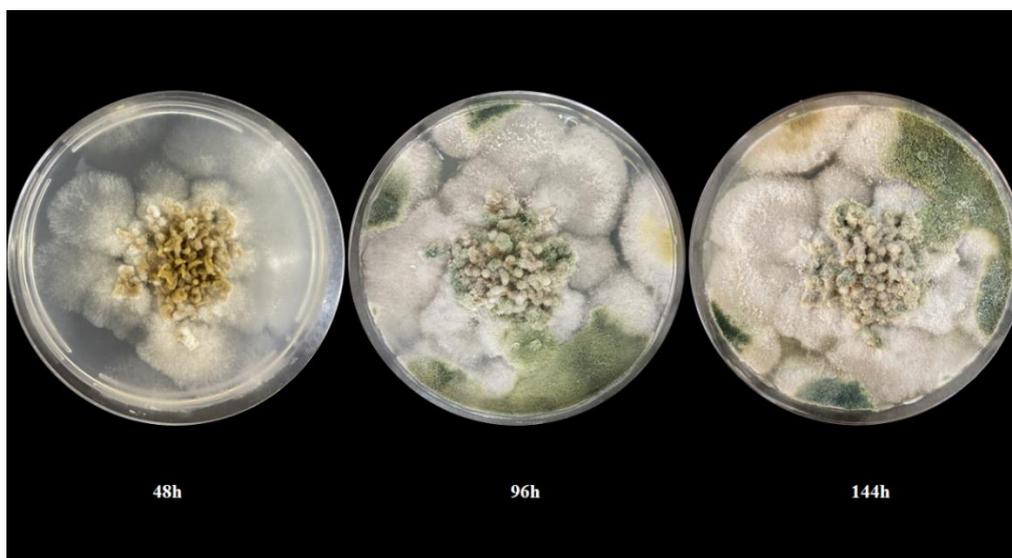
No plaqueamento do encapsulado de *T. harzianum* a esporulação ocorreu a partir das primeiras 48 horas, com o recobrimento médio de 22,42% da área da placa de Petri, e cobertura de 100% com 96 horas de observação (Figura 21). O plaqueamento de 1g de encapsulados de *T. harzianum* apresentou, com 48 horas, recobrimento médio da área da placa de 83,76%, alcançando 100% com 96 horas de observação (Figura 22).

Figura 21. Crescimento visual de um encapsulado de *Trichoderma harzianum* plaqueado em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 22. Crescimento visual de 1g de encapsulados de *Trichoderma harzianum* plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.

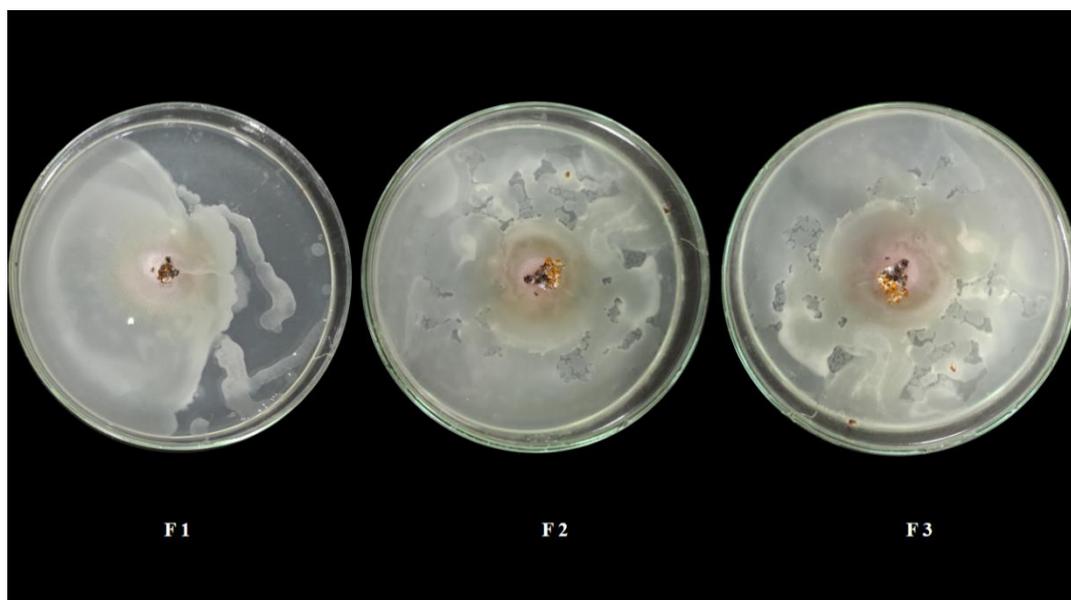


Fonte: O Autor (2022).

6.5 Avaliação da atividade antagônica de fungos encapsulados sobre o fungo mutualista

O teste de antagonismo demonstrou distintos resultados de acordo com a espécie fúngica encapsulada. O desenvolvimento do fungo mutualista plaqueado em meio de cultura BDA serviu para fins de comparação com os demais tratamentos (Figura 23).

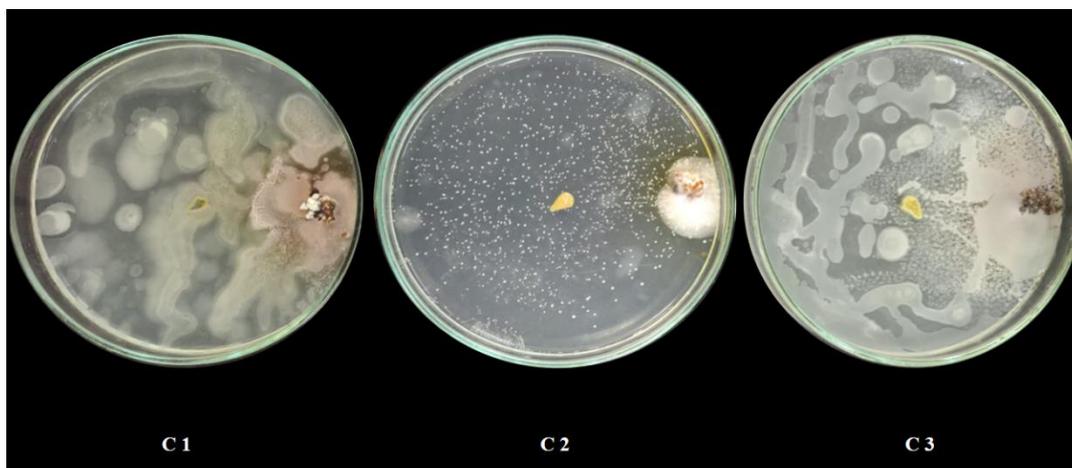
Figura 23. Crescimento visual do fungo mutualista plaqueado em meio de cultura BDA. F1, F2 e F3: repetições de porção fo fungo mutualista de diferente colônias.



Fonte: O Autor (2022).

O segundo plaqueamento consistiu no pareamento entre um encapsulado controle (sem fungo) e o fungo mutualista, a fim de verificar possíveis sinais de contaminação após o encapsulamento. Contudo, apesar do processo fabril não ser totalmente estéril, até o sexto dia não foram observados sinais de contaminação e/ou contaminação cruzada oriundos dos encapsulados (Figura 24). Houve o crescimento e proliferação de outros microrganismos advindos do fungo mutualista, o que era esperado, e por isso o fungo cultivado é considerado como um jardim de fungos (DORNELAS et al., 2016).

Figura 24. Pareamento do encapsulado controle (sem fungo) ao centro e do fungo mutualista à direita plaqueados em meio de cultura BDA. C1, C2 e C3: repetições.



Fonte: O Autor (2022).

Geralmente *B. bassiana* é considerado um fungo entomopatogênico, porém alguns estudos destacam sua potencial atividade antagônica sobre o fungo mutualista (PAREDES et al., 2016; BELLANIS, 2020). Assim, é possível observar a formação do halo antagonista oriundo do encapsulado de *B. bassiana* que, após 48 horas, ocupava média de 1,24% da área da placa de Petri, reduzindo o crescimento do fungo mutualista; *L. gongylophorus* e outros microrganismos provenientes recobrem 49,2% da placa. Com 96 horas, *B. bassiana* já recobria uma média de 90,1% da área, e observou-se os primeiros sinais de contaminação do fungo mutualista. Com 144 horas, *B. bassiana* ocupou 100% da área, com nítida contaminação do fungo mutualista (Figura 25).

Figura 25. Crescimento visual do encapsulado de *Beauveria bassiana* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

Para o pareamento com *M. anisopliae*, a área média ocupada por este nas primeiras 48 horas representava 3,36%, enquanto o fungo mutualista 2,12%. Com 96 horas, *M. anisopliae* já recobria uma área média de 48%, e *L. gongylophorus* não apresentava crescimento visual (2,54%). Na observação após 144 horas, *M. anisopliae* já recobria 100% da área da placa, sendo possível observar possível contaminação sobre *L. gongylophorus* (Figura 26).

Figura 26. Crescimento visual do encapsulado de *Metarhizium anisopliae* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



Fonte: O Autor (2022).

No pareamento entre o encapsulado de *I. fumosorosea* e o fungo mutualista, foi possível observar a esporulação e o crescimento de hifas desde 48 horas de observação, o equivalente à uma área média de 2% da placa, seguido de 4,32% (96 horas) e 4,84% (144 horas). Nota-se, porém, que não houve formação de halo de inibição, e a área média recoberta pelo fungo mutualista representava 98% da placa (48 horas), com leve redução para 95,68% às 96 horas, e 95,16% após 144 horas. O encapsulado de *I. fumosorosea* não apresentou o desenvolvimento do halo de inibição e não restringindo o crescimento do fungo mutualista como já esperado, pois não há literatura afirmando atividade antagonista do mesmo (Figura 27).

Figura 27. Crescimento visual do encapsulado de *Isaria fumosorosea* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.

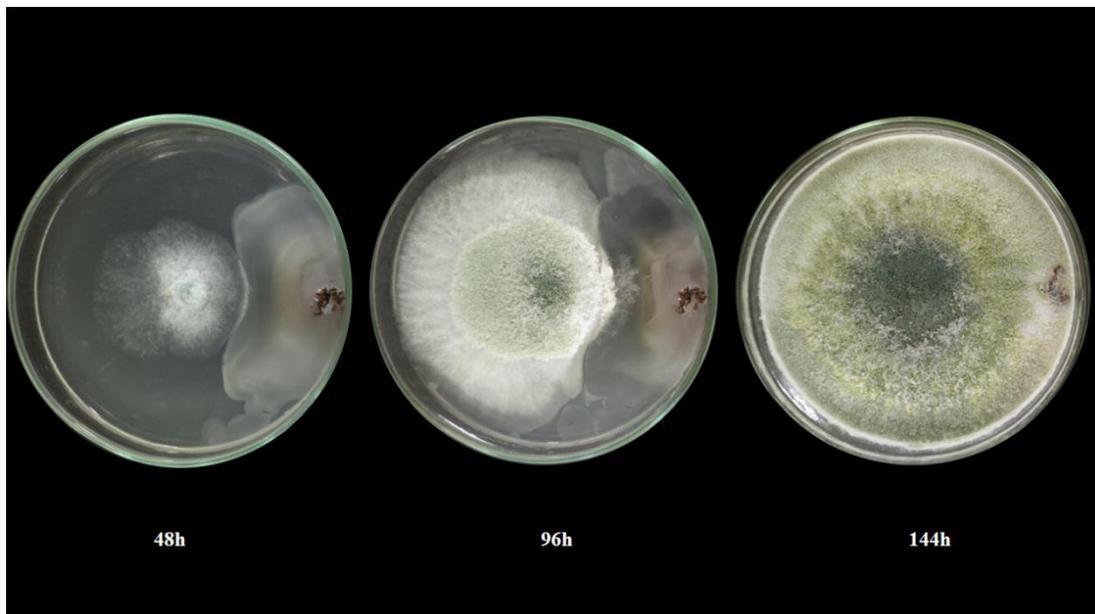


Fonte: O Autor (2022).

Com relação ao gênero *Trichoderma*, seu potencial antagonista sobre o fungo mutualista já é conhecido. No presente trabalho, com o uso de *T. harzianum*, os resultados foram similares a Rocha et al. (2017) e Nascimento et al. (2017), que também confirmaram o efeito antagônico por meio de análise visual do halo de inibição. Este se mostrou visível com 48 horas, e representava uma área média de 26,2%, frente a média de 32,40% do fungo mutualista.

Com 96 horas o halo antagônico ainda se apresentava visível, porém quase recoberto pelo crescimento de *T. harzianum*, com área média de 78,42%, e *L. gongylophorus* com 33,22%. O halo já não era mais visível com 144 horas de observação, e *T. harzianum* praticamente ocupava 100% a área da placa, com somente uma pequena porção do fungo mutualista sendo visível (Figura 28).

Figura 28. Crescimento visual do encapsulado de *Trichoderma harzianum* (ao centro) e do fungo mutualista (à direita) plaqueados em meio de cultura BDA ao longo de 48, 96 e 144 horas de observação.



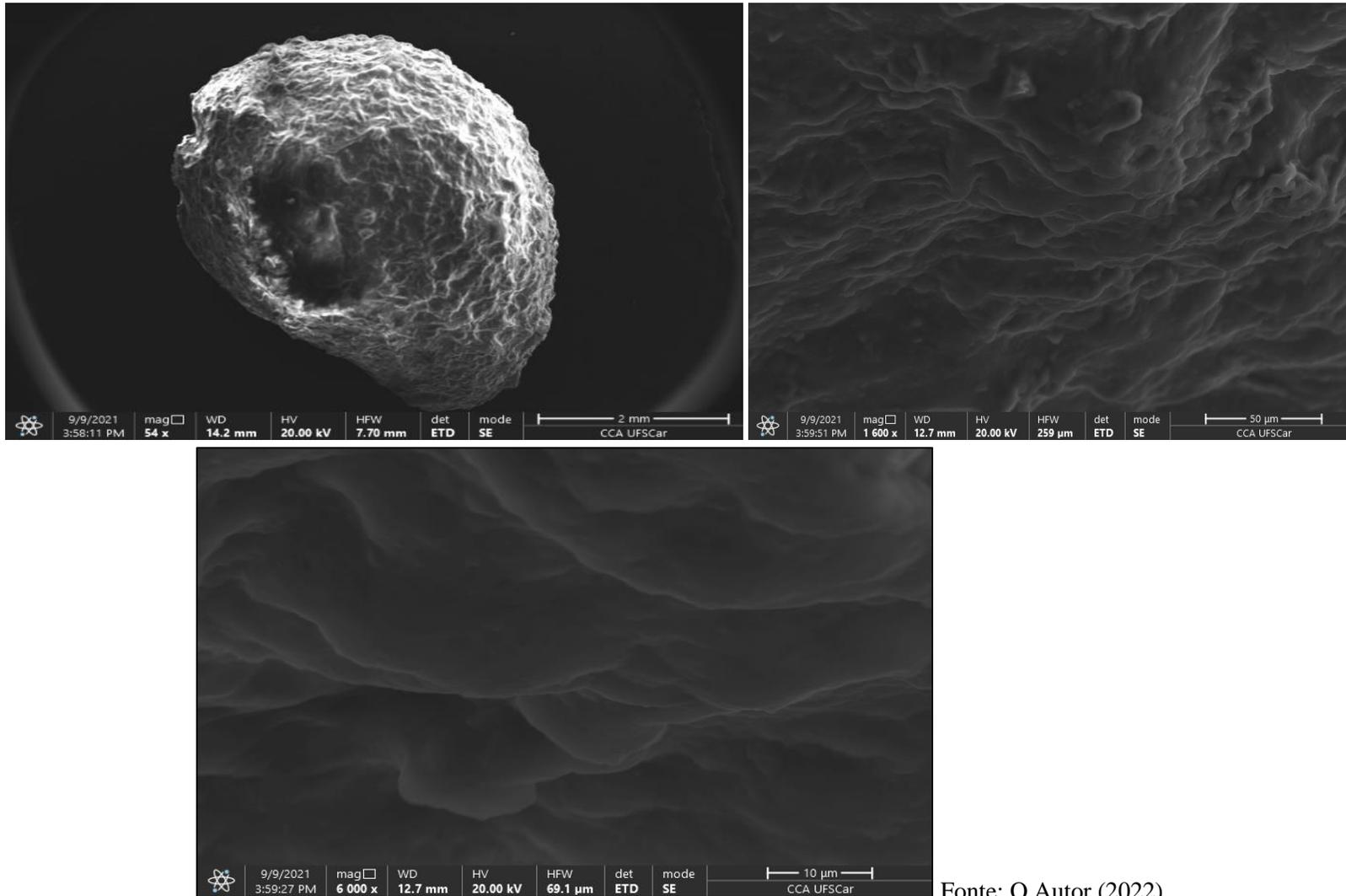
Fonte: O Autor (2022).

6.6 Caracterização de fungos encapsulados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Conforme caracterização realizada por meio do MEV, foi possível observar o encapsulado controle (sem fungo) e o processo de gelificação com o uso da matriz biopolimérica de pectina (Figura 29). É importante ressaltar que não foi observada presença de contaminantes no encapsulado controle (sem fungo), apesar do processo fabril não ser totalmente estéril.

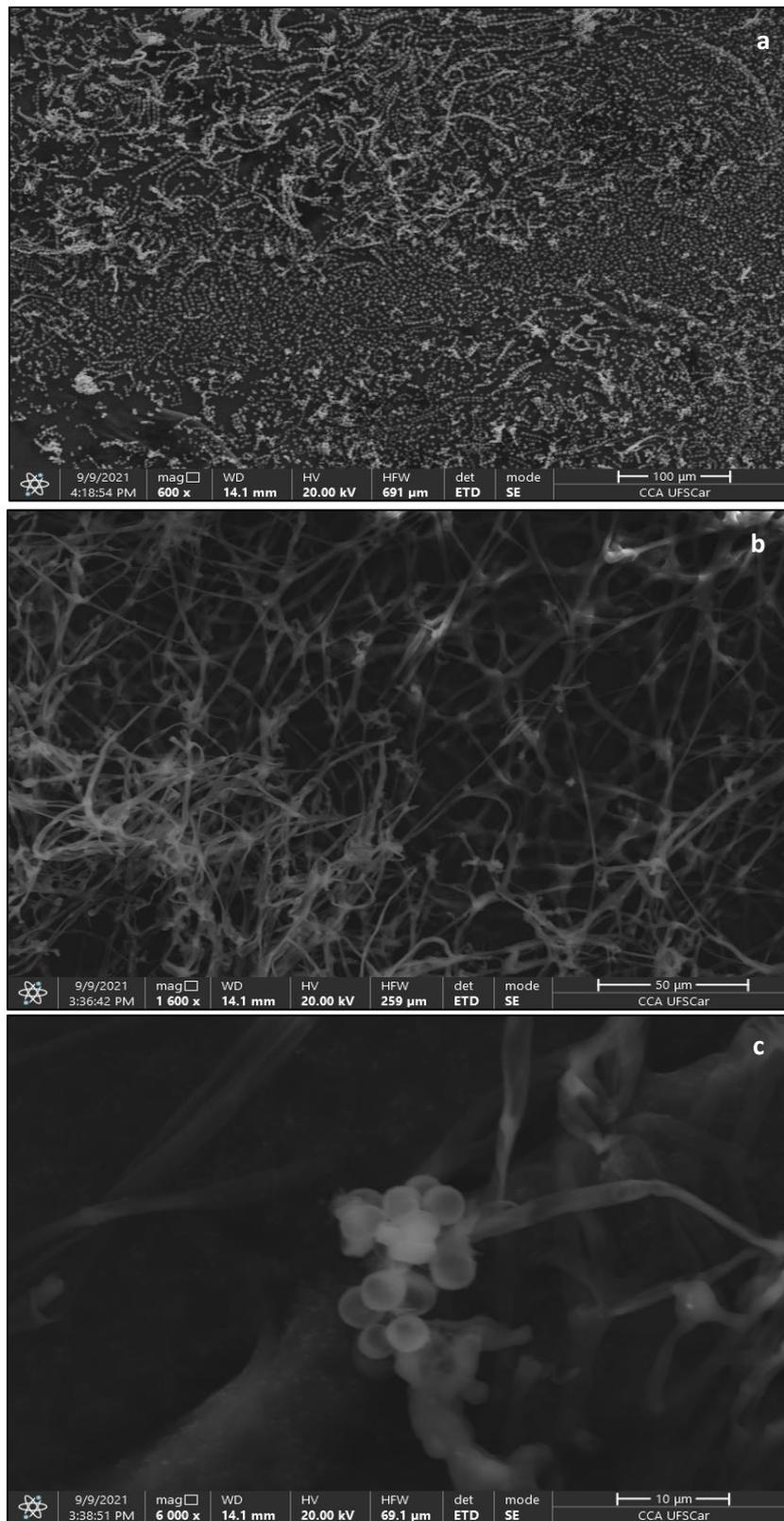
Para os encapsulamentos contendo *B. bassiana* (Figura 30), *M. anisopliae* (Figura 31), *Isaria fumosorosea* (Figura 32) e *T. harzianum* (Figura 33) foi possível observar a presença de conídios junto à matriz biopolimérica de pectina, formação de hifas e detalhe dos conídios e estruturas celulares.

Figura 29. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando a matriz polimérica de pectina no encapsulado controle (sem fungo).



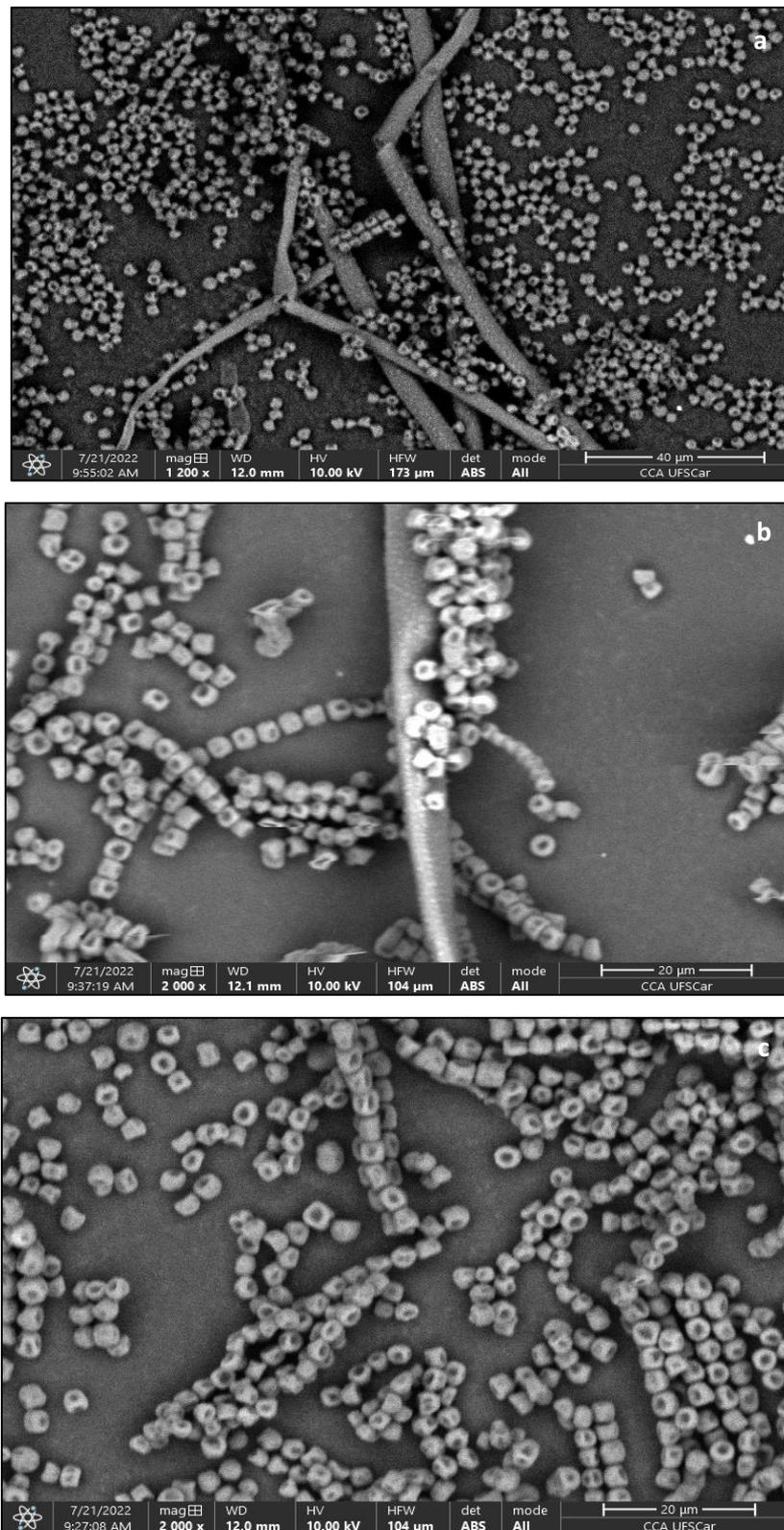
Fonte: O Autor (2022).

Figura 30. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Beauveria bassiana*. a) Presença de *Beauveria bassiana* junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Beauveria bassiana*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Beauveria bassiana*.



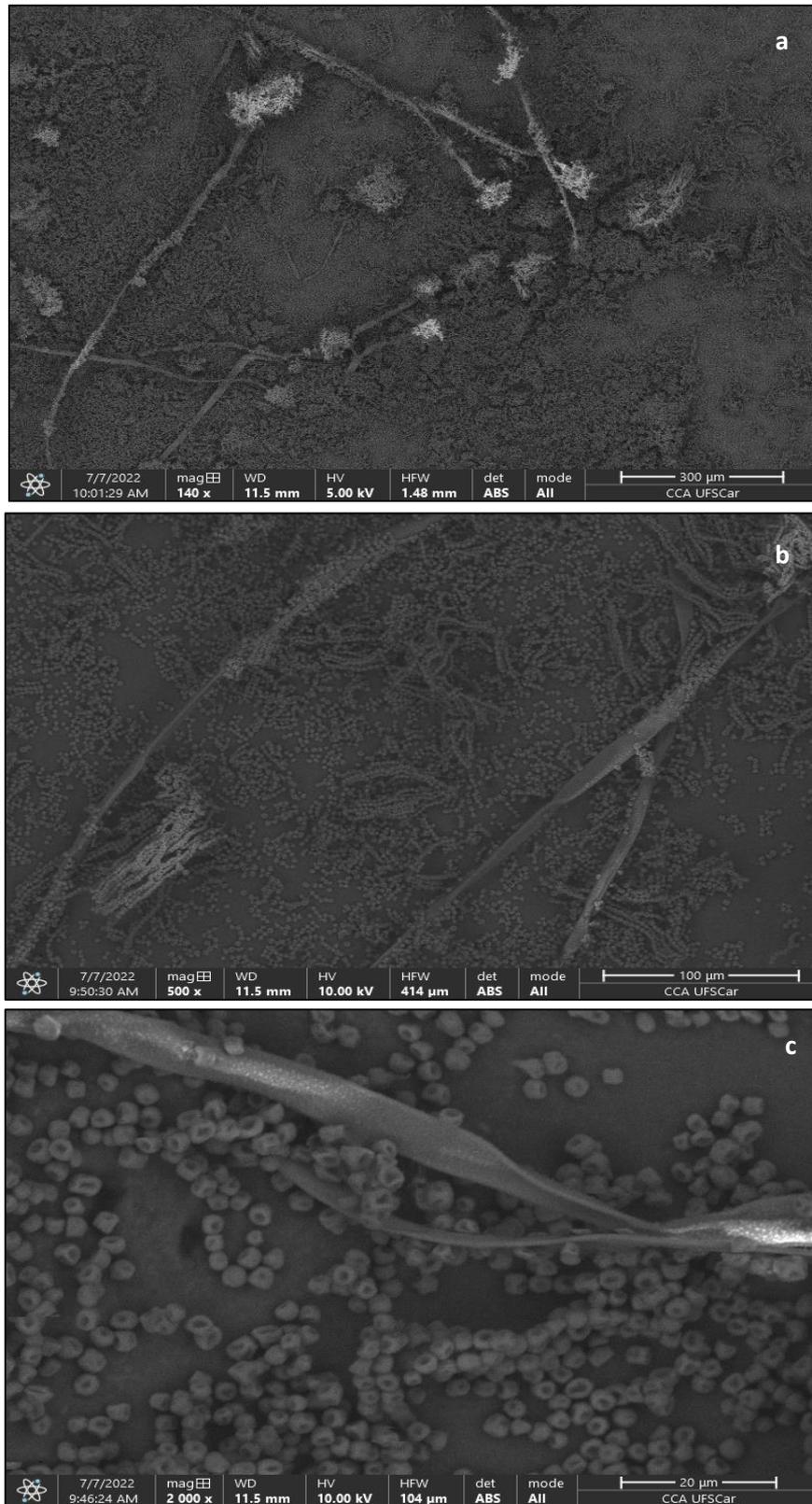
Fonte: O Autor (2022).

Figura 31. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Metarhizium anisopliae*. a) Presença de *Metarhizium anisopliae*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Metarhizium anisopliae*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Metarhizium anisopliae*.



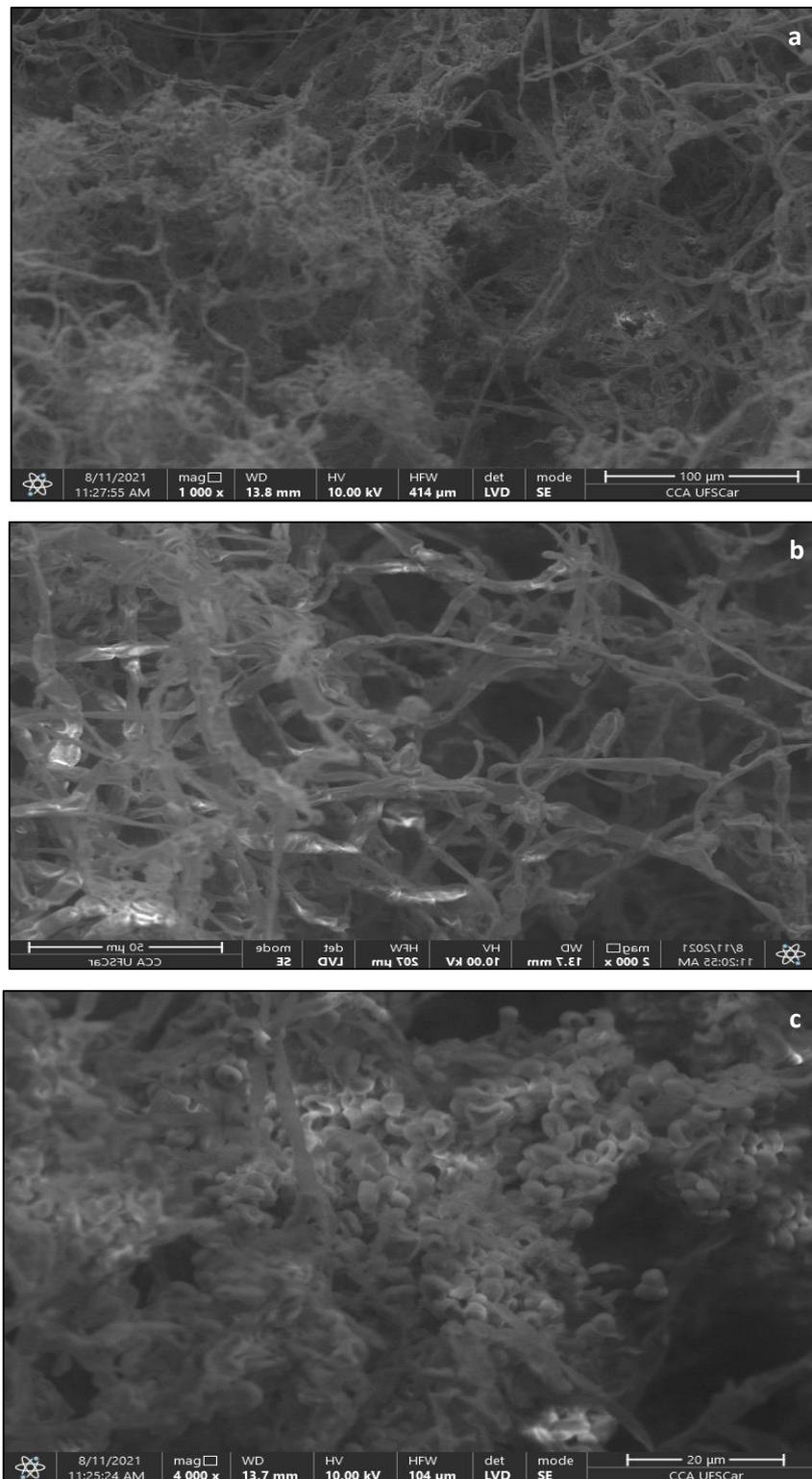
Fonte: O Autor (2022).

Figura 32. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Isaria fumosorosea*. a) Presença de *Isaria fumosorosea*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Isaria fumosorosea*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Isaria fumosorosea*.



Fonte: O Autor (2022).

Figura 33. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando o encapsulado contendo *Trichoderma harzianum*. a) Presença de *Trichoderma harzianum*. de junto à matriz biopolimérica de pectina. b) Formação de hifas de *Trichoderma harzianum*. c) Detalhe dos conídios e estruturas celulares de *Trichoderma harzianum*.



Fonte: O Autor (2022).

6.7 Análise da aceitação de fungos encapsulados em subcolônias de *Atta laevigata*

Após a oferta dos encapsulados durante cinco dias consecutivos observou-se baixos valores de carregamento em todos os tratamentos e no controle. Os dados não apresentaram normalidade e as médias não diferiram estatisticamente ($p = 0,346$) (Tabela 3). O encapsulado de *T. harzianum* foi o mais carregado (25,6%), e o encapsulado de *I. fumosorosea* o menos carregado (4,4%). Os demais fungos encapsulados apresentaram valores de 17,6% (*B. bassiana*) e 9,6% (*M. anisopliae*), e o controle somente 2,4%.

Tabela 3. Média de carregamento (g) do encapsulado controle (sem fungo), e encapsulados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Trichoderma harzianum*, durante cinco dias de oferta.

Encapsulados	Média de carregamento diário (g)				
	1	2	3	4	5
Controle	0,49	0,48	0,50	0,49	0,50
<i>Beauveria bassiana</i>	0,42	0,46	0,47	0,50	0,50
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0,39	0,46	0,50	0,48	0,49
<i>Isaria fumosorosea</i>	0,44	0,50	0,49	0,50	0,50
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,29	0,47	0,48	0,49	0,50

Em trabalhos como Silva e Diehl-Fleig (1995), Warumby et al. (1995) e Rocha et al. (2020) foi possível também contabilizar a mortalidade de operárias e do fungo mutualista, com médias de até 60% de mortalidade. Contudo, no presente trabalho foi observado que após o primeiro contato das operárias com os encapsulados, estes não se mostraram atrativos, sendo transportados até a câmara de fungo e posteriormente descartados na câmara de lixo.

Segundo Hubell e Wiemer (1983), e Travaglini et al. (2017), as formigas-cortadeiras possuem certas preferências que as fazem selecionar os substratos que serão incorporados na colônia. Essa seleção pode ocorrer por diferentes razões, como defesa química, tais como substâncias tóxicas ao fungo simbiote, às operárias ou a ambos. Assim, é de se esperar que nem todo o substrato seja transportado pelas formigas, porém é necessário que as forrageiras transportem o material para ao interior de suas colônias, e assim ocorra a disseminação de um princípio ativo, por exemplo. Nesse sentido, o estímulo olfatório também destaca-se como um importante fator durante a seleção de

substratos, sendo ele um estímulo para o recrutamento de outras operárias durante a locomoção em atividades exploratórias de substratos, visto a possibilidade de carregamento de tal fonte, ou abandono da mesma.

Além do mais, é importante ressaltar, a capacidade de aprendizagem das formigas, pois estas adquirem respostas condicionadas pela associação de recompensas, por exemplo, o aroma do “alimento-isca”, pois não sendo atrativo ao primeiro contato, não será mais transportada (HÖLLDOBLER; WILSON,1990).

7 CONCLUSÕES

Pelo teste tópico com *T. harzianum*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea* observou-se mortalidade já na primeira hora. Após oito dias, os tratamentos *T. harzianum*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* ocasionaram a maior mortalidade de operárias, e *B. bassiana*, a menor. Com relação ao crescimento de fungos comerciais sobre as operárias, observou-se a germinação dos conídios na cutícula das formigas e contaminação horizontal do fungo mutualista.

Após seis dias de avaliação, os fungos encapsulados plaqueados apresentaram crescimento similar aos fungos comerciais. Nas análises com o MEV foi possível observar a formação de estruturas celulares junto à matriz biopolimérica de pectina.

No teste antagonista, *B. bassiana* e *T. harzianum* formaram o halo de inibição. *M. anisopliae* não apresentou halo de inibição, porém impediu o crescimento do fungo mutualista. *I. fumosorosea* não inibiu o crescimento do fungo mutualista.

Na oferta de encapsulados fúngicos, ocorreu baixo carregamento pelas operárias, não sendo possível a quantificação de resultados.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos.**

Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* F. Smith, 1858, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, e), em formigueiros localizados no estado de São Paulo.** 175 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

AMARAL, K. D.; GANDRA, L. C.; SOUZA, D. J.; DELLA LUCIA, T. M. C.

Deleterious action of azadirachtin against the mutualistic fungus of leaf-cutting ants.

Journal of Basic Microbiology, v. 60, n. 11-12, p. 931-937, 2020.

ANDRADE, A. P. P. **Biologia e taxonomia comparadas das subespécies de**

***Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hym, Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências. Botucatu. 2002.

ANTWEB. Version 8.56.1. California Academy of Science. Disponível em:

<<https://www.antweb.org>>. Acesso em: 18 out. 2021.

ARNOSTI, A., DELALIBERA JUNIOR, I., CONCESCHI, M. R., D’ALESSANDRO,

C. P., TRAVAGLINI, R. V., & CAMARGO-MATHIAS, M. I. Interactions of adjuvants on adhesion and germination of *Isaria fumosorosea* on adults of *Diaphorina citri*.

Scientia Agricola, 76(6), 487–493, 2019.

AUGUSTIN, J. O. **Novas espécies de *Escovopsis*, sua dispersão e virulência na**

simbiose formigas Attini *Leucoagaricus gongylophorus*. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

AVERY, P. B.; HUNTER, W. B.; HALL, D. G.; JACKSON, M. A.; POWELL, C. A.;

ROGERS, M. E. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, v.92, n.4, p.608 - 618, 2009.

BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC, CODON AC. Biocontrol mechanisms of

Trichoderma strains. **International Microbiology**. 2004; 7(4): 249-260. doi:

<https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>.

- BIDOCHKA, M. J.; SMALL, C. N.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1361–1368, 2005.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BOLTON, B. Synopsis and Classification of Formicidae. 370 pp. **Memoirs of the American Entomological Institute**, Vol. 71. Gainesville, FL. 2003.
- BOLTON, B. An online catalog of the ants of the world. Disponível em: <<https://antcat.org>>. Acesso em: 18 out. 2021.
- BOULOGNE, I.; OZIER-LAFONTAINE, H.; LORANGER- MERCIRIS, G. Leaf-cutting ants, biology and control. In: LICHTFOUSE, E. (Eds.). **Sustainable Agriculture Reviews**, Springer, v.13, 2014.
- BRACCINI, I.; PEREZ, S. Molecular basis of Ca²⁺- induced gelation in alginates and pectins: The Egg-Box model revisited. **Biomacromolecules**, v.2, p. 1089-1096, 2001.
- BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 2, p. 98-108, 2001a.
- BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UV-B 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. 140-146, 2001b.
- BRAGA, G. U.; 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**, v. 74, n. 5, p. 734-739, 2001c.
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C.; LOECK, A.E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N.S.; LEMES, P.G.; CAMARGO, R.S. Use of alternatives to pfos, its salts and PFOSF for the control of leafcutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, p. 11-92, 2016.
- CAMARGO, R. S.; LOPES, J. F. S.; FORTI, L. C.; Fungus garden acts as a template for the construction of chambers in ants?. **Ciência Rural**, v.43, n.3, p.565-570, 2013.

- CANALI, M. C. **Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de formigas cortadeiras**. 2017. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2017.
- CARDOSO, S. R. S.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; SOUZA, E. S. Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.59, n. 3, p. 681–689, 2012.
- CARDOSO, S. R. S.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S. Characterizing naturally-occurring entomopathogenic fungi in reproductive females of *Atta* spp. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 9, n. 1, p. 46-54, 2020.
- CASTRILLO, M. L.; BICH, G. A.; ZAPATA, B. D.; VILLALBA, L. L. Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. **Mycosphere**, v.7, p. 810-819, 2016.
- CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; ROSA, C.A. “Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório” **Cien Rural**. vol.40, n.6, pp.1243-1249, 2010.
- CASTRO, L. A. S. **Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2002. 37 p.
- CATALANI, G. C.; SOUSA, K. K. A.; CAMARGO, R. S.; CALDATO, N.; MATOS, C. A. O.; FORTI, L.C. Chemical control of leaf-cutting ants: how do workers disperse toxic bait fragments onto fungus garden?. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.63, p. 290-295, 2019.
- CHELICO, L.; KHACHATOURIANS, G. G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 93-100, 2008.
- COLOMBARI, K. F. S.; FUJIHARA, R. T.; SOUZA-CAMPANA, D.R.; WAZEMA, C. T.; SOUZA, E. S. Survey of leaf-cutting ant species in the central region of the state of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2023, v. 83, e248727. Epub 27 Aug 2023.

- DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, p. 200–214, 2006.
- DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. G. R.; PEREIRA, A. E.; NUNES, L. E.; DA SILVA, C. C.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; SMANIOTTO, G.; POLANCZYK, R.A.; FRACETO, L. F. Geraniol encapsulated in chitosan/gum arabic nanoparticles: a promising system for pest management in sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 5325–5334, 2018.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L.; GUEDES, R. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14–23, 2014.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. **Formigas cortadeiras**: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2011. p. 419.
- DIONISI, M.; OZIER- LAFONTAINE, H.; LAPLACE, D. Control of Amazonian leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae): a multi-criteria analysis. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, p. 493-504, 2021.
- DONATO, A.; NUNES, F. A.; MENEZES, B. F.; VARGAS, A. B. Control of leaf-cutting ants with *Penicillium* spp. from decomposing oranges: application at different frequencies evaluated by farmers. **Revista Extensão em Foco**, n. 24, p. 230-250, 2021.
- DORNELAS, A S. P.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, M. O.; SOUZA, D. J. Fungos Filamentosos Associados às Espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, v.4, 2013.
- FARJI-BRENER, A. G.; SILVA, J. Leaf-cutting ants and soil fertility in a well-drained Savanna in Western Venezuela. **Biotropica**, v. 27, n. 2, p. 250-254, 1995.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 23, p. 409-420, 1978.
- FOLGARAIT, P. J.; GOFFRÉ, D. Biological control of leaf- cutter ants using pathogenic fungi: experimental laboratory and field studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 69, n. 9, p. 813-824, 2021.
- FOREST STEWARDSHIP COUNCIL. FSC-GUI-30-001^a V1-0 EN. FSC pesticides policy guidance addendum: list of approved derogations for use of ‘highly hazardous’ pesticides, 2012.
- FORTI, L. C.; RANDO, J. S.; CAMARGO, R. S.; MOREIRA, A. A.; CASTELLANI, M. A.; LEITE, S. A.; SOUSA, K. K. A.; CALDATO, N. Occurrence of leaf-cutting and

grass-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) in geographic regions of Brazil. **Sociobiology**, v.67, p. 514-525, 2020.

FSC List of 'highly hazardous' pesticides FSC-STD-30-001a EN, 2015. Disponível em: <<https://ic.fsc.org/file-download.fsc-list-of-highly-hazardous-pesticides.a-2951.pdf>>.

Acesso em: 15 abr. 2021.

GUSTANI, F. M.; SILVA, T. A.; CAMARGO, J. R.; CARVALHO, J. H. S.; JANEGITZ, B. C.; FUJIHARA, R. T. Synthesis, attractiveness and effectiveness of chitosan-tapioca encapsulates in *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 2869–2880, 2021.

KONRAD, M.; VYLETA, M.L.; THEIS, F.J.; STOCK, M.; TRAGUST, S.; KLATTI, M.; DRESCHER, V.; MARR, C.; UGELVIG, L.V.; CREMER, S. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. **PLoS Biol**, v. 10, n. 4, p. e1001300, 2012.

HERNÁNDEZ, J. V; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 287-298, 1995.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 262-266, 2008.

HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. In: LACEY, L. A. Manual of techniques in invertebrate pathology. 2. ed. **Academic Press / Elsevier**, p. 151-187, 2012.

HÜSING, N.; SCHUBERT, U. Aerogels—airy materials: chemistry, structure, and properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p. 22-45, 1998.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* rubropilosa. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 1, p. 51-61, 1999.

KEY, B. D.; HOWELL, R. D.; CRIDDLE, C.S. Fluorinated organics in the biosphere. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 9, p. 2445-2454, 1997.

KHAN, S.; JAN, M. H.; KUMAR, D.; TELANG, A. G. Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 8–14, 2015.

- KIM, J. S.; JE, Y. H.; ROH, J. Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 419-423, 2010.
- KISTLER, S.S. Coherent expanded aerogels and jellies. **Nature**, v.127, p. 741, 1931.
- LEDO, C. M.; CARNEIRO-DA CUNHA, M. N.; OLIVEIRA, J. P.; DUARTE-NETO, J. M. W.; PORTO, A. L. F. Matrizes poliméricas para a encapsulação de bioinseticidas. **Agroecologia e Meio Ambiente**, v. 26, 2021.
- LOCATELLI, G. O.; SANTOS, G. F.; BOTELHO, P. F.; 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, 2017.
- LOPES, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, v. 27 p. 194–200, 2003.
- LOUREIRO, E. S.; BUSARELLO, G. D.; PESSOA, L. G. A.; FERNANDES, M. A. U.; PESSOA, M. B.; AMARAL, T. S.; OLIVEIRA, I. S. T. Susceptibility of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) to *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in laboratory conditions. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, 2022.
- LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v. 29, p. 553-561, 2005.
- LUZ, D. I. A. L.; BELLANIS, S. T. Análisis del Efecto Antagonista que Ejerce *Trichoderma harzianum* y *Beauveria bassiana* Frente a *Fusarium oxysporum*; Revisión Sistemática. Trabajo de Grado para Optar al Título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Universidad de Santander. Valledupar 2020. Disponível em: https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/5899/1/An%c3%a1lisis_del_Efecto_Antagonista_que_Ejerce_Trichoderma_harzianum_y_%20Beauveria_bassiana_Frente_a_Fusarium_oxysporum_Revisi%c3%b3n_Sistem%c3%a1tica.pdf.
- MATRANGOLO, C. A. R.; CASTRO, R. V. O.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DELLA LUCIA, R. M.; MENDES, A. F. N.; COSTA, J. M. F. N.; LEITE, H. G. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, p. 952-957, 2010.

- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2010.
- MOHAMMADBEIGI, A.; PORT, G. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) via contact and ingestion. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n. 2, p.138-146, 2013.
- MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I., FARJIBRENER., A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 3, p.225–247, 2012.
- MOTA FILHO, T. M. M. M.; STEFANELLI, L. E. P.; CAMARGO, R. S.; MATOS, C. A. O.; FORTI, L. C. Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. **Revista Árvore**, v. 45, e4516, 2021.
- MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D. C.; DAVIDSON, E. A. Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. **Ecology**, v. 84, n. 5, p. 1265-1276, 2003.
- MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; BACCI JR, M. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, n. 26, p. 6921-6937, 2017.
- MUELLER, U.G.; KARDISH, M.R.; ISHAK, H.D.; WRIGHT, A.M.; SOLOMON, S.E.; BRUSCHI, S.M.; CARLSON, A.L.; BACCI JR., M. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 10, p.2414-2434, 2018.
- NAGAMOTO N. S., FORTI L. C.; RAETANO C. G. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. **Journal of Pest Science**. v. 80, p. 9-13, 2007.
- NAGAMOTO N.S.; BARBIERI, R. F.; FORTI, L. C.; CARDOSO, S. R. S.; MOREIRA, S. M.; LOPES, J. F. S. Attractiveness of copperleaf-based bait to leaf-cutting ants. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 931-934, 2011.

- NASCIMENTO, M. O.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, D. J. Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Journal of Basic Microbiology**, v.57, p. 699-704, 2017.
- NISHIJIMA, T.; IWAI, K.; SAITO, Y.; TAKIDA, Y.; MATSUE, H. Chronic ingestion of apple pectin can enhance the absorption of quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2583-2587, 2009.
- OTTI, O.; TRAGUST, S.; FELDHAAR, H. Unifying external and internal immune defences. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 11, p.625-634, 2014.
- PALMA, A. M. C. **Iscas biológicas para controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 2016. Monografia (Curso de Engenharia Florestal) - Universidade do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.
- PAREDES, M.; NOLACO, O.; ACUÑA, A.; GUTIÉRREZ, A. I. F. Expresión de genes quitinasas de *Beauveria bassiana* frente a sustratos de *Fusarium oxysporum* y *Peronospora variabilis*. **Scientia Agropecuaria**, vol.7, oct. 2016.
- 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**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.
- PAULI, G.; LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; JUNIOR, E. R. D.; MASCARIN, G. M. Falsa broca aumenta disseminação de *Beauveria bassiana* em populações de campo da broca-do-rizoma da bananeira. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1867-1870, 2011.
- QIU, H-L.; FOX, E. G. P.; ZHAO, D-Y.; XU, J-Z.; QIN, C-S.; Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants. **BIORXIV**, 2018.
- RIBEIRO, M. M. R.; AMARAL, K. D.; SEIDE, V. E.; SOUZA, B. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; KASUYA, M. C. M.; SOUZA, D. J. Diversity of Fungi Associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The Activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, p. 1-6, 2012.
- ROCHA, E. S.; FUJIHARA, R. T.; SILVA, M. A.; MONTAGNOLLI, R. N. **Relatório final de Iniciação Científica FAPESP**. Processo FAPESP 2019/12657-0. 2020.
- ROCHA, S. L.; EVANS, H. V.; JORGE, V. L.; CARDOSO, L. A. O.; PEREIRA, F. S. T.; ROCHA, F. B.; BARRETO, R. W.; HART, A. G.; ELLIOT, S. L. Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **Royal Society Open Science**, v. 4, 2017.

- RODRIGUES, A. CARLETTI, C. D, BUENO, O. C, PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazil Journal of Microbiology**, v.39, p. 64–67, 2008.
- RODRIGUES, A.; SILVA, A.; JR, M. B. FORTI, L. C.; PAGNOCCA F. C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 134, p. 342-345, 2009.
- RODRIGUES, I. M. W.; FILHO, A. B.; GIORDANO, I. B.; DENADAE, B. E.; FERNANDES, J. B.; FORIIM, M. R. Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 4, p. 457-464, 2017.
- ROMERO, A.; RAMOS, E.; ARES, I.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNES- LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A.; MARTÍNES, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 11, n. 252, p. 42-29, 2016.
- ROQUES, B. B.; LEGHAIT, J.; LACROIX, M.Z.; LASSERRE, F.; PINEAU, T.; VIGUIÉ, C.; MARTIN, P.G. The nuclear receptors pregnane x receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p. 997–1039, 2013.
- SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGÉ, J. P. **Atlas of Entomopathogenic Fungi**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988.
- SAMUELS, R.I., PAULA, A.R., CAROLINO, A.T., GOMES, S.A., MORAIS, C.O.P., CYPRIANO, M.B.C., SILVA, L.E.I., RIBEIRO, A., SANTOS, J.W.A.B., SILVA, C.P. Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world 68 applications for mosquito biological control. **Insect Physiology**, v. 6, p. 25-31, 2016.
- SCHOEREDER, J.H; SILVA, H. M. M.; CARVALHO, A.F; MUSCARDI, D.C. Proposed lime stone treatment as pest control fails for the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Crop Protection**, v.42, p. 79- 82, 2012.
- SCHULTZ, T. R. Fungus-Farming Ants (Attini in Part). In: STARR, C. K. (Ed.). **Encyclopedia of social insects**. Springer International Publishing, p. 1-8, 2020.
- SILVA M. E; DIEHL-FLEIG E. Eficiência de três linhagens de *Beauveria bassiana* para o controle de *Acromyrmex* no verão e inverno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15, 1995. Caxambu. **Anais...** Caxambu, SEB, 1995. P. 292.

- SILVA, A.; RODRIGUES, A.; JUNIOR, M. B.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, p. 115-119, 2006.
- SILVA, D. G.; LUCENA JÚNIOR, A.; SARMENTO, R. A.; SILVA, C. L. S.; TENÓRIO, A. C. T.; SOUZA, D. J.; MELO, M. S. Encapsulated baits containing zinc sulfate and *Trichoderma harzianum* reduce fungal garden in *Atta sexdens colonies*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 7, n. 3, p. 46-52, 2020.
- SILVA, I. P., ANDRADE, C. J., NEVES, E. Encapsulamento de óleo de buriti para produção de alimentos funcionais. **Citino**, v. 2, n. 3, p. 18-27, 2012.
- SILVA, J. E. A. et al. Aflatoxins produced by aspergillus nomius ASR3, a pathogen isolated from the leaf-cutter ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 529–532, 2017.
- SILVA, L. C.; CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; TRAVAGLINI, R. V. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus?. **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 484–493, 2015.
- SOPER, F. M.; SULLIVAN, B. W.; OSBORNE, B. B.; SHAW, A. N.; PHILIPPOT, L.; CLEVELAND, C. C. Leaf-cutter ants engineer large nitrous oxide hot spots in tropical forests. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1894, p. 1-7, 2019.
- SOUZA, A; ZANETTI, R.; CALEGARIO, N. Nível de dano econômico para formigas-cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em regiões de Mata Atlântica. **Neotropical Entomology**, v.40, p.483-488. 2011.
- SOUZA-SOUTO, L.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; DA SILVA, W. L. Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 163-166, 2007.
- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1509-1517, 1986.
- STEFANELLI, L.E.P.; MOTA FILHO, T.M.M.; CAMARGO, R.D.S.; MATOS, C.A.O.D.; FORTI, L.C. Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. **Insects**, v.12, n. 1, 10, 2021.

- TAVARES, L. P. S.; HERNANDEZ, G. A. F.; MUSSI-DIAS, V.; SANTOS, A. V.; MOREIRA, D. D. O. FREIRE, M. G. M. Avaliação da mortalidade de formigas cortadeiras por extratos produzidos por fungos. **Revista Perspectivas Online: Biológicas e Saúde**, v.9, n.30, 2019.
- TRAVAGLINI, R. V.; FORTI, L. C.; ARNOSTI, A.; CAMARGO R. S., SILVA LC, CAMARGO-MATHIAS, M. I.; Mapping the adhesion of different fungi to the external integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 5, p. 118-125, 2016.
- TRAVAGLINI, R. V.; STEFANELLI, L. E. P.; ARNOSTI, A.; CAMARGO, R.S.; FORTI, L. C. Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas-cortadeiras. **Tekhne e Logos**. v.8, n.3, p.100-111, 2017.
- 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.
- VINHA, G. L.; ALCÁNTARA-DE-LA- CRUZ, R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; WILCKEN, C. F.; SILVA, E. D.; LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C. Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: biological aspects and control methods. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 82, p. 95-103, 2020.
- WARUMBY, J. F., NETTO, A. M. C. L.; CAVALCANTI, V. A. L. B. Nota prévia sobre o controle biológico da saúva *Atta sexdens rubropilosa* com o fungo *Beauveria bassiana* em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15. Caxambu. **Anais...** Caxambu, SEB, 1995. p. 331.
- WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7, n. 2, p. 157-165, 1980.
- WU, D.C.; XU, F.; SUN, B.; FU, R.W.; HE, H.K.; M, K. Design and preparation of porous polymers, **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3959–4015, 2012.
- ZABALETA, I.; BIZKARGUENAGA, E.; NUNOO, D.B.O.; SCHULTES, L.; LEONEL, J.; PRIETO, A.; ZULOAGA, O.; BENSKIN, J.P. Biodegradation and uptake of the pesticide sulfluramid in a soil-carrot mesocosm. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 5, p.2603–2611, 2018.
- ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An Overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, p. 439-454, 2014.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; VILELA, E. F.; LEITE, H. G.; JAFFE, K.; OLIVEIRA A. C. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 433-442, 2003.

ZANUNCIO, J. C.; LEMES, P. G.; ANTUNES, L. R.; MAIA, J. L. S.; MENDES, J. E.; TANGANELLI, K. M.; SALVADOR, J. F.; SERRÃO, J. E. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals of Forest Science**, v,73, p. 205-214, 2016.