



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**Efectos la Radiación UV-B en la Viabilidad de Conidios
Microencapsulados de *Beauveria bassiana* Aislados de
*Hylurgus ligniperda***

José Ignacio Osses Mardones

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Profesor guía:

Dr. Fabian Figueroa

Concepción - Chile 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de
BOTANICA, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad
de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Fabian Figueroa

Prof. Evaluadores

Dr José Becerra

Dra. Solange Torres

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, junio de 2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la culminación de esta etapa tan significativa en mi vida.

En primer lugar, a mi familia, y especialmente a mis padres, quienes han sido el pilar fundamental en mi formación. Gracias a sus enseñanzas y valores, he podido concluir con éxito mi carrera. A mi hermana, quien ha sido mi fuerza y motivación para no rendirme; su ejemplo constante me ha inspirado a seguir adelante y superar los desafíos.

A mi compañera Javiera, por su apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado, animándome incluso en los momentos de duda. Tu confianza en mí ha sido invaluable.

Agradezco profundamente al profesor José Becerra, una de las personas más influyentes que he conocido durante mi trayectoria universitaria. Su confianza y motivación han sido esenciales para alcanzar mis objetivos. A mi profesor guía, Fabián Figueroa, por su apoyo incondicional en momentos complejos; su orientación y comprensión fueron cruciales para avanzar en mi trabajo.

Mi gratitud también va para la profesora Solange Torres, quien, con sus amplios conocimientos en el mundo fungi, siempre me guió con precisión. Asimismo, quiero destacar el apoyo constante de la profesora Claudia Pérez, quien siempre se preocupó por mi avance y trabajo en el laboratorio, brindándome orientación y seguimiento en cada etapa del proceso.

Finalmente, a todo el equipo del laboratorio de química de productos naturales, por su colaboración y compañía durante este tiempo. Su ayuda fue vital para el éxito de este proyecto.

También agradecer al Proyecto Fondecyt Iniciación 11220598 y Fondef IdeA ID23I10099

A todos, mi más profundo agradecimiento.

Contenido	
Agradecimientos.....	3
Resumen	7
Introducción.....	9
Pregunta de investigación	17
Hipótesis.....	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Metodología.....	18
Obtención del material biológico.....	19
Cultivo hongos medio sólido.....	19
Cultivo en grano.....	20
Colecta y conteo de conidios	20
Preparación de microencapsulados mediante secado por aspersión	21
Morfología de los conidios y Microencapsulados.....	22
Ensayos de tolerancia a los rayos UV-B.....	23
Tolerancia a los rayos UV-B de conidios de <i>Bauveria bassiana</i> aislados de <i>Hylurgus ligniperda</i>	24
Efecto de los rayos UV-B de conidios microencapsulados de <i>Bauveria bassiana</i>	25
Secado por punto critico	26
Análisis Estadístico.....	26
Resultados	27
Condiciones de cultivo para <i>Bauveria bassiana</i>	27
Tolerancia a la radiación UV-B de conidios de <i>Bauveria bassiana</i> aislados de <i>Hylurgus ligniperda</i>	29
Microesferas mediante secado por aspersión	32
Efecto de la radiación UV-B de conidios microencapsulados de <i>Bauveria bassiana</i>	34
Análisis estadístico	38
Discusión.....	39
Conclusión.....	46

Bibliografia.....	48
-------------------	----

Resumen

La radiación ultravioleta emitida de la luz solar es uno de los factores abióticos más dañinos para la viabilidad de las esporas de hongos entomopatógenos que son aplicados en superficies expuestas al sol, como las hojas y suelo en el control de plagas. Aunque estos hongos son generalmente sensibles a la radiación UV, existe una notable variabilidad en su susceptibilidad, tanto entre especies como dentro de una misma especie, reflejando adaptaciones naturales a diferentes condiciones ambientales. Para mitigar el daño causado por la radiación UV, se han desarrollado varios métodos, destacando la microencapsulación. Esta técnica envuelve las esporas en una matriz protectora, aislándolas de los efectos perjudiciales de la radiación UV y mejorando su viabilidad y eficacia en el control de plagas.

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la radiación UV-B en la viabilidad celular de conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana*, aislado de *Hylurgus ligniperda*, utilizando una combinación de maltodextrina y goma arábiga como material de recubrimiento. En particular, se analizará cómo la variación en las proporciones de los polímeros utilizados afecta tanto las características físicas de las microcápsulas como su capacidad para preservar la viabilidad de los conidios de *Beauveria bassiana*. Además, se evaluará el papel crucial de la radiación ultravioleta UV-B como un factor abiótico que influye en la viabilidad y estabilidad de las microcápsulas. Para ello, se evaluaron distintas matrices poliméricas microencapsulantes con el objetivo de determinar su efectividad frente a la radiación UV-B, con el fin de desarrollar un encapsulado de alta calidad y eficacia. Los

resultados evidenciaron que la formulación 10% de maltodextrina y 10% de goma arábica fue la más efectiva, reportándose una tasa de germinación del 77.3% después de tres meses de almacenamiento. Morfológicamente las microcápsulas obtenidas fueron principalmente esféricas, con algunas hendiduras y superficies lisas, y tamaños de partícula que oscilaron entre 2.5 y 9 μm . Por otra parte, al exponer el microencapsulado a una radiación de 1500 mW/m² no se observaron alteraciones morfológicas de los microencapsulados ni la capacidad de germinación de los conidios. contrariamente, los conidios desnudos fueron altamente sensibles a la misma intensidad de radiación, mostrando una significativa disminución en su viabilidad, subrayando la eficacia de la microencapsulación como método de protección. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que futuros estudios sean orientados en optimizar la formulación con la finalidad de aumentar la resistencia a la radiación UV-B de los conidios encapsulados y evaluar su efectividad in situ en aplicaciones a gran escala dentro de programas de control biológico de plagas.

Introducción

El espectro ultravioleta se separa en tres rangos de longitud de onda con niveles crecientes de energía: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (100-280 nm) (Braga et al., 2015). La capa de ozono en la estratosfera terrestre absorbe estas bandas de forma selectiva, bloqueando por completo las longitudes de onda por debajo de 290 nm. Como resultado, solo los rayos UV-A y B logran llegar a la superficie del planeta. (Williamson et al., 2014). Durante los últimos años, se ha evidenciado un aumento en el daño de la capa de ozono, lo que ha permitido una mayor incidencia de la radiación UV-B a la tierra o a los ecosistemas (Egorova et al., 2023). Este fenómeno es preocupante debido a que la alta exposición a la radiación solar ultravioleta puede resultar perjudicial, causando una serie de modificaciones en la forma, función y química tanto a nivel celular como a nivel de organismos completos. Estos cambios no solo afectan al individuo, sino que también pueden influir en la composición y dinámica de la comunidad, así como en el funcionamiento y los servicios ofrecidos por los ecosistemas (Mishra et al., 2017).

En relación con los hongos, los efectos de la radiación solar están determinados por varios factores clave, como la duración de la exposición, la longitud de onda y la intensidad de los fotones que inciden en las células (Fuller et al., 2015). Entre los tipos de radiación UV, la radiación UV-B (280-315 nm) es particularmente dañina para los hongos debido a su capacidad de penetrar en la atmósfera terrestre y afectar directamente a las biomoléculas celulares. A nivel celular, el daño puede surgir de la absorción directa de estas longitudes de onda UV-B, o de forma

indirecta, donde los rayos UV-B son absorbidos por compuestos intermedios, resultando en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan daños oxidativos en otros componentes celulares (Cadet et al., 2006). El ADN y el ARN son especialmente vulnerables a la radiación UV-B, dado que presentan altos coeficientes de absorbancia para estas longitudes de onda, lo que conduce a la formación de dímeros de pirimidina. Estos dímeros pueden interferir en los procesos transcripcionales y afectar la replicación celular, comprometiendo la viabilidad del organismo (Jiang et al., 2009). Otros componentes celulares, como los aminoácidos aromáticos, también absorben radiación UV, aunque en menor medida. Esta absorción puede causar fotofragmentación, un proceso en el que las moléculas se descomponen en fragmentos más pequeños, reduciendo la especificidad enzimática y otras funciones biológicas críticas (Kang et al., 2005). Este fenómeno de daño por exposición a la radiación UV-B es especialmente relevante para los hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, donde la viabilidad de los conidios es crucial para su eficacia como agente de control biológico. Los hongos entomopatógenos son conocidos por su capacidad para parasitar una amplia variedad de artrópodos y se destacan por su amigabilidad ambiental y la persistencia en el ambiente sin inducir resistencia en las plagas, a diferencia de los insecticidas químicos (Braga et al., 2001). Sin embargo, la exposición a la luz UV -B puede afectar negativamente la viabilidad y eficacia de estos hongos (Fernandes et al., 2007). La radiación UV-B puede inducir daños en el ADN y ARN de los hongos entomopatógenos, alterando su capacidad para reproducirse y desarrollarse. Además, la generación de ROS debido a la absorción de radiación UV-B puede comprometer la integridad celular, afectando la fisiología

general del hongo y su capacidad para parasitar insectos eficazmente. Por lo tanto, entender cómo la radiación UV-B impacta a estos hongos es crucial para optimizar su uso en el control biológico y para desarrollar estrategias de protección, como la microencapsulación, que puede ayudar a mitigar estos efectos adversos (Inglis et al., 1995).

Hoy en día se han identificado alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos que afectan a los artrópodos, siendo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* las especies más utilizadas en el control de plagas. Ambas pertenecen al orden Hypocreales y sobresalen por su capacidad para parasitar una amplia variedad de hospederos. (Dauda et al., 2018).

El mecanismo de acción o el ciclo de infección de los hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, comienza con la dispersión de sus esporas asexuales (conidios) por el viento, la lluvia o vectores artrópodos. Estos conidios se adhieren a la cutícula del insecto mediante fuerzas electrostáticas y químicas. Al rehidratarse y recibir estímulos químicos, germinan y forman una estructura especializada llamada apresorio, o una clavija de penetración, que permite que las hifas del hongo atraviesen la cutícula del huésped utilizando enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas, lipasas) y presión mecánica. Al llegar a la hemolinfa, el hongo cambia su morfología a blastosporas unicelulares, explotando los nutrientes, colonizando los tejidos internos y evadiendo el sistema inmunológico del insecto. Además, el hongo puede secretar metabolitos tóxicos que suprimen el sistema inmunológico del huésped, facilitando la colonización. Finalmente, el huésped muere y el hongo

produce nuevos conidios infecciosos en el cadáver momificado del insecto, reiniciando el ciclo de vida del patógeno (Humber, 2008).

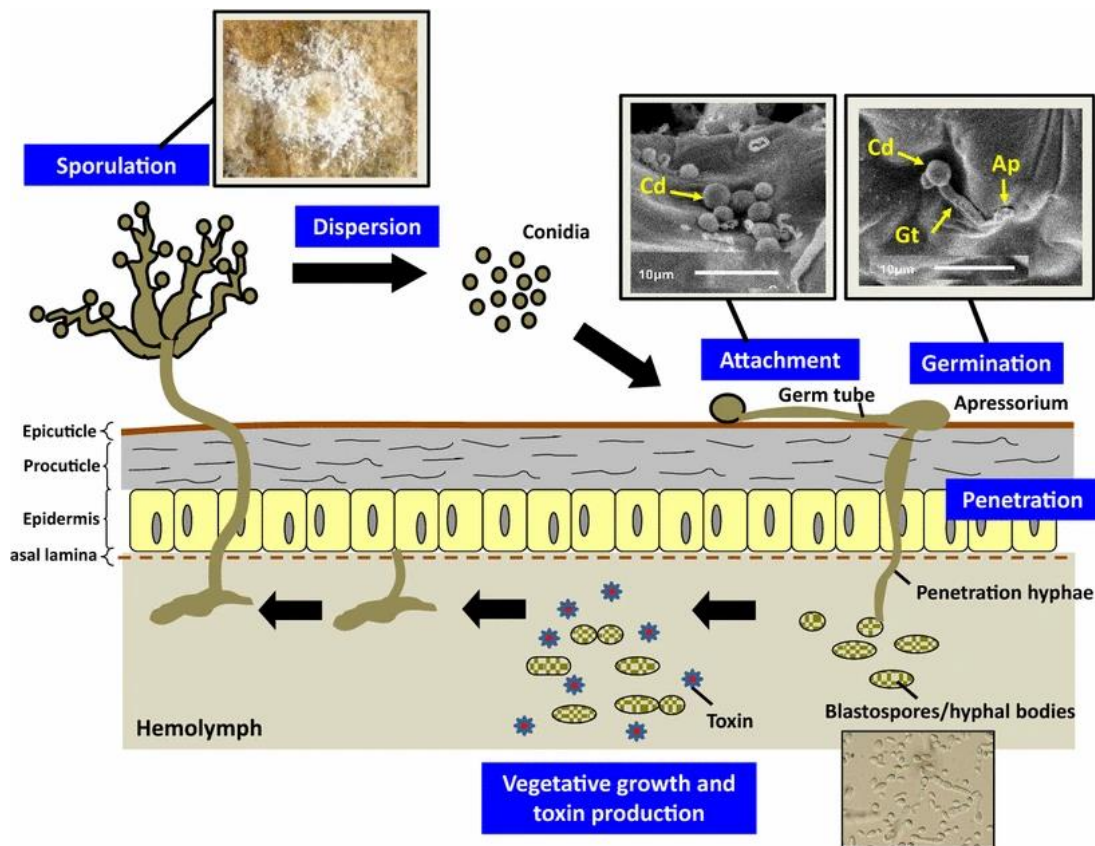


Figura 1. Mecanismo de infección de un hongo entomopatógeno (Humber, 2008).

Para mitigar los efectos negativos de la radiación UV-B y asegurar la viabilidad de los hongos entomopatógenos, se han desarrollado diversas estrategias de protección que potencian su efectividad como agentes de control biológico. En este sentido, la microencapsulación destaca como una técnica prometedora para preservar la eficacia de los conidios de hongos entomopatógenos en el control de

plagas. La microencapsulación implica la creación de una capa delgada que rodea completamente a los materiales encapsulados, como partículas sólidas, gotas de líquido o moléculas de gas, formando así el núcleo del material encapsulado (Krasaekoopt et al., 2004). La técnica de microencapsulación de microorganismos como los hongos, permite proteger las células y extender su viabilidad por un período prolongado. Este método es adecuado para agentes sensibles al calor, tanto solubles como insolubles en agua, así como para polímeros con propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas (Samborska et al., 2005). Aunque hay diversas alternativas disponibles para la microencapsulación, el empleo de la técnica de secado por aspersión se presenta como una opción favorable para el secado de materiales biológicos sensibles al calor, como enzimas y proteínas o incluso los conidios de hongos entomopatógenos, minimizando la pérdida de su actividad (Ré, 2006). Además, el secado por aspersión destaca en la microencapsulación debido a su reproducibilidad, rapidez y capacidad de escalabilidad. A la vez, es altamente eficiente y representa una alternativa considerablemente más económica en comparación con la liofilización (Oomah & Mazza, 2001).

Por otra parte, la elección de las matrices de encapsulación desempeña un papel crucial en determinar las propiedades físicas y funcionales de los productos microencapsulados (Haghshenas et al., 2015). En este se pueden utilizar varios compuestos como revestimiento o pared en el proceso de encapsulación. Dentro de las matrices más utilizadas para el recubrimiento de compuestos bioactivos se destacan los polisacáridos como la maltodextrina, los almidones, la goma arábiga y la inulina debido a su diversidad, bajo costo y muchas aplicaciones en la industria

alimentaria, (Fernandes et al., 2014). La maltodextrina es ampliamente preferida como material de recubrimiento debido a su baja viscosidad a concentraciones elevadas de sólidos, su costo accesible, sabor neutro y eficaz capacidad para proteger contra la oxidación, aunque su capacidad de emulsión es limitada (Korma et al., 2019). Además, la goma arábiga, caracterizada por su alta solubilidad, baja viscosidad y excelentes propiedades emulsionantes, también se destaca como un material de recubrimiento adecuado (Korma et al., 2019) .

Debido a su amplia diversidad de aplicaciones, la microencapsulación por secado por aspersión actuará como un mecanismo de protección, de acuerdo con la composición química, polaridad, solubilidad, propiedades físicas y funcionales de cada matriz, mejorando aspectos como: *i*) la vida útil. del analito al evitar la oxidación, como en el caso de los aceites esenciales o vitaminas liposolubles; *ii*) prolongar la estabilidad y actividad funcional de compuestos termolábiles o altamente reactivos, como los antioxidantes; *iii*) facilitar la incorporación de compuestos insolubles, debido a la interacción que se facilita entre el material encapsulante y el medio o solvente en el cual se va a dispersar; *iv*) conservar los perfiles de aroma y sabor por un tiempo más prolongado; y por último, *v*) la biodisponibilidad de nutrientes al facilitar la liberación controlada en los sitios requeridos de interacción, entre otros beneficios (Rodriguez-Amaya, 2016).

En un estudio realizado por Amiet-Charpentier et al., 1998 donde se utilizó secado por aspersión con recubrimientos derivados del almidón para encapsular rizobacterias se reportó que la mejor supervivencia de las bacterias almacenadas fue de alrededor del 25 %. Posteriormente Liu & Liu, 2009 utilizaron secado por

aspersión a baja temperatura para microencapsular los conidios de *Beauveria bassiana* en varias matrices poliméricas, observando una mayor tasa de germinación en comparación con los conidios no encapsulados.

Recientemente, se ha aislado una cepa de hongo entomopatógeno capaz de infectar a *Hylurgus ligniperda*, clasificado como *Beauveria bassiana*. Este hongo es reconocido como un agente de biocontrol ambientalmente seguro, que no presenta un problema para la salud humana y generalmente es inofensivo para los organismos no objetivo (Zimmermann, 2007). Esta identificación ofrece una oportunidad única para desarrollar un bioinsecticida o repelente efectivo contra esta plaga que afecta las plantaciones forestales del país.

Considerando los antecedentes expuestos, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la radiación UV-B en la viabilidad celular de conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana*, aislado de *Hylurgus ligniperda*, utilizando una combinación de maltodextrina y goma arábiga como material de recubrimiento. En particular, se analizará cómo la variación en las proporciones de los polímeros utilizados afecta tanto las características físicas de las microcápsulas como su capacidad para preservar el potencial infeccioso de *Beauveria bassiana*. Además, se evaluará el papel crucial de la radiación ultravioleta UV-B como un factor abiótico que influye en la viabilidad y estabilidad de las microcápsulas. Para ello, se evaluaron distintas matrices poliméricas microencapsulantes con el objetivo de determinar su efectividad frente a la radiación UV-B, con el fin de desarrollar un encapsulado de alta calidad y eficacia.

Pregunta de investigación

¿Cómo se puede proteger la capacidad insecticida de los conidios del hongo *Beauveria bassiana* contra los efectos perjudiciales de la radiación UV?

Hipótesis

La microencapsulación de conidios del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* evita el daño provocado por la radiación ultravioleta de tipo UV-B y mantiene la viabilidad

Objetivo general

Determinar el efecto de la radiación UV-B en la viabilidad celular conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana*.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el efecto de la radiación UV-B en la morfología y tasa de germinación de los de conidios de *Beauveria bassiana*
- 2- Analizar el impacto de la variación del material encapsulante en la protección de los conidios de *Beauveria bassiana*
- 3- Determinar la eficacia las formulaciones en la protección de los conidios de *Beauveria bassiana* contra los efectos de la radiación UV-B.

Metodología

Diagrama de Flujo del Protocolo Experimental en el Estudio de Tolerancia a UV- B de Conidios Microencapsulados

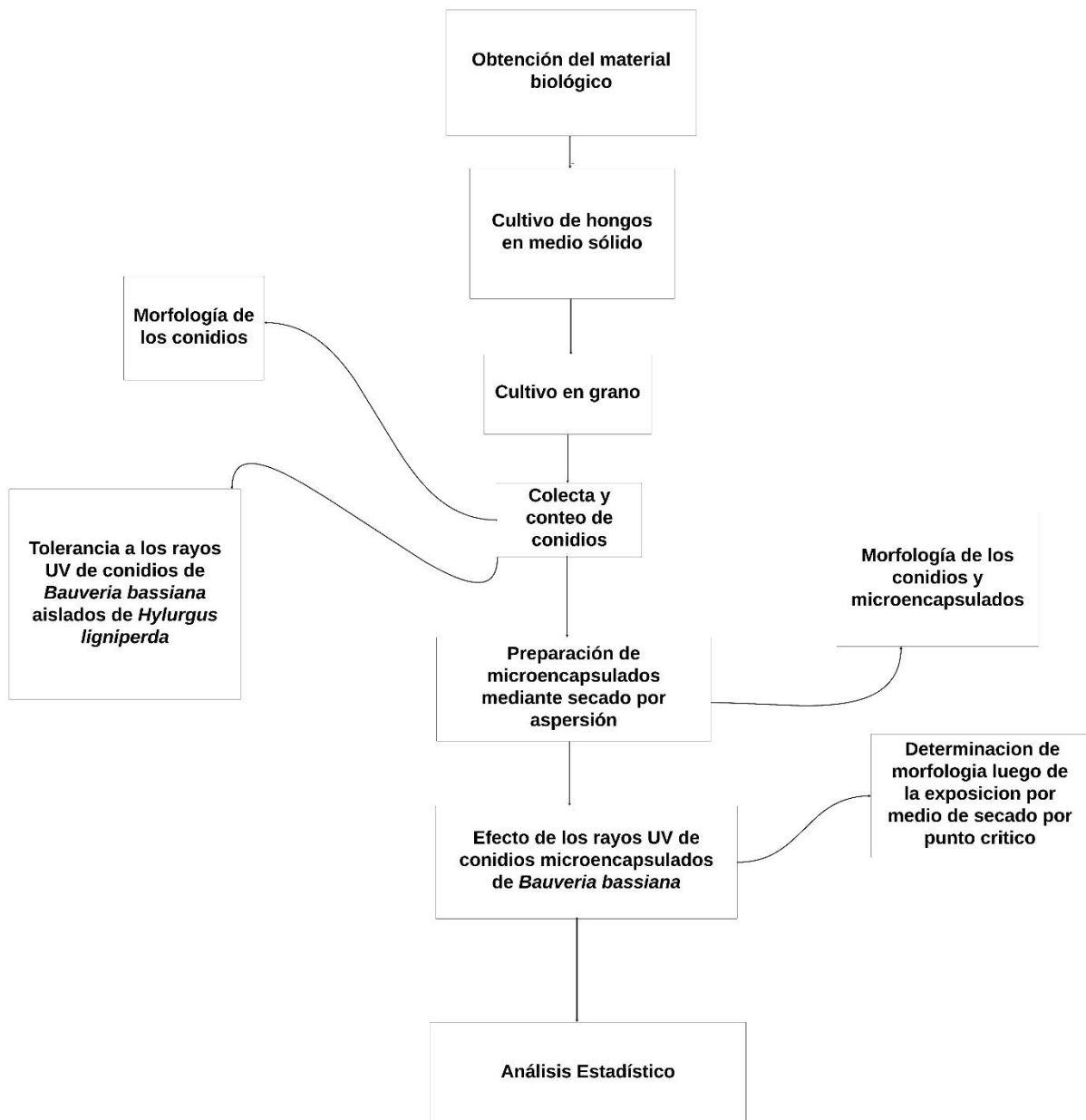


Figura 2. Diagrama de flujo del diseño experimental que ilustra los pasos desde el cultivo de hongos hasta el análisis estadístico, incluyendo la preparación y evaluación de conidios y microencapsulados.

Obtención del material biológico

El material biológico se obtuvo directamente de un espécimen de *Hylurgus ligniperda* infectado colectados desde un aserradero en la comuna de Cabrero, región del Bio-Bio. Posteriormente la muestra fue trasladada al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción y fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso. La determinación taxonómica de la especie recolectada se realizó observando los caracteres microscópicos bajo un microscopio óptico trinocular AmScope modelo T670B sobre secciones de material fresco, montado en agua, KOH al 5%, floxina y reactivo de Melzer, utilizando bibliografía base (Gamundi, 1971).

Cultivo hongos medio sólido

Para el cultivo en medio sólido, se utilizó un medio de malta al 2% en placas Petri de 60 mm de diámetro, extrayendo el micelio en expansión directamente del *H. ligniperda* infectado. Para el cultivo en medio líquido, la especie en estudio se sembró en matraces de un litro con 600 ml de medio de malta al 2% . Estos medios fueron cultivados bajo agitación constante (12' rpm) y a temperatura ambiente durante un período aproximado de 10 días. Se utilizó la metodología de Varnero et al., 2010 con pequeñas modificaciones.

Cultivo en grano

Posterior al crecimiento en medio líquido se inoculan sustratos sólidos para una mayor propagación de los conidios en el medio inoculado, se sembró en frascos de vidrio con granos de trigo previamente hidratados y esterilizados, dejándolos incubar por aproximadamente 10 días para la generación de conidios. (Varnero et al., 2010)

Colecta y conteo de conidios

La colecta de conidios se realizó siguiendo lo descrito por (Kokue et al., 2019) agregando agua destilada estéril directamente sobre los cultivos que presentaban conidios, La masa sólida se agitó suavemente para facilitar el arrastre. Luego se tomó una alícuota de conidios para el conteo específico en una cámara Neubauer. Para el conteo se uso la fórmula mostrada a continuación siguiendo lo propuesto en Gerónimo-Torres et al., 2016).

$$\frac{\text{N de células}}{\text{\# cuadrados grandes}} \cdot \frac{1 \text{ Cuadro}}{L \cdot A \cdot P \text{ mm}^3} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \cdot \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ CEL}}{\text{mL}}$$

Preparación de microencapsulados mediante secado por aspersión

Para la obtención del producto seco a partir de las formulaciones se utiliza la tecnología del secado por aspersión utilizando el instrumento BÜCHI Mini Spray Dryer B-290



Figura 3. Equipo de secador por aspersión BÜCHI Mini Spray Dryer B-290.

Los microencapsulados se prepararon utilizando un proceso de secado por aspersión a baja temperatura siguiendo la metodología base de Liu & Liu, 2009. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: temperaturas de entrada y salida de 80/30°C, velocidad de alimentación de 0,45/0,24 L/h; y presión de aire de 5/7,5 kg/cm². Para la matriz de encapsulación, se prepararon tres formulaciones distintas:

Formulación A: 10% p/v maltodextrina / 10% p/v goma arábica

Formulación B: 20% p/v maltodextrina / 10% p/v goma arábica

Formulación C: 30% p/v maltodextrina / 10% p/v goma arábica

Posteriormente y para cada formulado se agregaron 10 ml de una suspensión que contenía conidios de *H. ligniperda* ($2,5 \times 10^6$ esporas/ml) del cultivo sólido en una solución de Tween 80 al 0,01% a 90 ml de la solución compuesta es decir con el contenido de maltodextrina y goma arábiga correspondiente a cada formulación. La compatibilidad entre el polímero y el hongo se verificó antes del inicio del proceso de microencapsulación. Solo se utilizaron las microcápsulas recolectadas en el fondo del colector para exámenes adicionales y pruebas de almacenamiento.

Morfología de los conidios y Microencapsulados

Las muestras se recogieron mediante centrifugación a $3000 \times g$, se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato de sodio 0,2 M (pH 7,2) y luego se fijaron posteriormente durante 2 h con tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato. Las muestras se deshidrataron con una serie de lavados con acetona (50-100%) y se secaron mediante secado de punto crítico (CPD). Después del recubrimiento metálico, las imágenes fotográficas se registraron utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM) en el Centro de Espectroscopía y Microscopía, CESMI, de la Universidad de Concepción.

Se determinó el tamaño de partícula de cada formulación utilizando el diámetro de Feret a través de la escala entregada por el microscopio (10 μm para tamaño y 5 μm para superficie) y la ayuda del programa de medición ImageJ. Se confecciona histogramas de tamaños de encapsulados a partir del tratamiento de los datos

obtenidos desde las imágenes para las distintas formulaciones (N:100 partículas) utilizando herramientas Excel y GraphPad 8

Ensayos de tolerancia a los rayos UV-B.

Los ensayos se realizaron a una intensidad de radiación de UV-B 1500 mW/m^2 de radiación UV-B (Quaite et al., 1992a , Quaite et al., 1992) producida por una lámpara fluorescente TL 20W/12 RS (Philips, Eindhoven, Holanda). principalmente con UV-B (pico a 313 nm) con salida mínima de radiación UV-A a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta irradiancia se aproxima a la luz solar del mediodía del mes de diciembre en Concepción, Bio-Bio, según Braga et al. (2001). La irradiancia espectral se midió con un espectrorradiómetro Ocean Optics USB 2000 (Dunedin, FL).

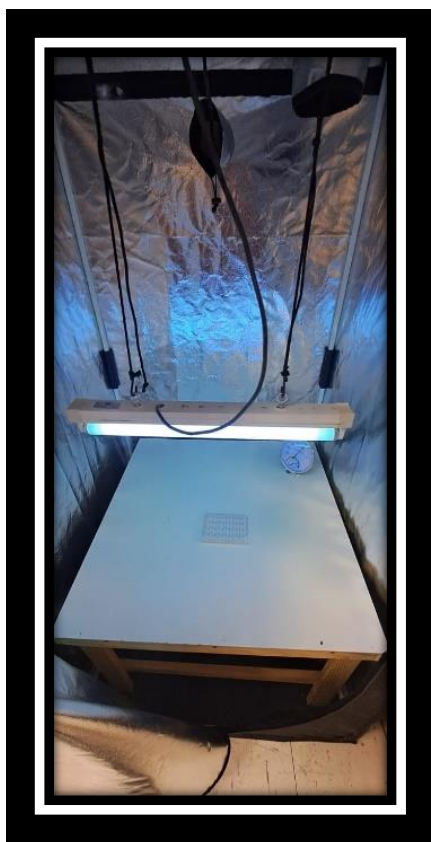


Figura 4. Cámara de irradiación de conidios de hongos entomopatógenos con una lámpara TL 20W/12 RS (Philips, Holanda) a 1500 mW/m² de UV-B (pico a 313 nm) y mínima UV-A.

Tolerancia a los rayos UV-B de conidios de *Bauveria bassiana* aislados de *Hylurgus ligniperda*.

Se realizó una prueba preliminar utilizando conidios desnudos de *Beauveria bassiana* expuestos a una radiación de 1500 mW/m² durante intervalos de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. Se preparó un stock inicial de 100 ml de una solución acuosa con una concentración de 2.5×10^6 conidios/ml., distribuyéndose en placas de espectrofotometría de 24 pocillos, cada uno con una capacidad de 3 ml. Inmediatamente después de la exposición, se extrajo un volumen de 50 µl y se incubó en la oscuridad a 26°C en placas Petri con agar/malta al 2%. La germinación se evaluó a 400X de aumento a las 24 y 48 horas después de colocar los conidios en el medio. Se consideró que los conidios habían germinado si presentaban un tubo germinal más largo que el diámetro del conidio. Se evaluaron 300 conidios por cada intervalo de tiempo. Los conidios se tiñeron con una gota de solución de azul de metileno para facilitar el conteo. La tasa de germinación después de cada período de incubación se calculó mediante la ecuación correspondiente.

$$\text{Tasa de germinación} = \left(\frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Número total de conidios evaluados}} \right) \times 100\%$$

Efecto de los rayos UV-B de conidios microencapsulados de *Bauveria bassiana*

Se evaluó el efecto de la radiación UV-B sobre la viabilidad de conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana*, aislados de *Hylurgus ligniperda*. en donde se depositaron 10 miligramos de cada formulacion (A, B y C) y se diluyeron en 10 ml de agua, posteriormente se expusieron a una radiación UV de 1500 mW/m² durante un período de dos horas.

Después de la exposición a la radiación, se extrajo 50 µl se evaluó la tasa de germinación de los conidios a las 24 y 48 horas de incubación desde el momento en que se colocaron en el medio de cultivo La tasa de germinación después de cada período de incubación se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Tasa de germinación} = \left(\frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Número total de conidios evaluados}} \right) \times 100\%$$

Se consideró que un conidio había germinado si presentaba un tubo germinal más largo que el diámetro del conidio esto en base a Abalo, 2023. Para cada tiempo evaluado, se contaron un total de 300 conidios por formulación.

Secado por punto critico

Para visualizar la morfología de las microcápsulas después de la exposición a la luz UV-B, se utilizó el método de secado por punto crítico siguiendo (ANDERSON, 1951). Las muestras de microcápsulas de *Beauveria bassiana* se colocaron en pocillos especiales con filtros de membrana de 0.22 micras, y para muestras más grandes, en pocillos con rejillas. Se añadió alcohol o acetona en la cámara de trabajo hasta cubrir las muestras, luego se selló y se enfrió hasta 4°C utilizando la válvula azul. Posteriormente, se llenó la cámara con CO₂ líquido mediante la válvula verde y se agitó durante 10 minutos. Después, se abrió la válvula negra para eliminar la mitad del contenido, repitiendo este proceso cuatro veces. En el quinto ciclo, la cámara se llenó parcialmente y se aumentó la temperatura a 32°C. Finalmente, se abrió la válvula roja para liberar el CO₂ en forma gaseosa, completando así el secado por punto crítico.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas de viabilidad se analizaron estadísticamente para determinar el efecto de la radiación UV-B en conidios desnudos y sobre cada una de las formulaciones. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias en la viabilidad entre las tres formulaciones y determinar la significancia estadística de los resultados. Los análisis estadísticos llevados a cabo en este estudio se realizaron a través del software Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

Resultados

Condiciones de cultivo para *Bauveria bassiana*

El examen microscópico de este hongo aislado de *Hylurgus ligniperda* mostró colonias miceliales que crecían rápidamente en el medio malta al 2% a una temperatura de 26°C. El micelio presento un color blanco al inicio del crecimiento, que se vuelve amarillo a medida que transcurre el periodo de incubación. Las células conidiógenas o conidios se originaron solas, en espirales a partir de hifas vegetativas o en grupos a partir de células del tallo hinchadas. Los conidios hialinos tienen forma elipsoidal o globosa con bases ligeramente puntiagudas o redondeadas, con un tamaño promedio que oscilaba entre 2 y 2,5 μm . Estas observaciones se ajustaron a Domsch et al. (1980) cuando describieron *Bauveria bassiana*.

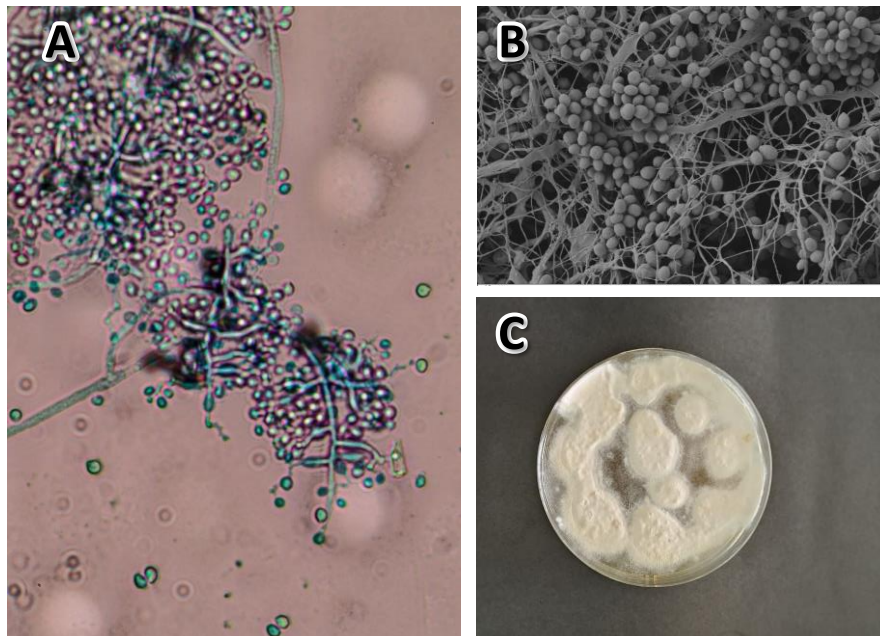


Figura 5. **A.** Micrografía óptica de hifas y conidios teñidos con reactivo Melzer. **B** Imágenes SEM de *Bauveria bassiana* que muestran células conidiogénicas producidas en grupos. **C** Crecimiento y morfología micelial de *Bauveria bassiana* aislado de *Hylurgus ligniperda* en medio malta al 2% a 25 °C durante 7 días.

Para la obtención de los conidios, se llevó a cabo una fermentación en estado sólido utilizando arroz cocido al vapor en bolsas de polipropileno. Tras 7 días de cultivo en este medio, se recolectó una masa de esporas utilizando un tamiz.



Figura 6. Grano integral colonizado por *Beauveria bassiana* después de 10 días de incubación. En la imagen se observa el crecimiento micelial del hongo sobre la

superficie del grano, formando una red densa de hifas. El micelio ha penetrado la superficie del grano, lo que demuestra la capacidad del hongo para colonizar y degradar material vegetal.

Tolerancia a la radiación UV-B de conidios de *Bauveria bassiana* aislados de *Hylurgus ligniperda*.

Se evaluó la tolerancia de los conidios de *Beauveria bassiana* a los rayos UV-B, utilizando microfotografías de microscopía electrónica de barrido para observar los efectos de la exposición a la luz UV-B. Se observó que la irradiación causó daño significativo a los conidios e hifas, incluyendo deshidratación y ruptura de las estructuras celulares.

Además, se realizó un análisis de la tasa de germinación de los conidios después de ser expuestos a luz UV-B durante diferentes periodos de tiempo, que abarcaban desde 0 hasta 180 minutos en intervalos de 30 minutos. Se encontró que la tasa de germinación de los conidios fue inversamente proporcional al tiempo de exposición a la luz (Figura 7).

Efeco de la radiación UV-B (1500 mW/m²) sobre la germinación de *B. bassiana*
(24h)

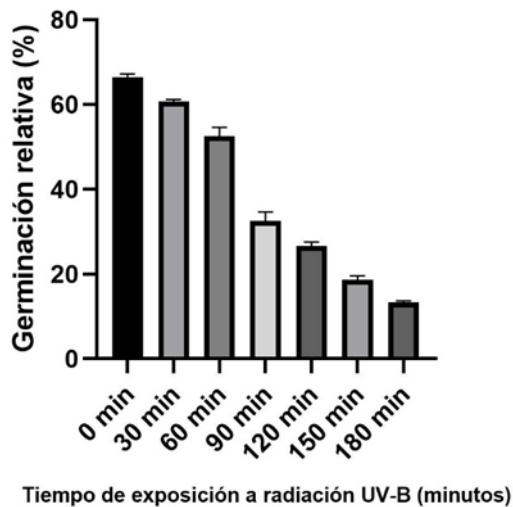


Figura 7. Porcentaje de germinación relativa de aislamientos de *Bauveria bassiana* después de exposición a diferentes tiempos de exposición UV-B luego de 24 horas de incubación.

Específicamente, se observó un retraso significativo en la germinación de los conidios después de 24 horas de exposición a la luz , seguido de una recuperación gradual de germinación después de 48 horas (Figura 8).

Efeco de la radiación UV-B (1500 mW/m²) sobre la germinación de *B. bassiana*
(48h)

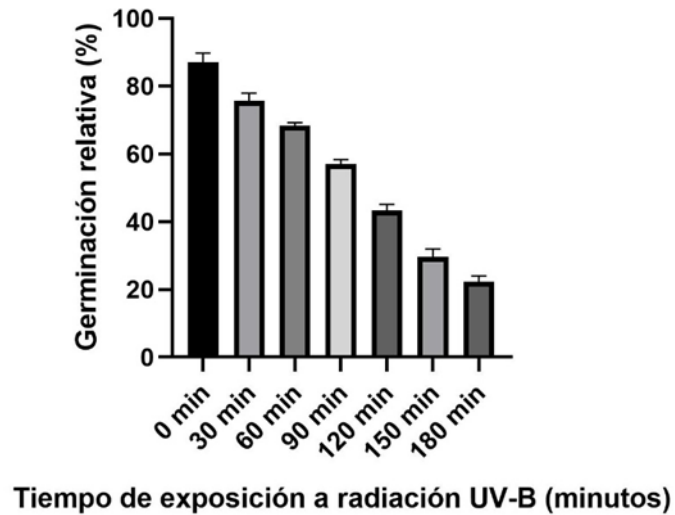


Figura 8. Germinación relativa de aislamientos de *Bauveria bassiana* después de exposición a diferentes tiempos de exposición UV-B luego de 48 horas de incubación.

Las tasas de germinación de los conidios de *Bauveria bassiana* tras diferentes tiempos de exposición a una irradiancia UV-B de 1500 mW/m² se evaluaron a las 24 y 48 horas de incubación. Los resultados, muestran una disminución significativa en la tasa de germinación con el aumento del tiempo de exposición. Estos resultados indican que la exposición prolongada a la radiación UV-B tiene un efecto negativo significativo sobre la viabilidad de los conidios de *Bauveria bassiana*, con una reducción notable en su capacidad de germinación.

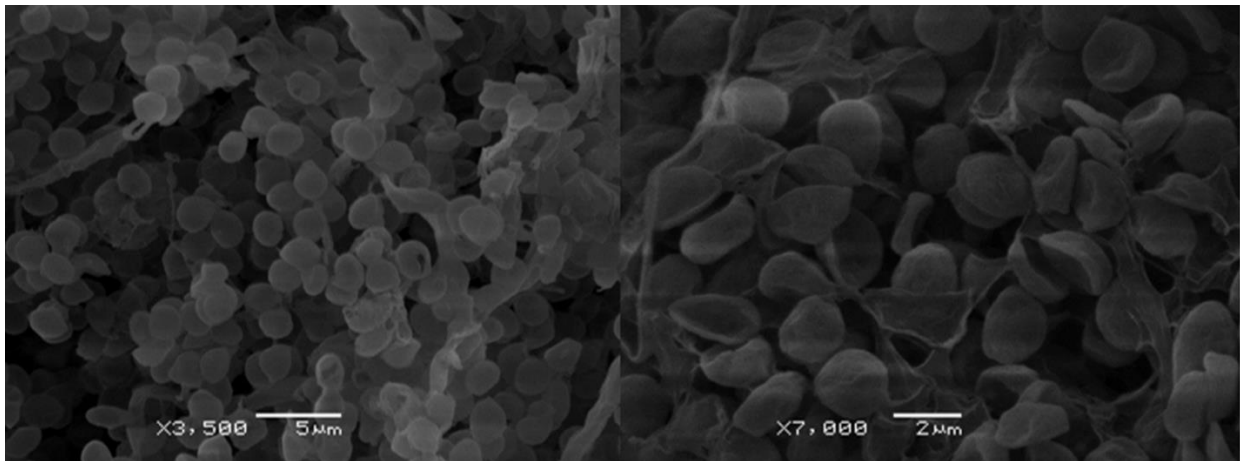


Figura 9. Microfotografía de microscopía electrónica de barrido que muestra los efectos de la radiación UV-B en los conidios y hifas de *Beauveria bassiana* después de la exposición a la irradiación UV-B durante 180 minutos a una irradiancia de 1500 mW m².

Microesferas mediante secado por aspersión

Se utilizaron tres formulaciones distintas para la microencapsulación de conidios de *Beauveria bassiana* aislados de *Hylurgus ligniperda*. Las microcápsulas producidas bajo estas condiciones óptimas mostraron diversas características morfológicas dependiendo de la formulación. Las microcápsulas de las formulaciones A y B fueron

mayoritariamente esféricas, con algunas hendiduras y superficies lisas. El tamaño de las partículas en estas formulaciones osciló entre 2.5 y 9 μm (Figura 9).

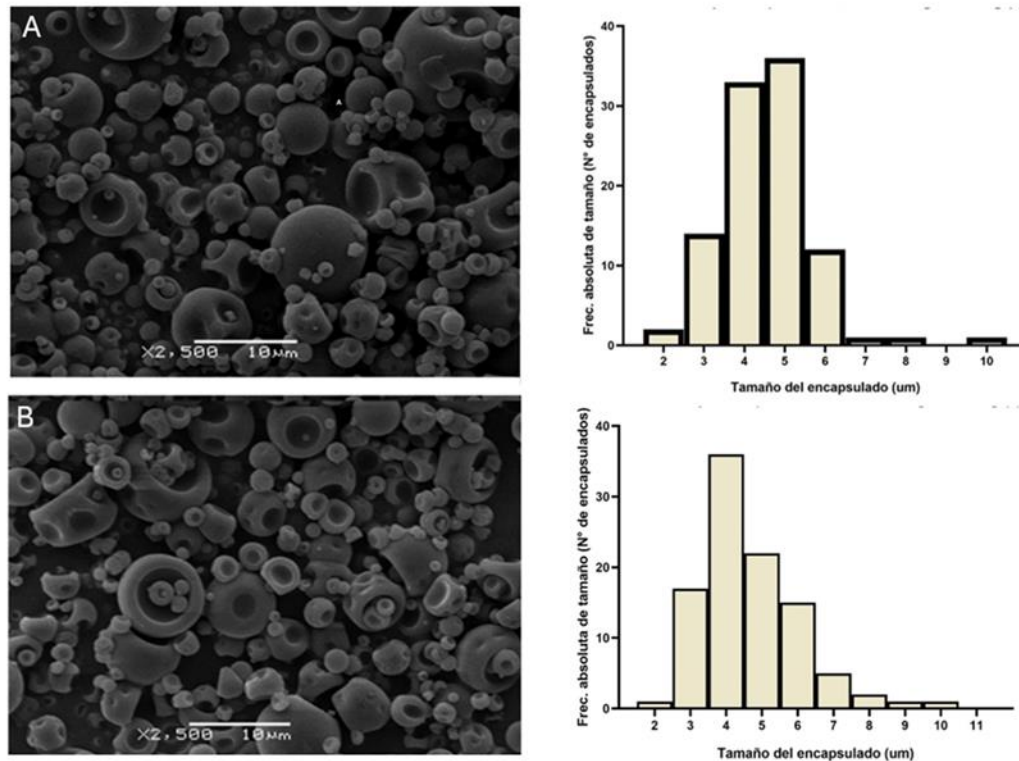


Figura 10. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (línea de referencia= $10\mu\text{m}$) e Histograma de frecuencia de tamaños de encapsulados (N=100) desde muestra de encapsulados de formulación A y B respectivamente, luego del proceso de secado por aspersión.

Por otro lado, la Formulación C produjo microcápsulas que mantenían una forma esférica con un menor porcentaje de hendiduras, pero presentaban superficies más

porosas y, en algunos casos, ruptura de la matriz. El tamaño de las partículas de la Formulación C varió en un rango de 5 a 35 μm es decir un tamaño mayor comparados con A y B.

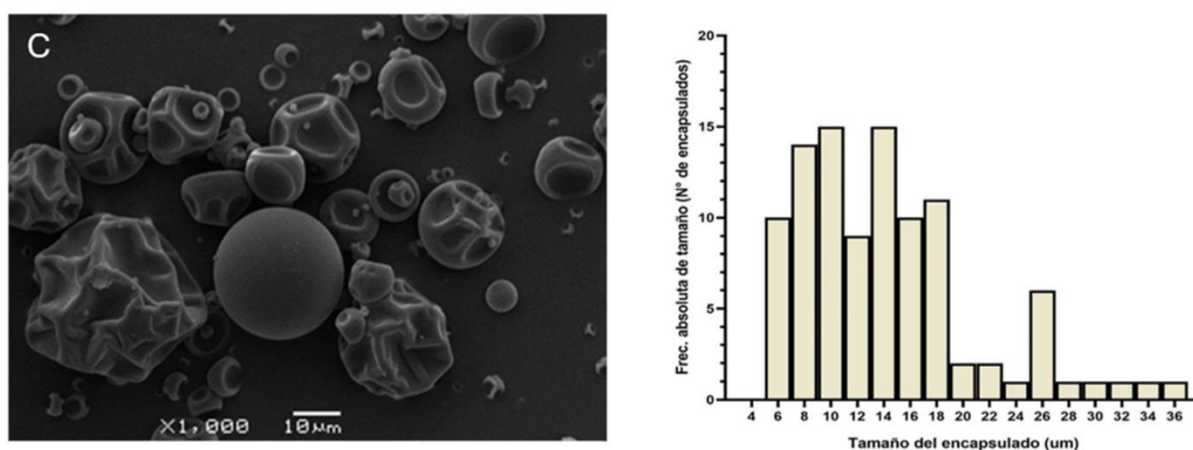


Figura 11. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (línea de referencia= 10 μm) e Histograma de frecuencia de tamaños de encapsulados (N=100) desde muestra de encapsulados de formulación C, luego del proceso de secado por aspersión.

Efecto de la radiación UV-B de conidios microencapsulados de *Bauveria bassiana*

Se evaluó el efecto de la irradiación UV-B sobre los conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana* en las tres formulaciones obtenidas por secado por aspersión. Los encapsulados fueron expuestos a una irradiancia de 1500 mW/m^2 durante dos horas. La tasa de germinación de los microencapsulados no irradiados (control) fue

de 77.3% para la Formulación A, 75% para la Formulación B, y 62% para la Formulación C. Tras la exposición a la irradiancia UV-B, las tasas de germinación fueron de 74% para la Formulación A, 71% para la Formulación B, y 59% para la Formulación C. Estos resultados indican que la irradiación UV-B causó una ligera reducción en la tasa de germinación de los conidios microencapsulados. La Formulación C mostró la mayor susceptibilidad a la irradiación UV-B, con una disminución más pronunciada en la tasa de germinación en comparación con las Formulaciones A y B. En general, las Formulaciones A y B demostraron una mejor capacidad para mantener la viabilidad de los conidios bajo condiciones de irradiación UV-B elevada.

Además, la formulación A mostró los mejores resultados generales, con una tasa de germinación del 77.3% después de 3 meses de almacenamiento. Las microcápsulas obtenidas de esta formulación presentaron características físicas óptimas, siendo mayoritariamente esféricas, con algunas hendiduras y superficies lisas, y tamaños de partícula que oscilaron entre 2.5 y 9 μm . Los estudios de exposición de las microcápsulas a una radiación de 1500 mW/m^2 no mostraron efectos adversos en sus características físicas, manteniendo las tasas de germinación comparadas con las microcápsulas no expuestas.

Efecto de la radiación UV-B 2h (1500 mW/m^2) sobre la germinación de los conidios microencapsulados de *B. bassiana*

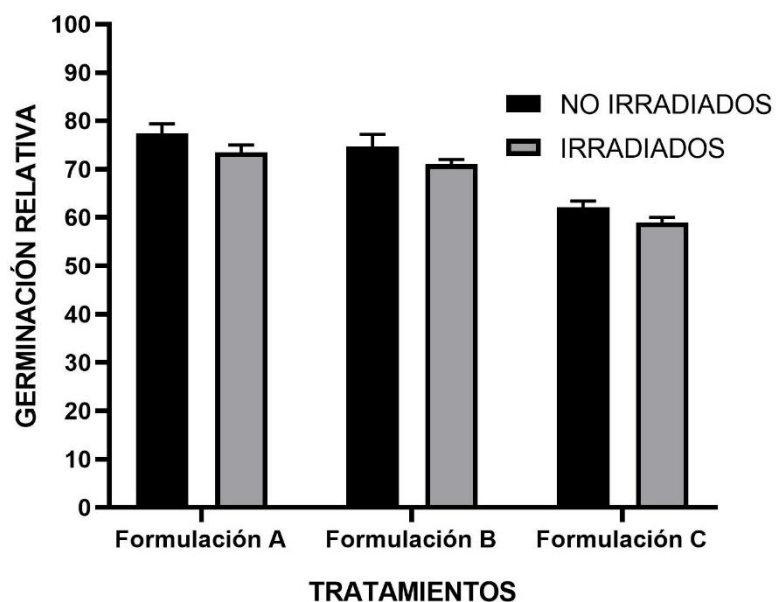


Figura 12. Efecto de los rayos UV-B en los conidios microencapsulados de *Beauveria bassiana* sobre el porcentaje de germinación relativa después de una exposición de dos horas a una radiación UV-B de 1500 mW/m². De izquierda a derecha se muestran las formulaciones A, B y C, donde las barras negras representan los conidios microencapsulados sin irradiar y las barras grises, los conidios microencapsulados irradiados.

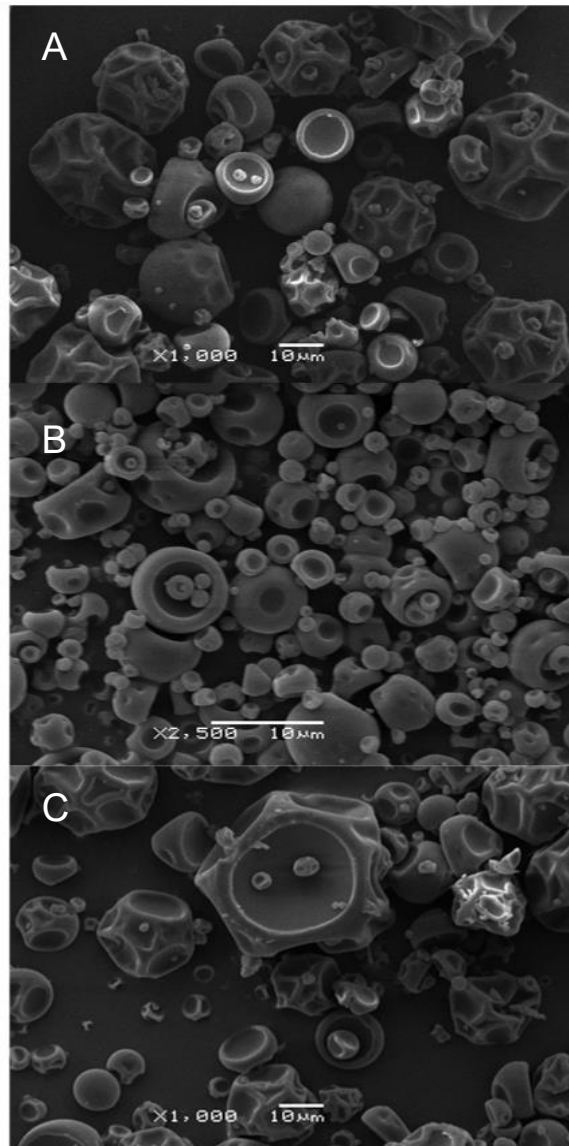


Figura 13 Imagen de microscopia electrónica de barrido de las microcápsulas obtenidas de las formulaciones A, B y C de *Beauveria bassiana* irradiadas a 1500 mW/m². Imagen obtenida luego de realizarse el método de secado por punto crítico para visualizar la morfología de las microcápsulas tras la exposición a la radiación UV-B.

Análisis estadístico

El tiempo de exposición a radiación UV-B genera un cambio significativo ($F=601,4$; $p<0,05$) en la tasa de germinación (%) de conidios desnudos.

Para el análisis de germinación de los microencapsulados, la interacción entre la formulación y la irradiación no generan diferencias significativas ($p>0,05$) en cambio la formulación e irradiación por si solas generan diferencias significativas en la germinación ($p<0,05$)

	gl	MC	F	p
Formulación	2	384,22	144,08	$p<0,05$
Irradiaición	1	53,39	20,02	$p<0,05$
Formulación*Irradiación	2	0,22	0,08	$p>0,05$

Discusión

Actualmente, los hongos entomopatógenos se desarrollan, comercializan y utilizan como biopesticidas para controlar muchas especies de insectos (Pepi et al., 2022). Muchos de los hongos entomopatógenos se aplican de manera foliar y en el suelo para controlar plagas agrícolas y forestales de manera más eficaz (Camara et al., 2022). Sin embargo, su eficiencia en el campo está limitada por condiciones ambientales adversas como temperaturas extremas, humedad y radiación UV (Shaalán et al., 2021). La tolerancia de *Beauveria bassiana* a los rayos UV-B ha sido ampliamente investigada demostrando que la exposición directa a una radiación de una intensidad que se encuentra frecuentemente en el medio ambiente es suficiente para inactivar completamente los conidios de esta especie (Inglis et al., 1995). Además, se ha informado de una gran variabilidad intraespecies en la susceptibilidad a la irradiación solar, además la especie se adapta a la radiación en el lugar geográfico en que se ubique (Fernandes et al., 2015).

La radiación UV-B puede causar daño celular en los conidios de *Beauveria bassiana* a nivel molecular a través de varios mecanismos. Uno de los principales mecanismos de daño es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La radiación UV-B interactúa con moléculas dentro de las células, como el agua y ciertos compuestos fotosensibles, generando ROS como el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilos y el anión superóxido. Estas ROS pueden causar daños

oxidativos a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dentro de las células (Carrasco-Ríos, 2009).

En particular, el ADN es una de las moléculas más afectadas por la radiación UV-B. La radiación puede inducir la formación de dímeros de pirimidina, principalmente dímeros de timina, en el ADN. Estos dímeros distorsionan la estructura del ADN, interfieren con la replicación y transcripción del ADN, y pueden llevar a mutaciones si no se reparan adecuadamente (Cabrera Morales & López-Nevot, 2006). Además, las ROS generadas por la radiación UV-B pueden causar rupturas en las cadenas de ADN y oxidación de las bases del ADN, lo que contribuye aún más al daño genético y la disfunción célula (Cabrera Morales & López-Nevot, 2006)

A nivel celular, el daño oxidativo y genético puede desencadenar respuestas de estrés, alterando la integridad de la membrana celular y la función enzimática. Estos efectos combinados pueden llevar a la muerte celular o a una reducción significativa en la viabilidad y capacidad de germinación de los conidios (Rangel et al., 2005).

En nuestro estudio, se evaluó la tasa de germinación de los conidios desnudos de *Bauveria bassiana* aislados directamente de *Hylurgus ligniperda* donde se expusieron a irradiancia UV-B de 1500 mW/m² como referencia a un punto intermedio de acuerdo con la revisión bibliográfica. Nuestros resultados reflejan una baja supervivencia similar a la reportada por Fernandes et al. (2007), quienes observaron una supervivencia inferior al 50% bajo condiciones de irradiancia de 978 mW/m². Estos hallazgos confirman la alta susceptibilidad de los conidios desnudos a la radiación UV-B, destacando la necesidad de desarrollar estrategias de protección para mantener su viabilidad.

Por microscopia electrónica de barrido se mostró que la irradiación UV-B causó daño significativo a los conidios e hifas de *Beauveria bassiana*, incluyendo deshidratación y ruptura de las estructuras celulares. Estos daños morfológicos son muestra de los efectos generados por la alta irradiancia utilizada en los ensayos. La deshidratación y la ruptura de las estructuras celulares son indicativas de la incapacidad de los conidios para mantener su integridad estructural bajo exposición a UV-B, lo que afecta negativamente su viabilidad y capacidad de germinación. Este tipo de daño es especialmente crítico durante las etapas sensibles del ciclo de vida del hongo, como la germinación del conidio y la emergencia del tubo germinativo (Maranhão, 2008).

Estudios previos realizados por Ottati-de-Lima et al. (2014) demostraron que las blastosporas (cuerpos de hifas cortas producidas in vitro) de hongos entomopatógenos son muy sensibles a los rayos UV-B y en pruebas preliminares de laboratorio con dos aislados de *Bauveria bassiana*, estas blastosporas fueron tan sensibles como los conidios a 839 mW/m^{-2} dañando hifas, ralentizando el crecimiento y producción de estructuras de propagación. Además, Braga et al. (2001) encontraron que la fase final de germinación de *Metarhizium*, durante o después de la emergencia del tubo germinativo, es particularmente vulnerable a los rayos UV-B. De acuerdo con estos estudios se corrobora que la radiación de tipo UV-B puede causar daños estructurales significativos en los hongos entomopatógenos, comprometiendo su viabilidad y con ello la capacidad para infectar a los insectos huéspedes.

Por otra parte, es importante considerar que la mayoría de los intentos para aumentar la persistencia de agentes microbianos en el campo y protegerlos de factores abióticos se han basado en el uso de protectores añadidos a los productos biológicos, como revisaron Ignoffo y García (1992). La inmovilización de propágulos de hongos (esporas, conidios, micelios, etc.) en matrices de polímeros ha demostrado ofrecer protección durante períodos prolongados, conservar la virulencia y facilitar su manipulación y aplicación (Sarioglu et al., 2017).

En la presente investigación, exploramos el uso combinado de dos polímeros ampliamente utilizados en microencapsulación, maltodextrina y goma arábiga, debido a su efectividad y bajo costo. Para el proceso de microencapsulación de conidios de *Beauveria bassiana*, se optó por el secado por aspersión debido a sus múltiples ventajas en comparación con otros métodos de secado. El secado por aspersión permite un control preciso de las condiciones de secado, lo cual es crucial para mantener la viabilidad y la estabilidad de los conidios. Este método también ofrece una rápida deshidratación, minimizando el tiempo de exposición de los conidios a condiciones potencialmente dañinas, como altas temperaturas, lo que ayuda a preservar sus propiedades biológicas (Gutierrez et al., 1998).

Otra ventaja significativa del secado por aspersión es la capacidad de producir partículas de tamaño uniforme y con una distribución controlada, lo que resulta en microcápsulas de alta calidad con propiedades fisicoquímicas optimizadas (Martínez, 2015).

En comparación con otros métodos como la liofilización o el secado al vacío, el secado por aspersión es más económico y escalable para la producción industrial,

facilitando su aplicación en la producción a gran escala de bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos (Cárdenas, 2010). Esta combinación se presenta como una opción inocua para el medio ambiente, como menciona Ravandi et al., en 2013.

El uso de maltodextrina y goma arábica en la microencapsulación de conidios de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, no solo proporciona protección física contra factores abióticos como la irradiación UV- B y la desecación, sino que también desempeña un papel crucial en la germinación de los conidios. Estos polímeros actúan como fuentes accesibles de carbono y nutrientes que los hongos pueden utilizar como alimento. Durante el proceso de germinación, los conidios encapsulados pueden metabolizar estos polímeros, lo que facilita su desarrollo y viabilidad (John et al., 2011). Este beneficio dual de protección y nutrición mejora la eficacia general de los bioplaguicidas basados en hongos, optimizando tanto la persistencia en el campo como la capacidad infectiva de los conidios al encontrar y colonizar a sus hospederos.

Por ejemplo, Aziz Qureshi et al., (2015) informaron la microencapsulación de esporas de *Beauveria bassiana* con maltodextrina como matriz. La encapsulación se realizó mediante secado por aspersión sin afectar la germinación del hongo, conservando la viabilidad a 30°C durante 6 meses y logrando en 5 días una mortalidad de *Helicoverpa armigera* del 93%. Las esporas de *Trichoderma harzianum* microencapsuladas en maltodextrina y goma arábica mostraron una tasa de supervivencia del 86% después de 8 semanas a 4°C (Muñoz-Celaya et al., 2012)

En nuestro estudio, se investigó la variación de la proporción del material encapsulante para proteger los conidios de *Beauveria bassiana* aislados de

Hylurgus ligniperda mediante el secado por aspersión a baja temperatura, utilizando maltodextrina y goma arábica como matrices poliméricas.

Estos resultados tanto de tasa de germinación como las características físicas de las cápsulas son comparables con el estudio de Liu en 2009 donde se utilizó el secado por aspersión a baja temperatura con diferentes polímeros naturales para la microencapsulación del hongo *Beauveria bassiana*, logrando prolongar la actividad insecticida de los conidios y prolongar su vida útil. En su estudio, las tasas de germinación de las microcápsulas almacenadas a 25°C durante 1 mes fueron del 75%, con tamaños de partículas en el rango de 2.5 a 10 µm, y las microcápsulas eran mayoritariamente esféricas con hendiduras.

Es importante recalcar que la microencapsulación con maltodextrina y goma arábica proporciona una barrera protectora que reduce la difusión de oxígeno hacia los conidios, lo que disminuye el estrés oxidativo y aumenta la vida útil de los conidios, permitiendo un almacenamiento prolongado (Muñoz-Celaya et al., 2012). Este comportamiento positivo de los encapsulados, observado tras 3 meses de almacenamiento, subraya la eficacia de esta técnica en la preservación de la viabilidad y funcionalidad de los conidios a lo largo del tiempo.

Finalmente, Lopera (2009) resalta la capacidad de la goma arábica para brindar fotoestabilidad al neutralizar estados excitados desde una perspectiva fotoquímica. Estos estados excitados hacen referencia a niveles de energía más elevados en moléculas que han absorbido energía, generalmente en forma de luz o radiación. Estudios realizados por Barbosa (2005) con otras sustancias activas como la bixina, aceites esenciales y riboflavina, han demostrado que la goma arábica puede

desactivar estos estados excitados, lo que previene procesos de degradación o deterioro. Esta capacidad explicaría la resistencia de las microcápsulas frente a la exposición a la radiación ultravioleta.

Conclusión

Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis planteada: la microencapsulación de los conidios de *Beauveria bassiana* evita el daño celular provocado por la radiación UV-B y mantienen su la viabilidad. Los conidios desnudos mostraron una alta susceptibilidad a la radiación UV-B, con una significativa disminución en la tasa de germinación y daños morfológicos evidentes. Los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* son efectivos biopesticidas, pero su eficiencia se ve limitada por condiciones ambientales adversas como la radiación UV, temperaturas extremas y baja humedad. La alta susceptibilidad de los conidios desnudos de *Beauveria bassiana* a la radiación UV-B se confirmó al observar una reducción significativa en la tasa de germinación tras la exposición a una irradiancia UV-B de 1500 mW/m². La irradiación UV-B también causó daños morfológicos significativos, como deshidratación y ruptura de estructuras celulares, afectando negativamente su viabilidad. La microencapsulación con maltodextrina y goma arábica demostró ser efectiva en la protección de los conidios contra la radiación UV-B, proporcionando una barrera efectiva manteniendo la viabilidad durante períodos prolongados de almacenamiento. La formulación A (10% maltodextrina y 10% goma arábica) mostró una alta tasa de germinación y resistencia a la radiación UV-B. La combinación de maltodextrina y goma arábica no solo protege físicamente a los conidios, sino que también les proporciona nutrientes que facilitan su desarrollo y viabilidad, mejorando la eficacia de los bioplaguicidas basados en hongos. En conjunto, estos hallazgos

subrayan la eficacia de la microencapsulación para optimizar el uso de *Beauveria bassiana* como biopesticida.

Estos hallazgos ofrecen un punto de partida prometedor para futuras investigaciones en la generación y uso de los biopesticidas. Una dirección importante será la evaluación de la eficacia de los conidios microencapsulados en condiciones de campo, donde otros factores ambientales abiótico y bióticos pueden influir en su rendimiento. Además, sería valioso explorar el uso de otros polímeros y materiales de recubrimiento que podrían ofrecer mejoras adicionales en la protección UV-B y la viabilidad a largo plazo de los conidios. Otra área de interés podría ser el estudio de la liberación controlada de conidios microencapsulados, lo cual podría optimizar la aplicación y la efectividad del biopesticida

Finalmente, Estas proyecciones futuras no solo pueden mejorar la eficacia de los biopesticidas, sino también contribuir al desarrollo sostenible en el manejo de plagas tanto agrícolas como forestales.

Bibliografía

Abalo, M. S. (2023). Evaluación de hongos entomopatógenos (Ascomycota: Hypocreales) como potenciales controladores del lepidóptero plaga *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) del cultivo de soja (*Glycine max*) y su posible aplicación como bioinsecticidas. <https://doi.org/10.35537/10915/154806>

Anderson, T. F. (1951 In Preparing). Techniques for the preservation of three-dimensional structure specimens for the electron microscope. *Annals of the New York academy of sciences*, 13(4 Series I), 130–134. <https://doi.org/10.1111/J.2164-0947.1951.Tb01007.X>

Aziz Qureshi, A., Vineela, V., & Vimala Devi, P. S. (2015). Sodium humate as a promising coating material for microencapsulation of *Beauveria bassiana* conidia through spray drying. *drying technology*, 33(2), 162–168. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.938814>

Barbosa, M. I. M. J., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food research international*, 38(8–9), 989–994. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2005.02.018>

Braga, G. U. L., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2001). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium isolated* from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of invertebrate pathology*, 78(2), 98–108. <https://doi.org/10.1006/JIPA.2001.5048>

Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Fernandes, É. K. K., Flint, S. D., & Roberts, D. W. (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current genetics*, 61(3), 405–425. <https://doi.org/10.1007/S00294-015-0483-0/FIGURES/1>

Cabrera Morales, C. M., & López-Nevot, M. A. (2006b). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. 29(7), 25–32.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000700003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Cadet, J., Ravanat, J.-L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., & Mascio, P. D. (2006). Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: Product formation and mechanistic insights. *photochemistry and photobiology*, 82(5), 1219–1225. <https://doi.org/10.1562/2006-06-09-IR-914>

Camara, I., Cao, K., Sangbaramou, R., Wu, P., Shi, W., & Tan, S. (2022). Screening of *Beauveria bassiana* (Bals.) (Hypocreales: Cordycipitaceae) strains against *Megalurothrips usitatus* (Bagnall) (Thysanoptera: Thripidae) and conditions for large-scale production. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S41938-022-00584-W/TABLES/1>

Cárdenas, Y. G. (2010). Métodos De Conservación Y Formulación De *Trichoderma Harzianum* Rifai. 14(3), 189–195.

Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia* (Arica), 27(3), 59–76. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>

Dauda, Z., Maina, U. M., Um, M., Zakaria, D., Galadima, I. B., & Gambo, F. M. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Article in journal of entomology and zoology studies*, 6(1). <https://www.researchgate.net/publication/323445876>

Egorova, T., Sedlacek, J., Sukhodolov, T., Karagodin-Doyennel, A., Zilker, F., & Rozanov, E. (2023). Montreal protocol's impact on the ozone layer and climate. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 23(9), 5135–5147. <https://doi.org/10.5194/ACP-23-5135-2023>

Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., & Roberts, D. W. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current genetics*, 61(3), 427–440. <https://doi.org/10.1007/S00294-015-0492-Z/TABLES/2>

Fernandes, É. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, Á. M. L., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of invertebrate pathology*, 96(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2007.05.007>

Fernandes, R. V. D. B., Borges, S. V., & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate polymers*, 101(1), 524–532. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.09.083>

Fuller, K. K., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Current genetics*, 61(3), 275–288. <https://doi.org/10.1007/S00294-014-0451-0/FIGURES/1>

Gerónimo-Torres, J. D. C., Torres-de-la-Cruz, M., Cruz, M. P., De-la-Cruz-Pérez, A., Ortiz-garcía, C. F., & Cappello-García, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 28–35. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882016000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Gutierrez, G., Osorio, G., Jiménez, A., & Pyele, L. (1998). Efecto de las condiciones de operación del secado por aspersión sobre la viabilidad de las blastosporas de *Beauveria Bassiana*. *J. Dairy Sci*, 78, 1025–1031.

Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2015). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 690–697. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.09.058>

Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 262–266. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2008.02.017>

Ignoffo, C. M., & Garcia, C. (1992). Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environmental entomology*, 21(4), 913–917. <https://doi.org/10.1093/EE/21.4.913>

Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Johnson, D. L. (1995). Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *BiolC*, 5(4), 581–590. <https://doi.org/10.1006/BCON.1995.1069>

Jiang, Y., Rabbi, M., Kim, M., Ke, C., Lee, W., Clark, R. L., Mieczkowski, P. A., & Marszalek, P. E. (2009). UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophysical Journal*, 96(3), 1151–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.030>

John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211–226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>

Kang, H., Jouvet, C., Dedonder-Lardeux, C., Martrenchard, S., Grégoire, G., Desfrancois, C., Schermann, J. P., Barat, M., & Fayeton, J. A. (2005). Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(2), 394–398. <https://doi.org/10.1039/B414986F>

Kokue, T., Pegua Ñangarekoha, P., & Ríos, P. R. (2019). Manual de protocolos de Aislamiento, Purificación, Conservación y Multiplicación de Hongos Entomopatógenos. <http://repositorio.conacyt.gov.py/handle/20.500.14066/3614>

Korma, S. A., Wei, W., Ali, A. H., Abed, S. M., Zheng, L., Jin, Q., & Wang, X. (2019). Spray-dried novel structured lipids enriched with medium-and long-chain triacylglycerols encapsulated with different wall materials: Characterization and stability. *Food Research International*, 116, 538–547. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.071>

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737–743. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.01.004>

Liu, C. P., & Liu, S. Da. (2009a). Low-Temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*. *Drying technology*, 27(6), 747–753. <https://doi.org/10.1080/07373930902828005>

Maranhão, E. A. De A., & Maranhão, E. H. De A. (2008). Hongos Entomopatógenos: Importante Herramienta Para El Control De “Moscas Blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais da academia pernambucana de ciência agrônômica*, 5(6), 209–242. <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/180>

Martínez, O. LA. (2015). Microencapsulación mediante secado... Esquivel-González B microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180–192.

Mishra, R. K., Tiwari, S., & Prasad, S. M. (2017). Interaction of UV-B with the terrestrial ecosystem. UV-B radiation, 65–74. <https://doi.org/10.1002/9781119143611.CH4>

Muñoz-Celaya, A. L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E. J., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2012). Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1141–1148. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.12.030>

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000/ASSET/023AD988-078E-4249-82B8-6A9B6AB588D3/ASSETS/GRAPHIC/MR0300022012.JPEG>

Oomah, B. D., & Mazza, G. (2001). Optimization of a spray drying process for flaxseed gum. *International journal of food science & technology*, 36(2), 135–143. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2621.2001.00442.X>

Ottati-de-Lima, E. L., Batista Filho, A., Almeida, J. E. M. de, Gassen, M. H., Wenzel, I. M., Almeida, A. M. B. de, & Zapellini, L. O. (2014). Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. *Arquivos do instituto biológico*, 81(4), 342–350. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001352012>

Pepi, M., Barretta, R., Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., & Eliopoulos, P. A. (2022). Entomopathogenic fungi: Interactions and applications. *encyclopedia*

2022, Vol. 2, Pages 646-656, 2(2), 646–656.
<https://doi.org/10.3390/ENCYCLOPEDIA2020044>

Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 55–58. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2005.05.005>

Ravandi, S. A. H., Gandhimathi, C., Valizadeh, M., & Ramakrishna, S. (2013). Application of electrospun natural biopolymer nanofibers. *Current nanoscience*, 9(4), 423–433. <https://doi.org/10.2174/1573413711309040002>

Ré, M. I. (2006). Formulating drug delivery systems by spray drying. *Drying technology*, 24(4), 433–446. <https://doi.org/10.1080/07373930600611877>

Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., & Gonçalves, A. (2005). Spray-drying of α -amylase - The effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technology*, 23(4), 941–953. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054243>

Sarioglu, O. F., Keskin, N. O. S., Celebioglu, A., Tekinay, T., & Uyar, T. (2017). Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids and surfaces biointerfaces*, 152, 245–251. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.01.034>

Shalan, R. S., Gerges, E., Habib, W., & Ibrahim, L. (2021). *Journal of Plant Protection Research* Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.139244>

Varnero, M. T., Quiroz, M. S., & Álvarez, C. H. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) Use of Lignocellulosic forest residues for Oyster mushroom production (*Pleurotus ostreatus*). 21(2), 13–20. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4154it.09>

Williamson, C. E., Zepp, R. G., Lucas, R. M., Madronich, S., Austin, A. T., Ballaré, C. L., Norval, M., Sulzberger, B., Bais, A. F., McKenzie, R. L., Robinson, S. A., Häder, D. P., Paul, N. D., & Bornman, J. F. (2014). Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nature Climate Change* 2014 4:6, 4(6), 434–441. <https://doi.org/10.1038/nclimate2225>

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol science and technology*, 17(6), 553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>