

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Saúde Pública**

**Impacto dos fungos entomopatogênicos  
*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no  
controle biológico de *Rhodnius neglectus*: um  
estudo realizado em condições de laboratório**

**Patricia Forli Schwartz Freire**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública (PPG-ESP), da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Entomologia em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa  
Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

**São Paulo**

**2023**

**Impacto dos fungos entomopatogênicos  
*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no  
controle biológico de *Rhodnius neglectus*: um  
estudo realizado em condições de laboratório**

**Patricia Forli Schwartz Freire**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública (PPG-ESP), da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Entomologia em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa  
Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

**Versão Revisada  
São Paulo**

**2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Freire, Patricia Forli Schwartz

Impacto dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle biológico de *Rhodnius neglectus*: um estudo realizado em condições de laboratório / Patricia Forli Schwartz Freire; orientador João Aristeu da Rosa; coorientador Kaio César Chaboli Alevi. -- São Paulo, 2023.

64 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Controle Biológico. 2. Fungos Entomopatogênicos. 3. Triatominae. 4. Manejo Integrado de Pragas. I. Aristeu da Rosa, João, orient. II. César Chaboli Alevi, Kaio, coorient. III. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família, pelo incentivo em todos os momentos, dedico aos meus amigos e colegas de trabalho por me apoiarem e ajudarem. Dedico também ao meu orientador João Aristeu da Rosa e coorientador Kaio Alevi, por todo auxílio, apoio e por dedicar boa parte do seu tempo e paciência na elaboração desse projeto.

## **.AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Marta e Eduardo pelo apoio incondicional e por serem meus maiores exemplos.

Agradeço ao meu irmão Bruno por ser meu melhor amigo, por sempre me ajudar e me aconselhar.

Agradeço aos colegas de trabalho da Biopartner por me ajudarem na execução do experimento, e por dividirem comigo momentos muito especiais e desafiadores.

Agradeço aos meus amigos e familiares por me ouvirem, me incentivarem e por nunca terem saído do meu lado, mesmo quando estive ocupada. Vocês fazem a vida valer a pena em cada risada.

Agradeço a todos os professores e colegas de mestrado, pelos ensinamentos e experiências compartilhados.

FREIRE, P.F.S. Impacto dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle biológico de *Rhodnius neglectus*: um estudo realizado em condições de laboratório, [Dissertação (Mestrado em Entomologia em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

## RESUMO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que afeta, aproximadamente, seis a sete milhões de pessoas em todo o mundo, resultando, todos os anos, em cerca de 14 mil mortes por complicações cardíacas e digestivas. A principal forma de transmissão dessa enfermidade na América Latina é vetorial, pelos triatomíneos, sendo o controle de vetores a principal medida para mitigar os casos de infecção por *T. cruzi*. O histórico do controle dos triatomíneos no Brasil se fundamenta, principalmente, no uso de inseticidas, fazendo-se necessário o manejo integrado de pragas como alternativa para a contenção desses vetores. Entre elas, tem sido realizada a utilização de controladores biológicos, visando auxiliar no estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes vetores, uma vez que causam baixos danos ambientais. Diversos trabalhos consideram os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* patogênicos para triatomíneos, conferindo-lhes competência para o controle dos vetores da doença de Chagas. Dessa forma, foi testada a eficácia de produtos comerciais compostos pelos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle biológico de *Rhodnius neglectus*, como alternativa ao uso de inseticidas. As análises do potencial de *B. bassiana* resultaram na não eclosão de 28,3% dos ovos, na mortalidade de 8,57% das ninfas de primeiro estágio (N1) e de 24,44% dos adultos. Já *M. anisopliae* foi responsável pela não eclosão de 25% dos ovos, mortalidade de 21,43% das ninfas N1 e 13,33% dos adultos. Esses resultados, quando comparados ao grupo controle (30% de não eclosão de ovos, nenhuma mortalidade das ninfas e 30% de mortalidade em adultos), demonstraram a ineficácia desses fungos no controle de *R. neglectus*, uma vez que o grupo controle resultou em eclosão/mortalidade igual ou maior que os tratamentos com os fungos entomopatogênicos.

**Palavras-chave:** triatomíneos; doença de Chagas; fungos; biocontrole; Manejo Integrado de Pragas

FREIRE, P.F.S. Impact of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on the biological control of *Rhodnius neglectus*: a study carried out under laboratory conditions, [Dissertation (Master in Entomology in Public Health)]. São Paulo: Faculty of Public Health of the University of São Paulo, 2023.

## ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that affects approximately six to seven million people worldwide, resulting, every year, in about 14,000 deaths from heart and digestive complications. The main form of transmission of this disease in Latin America is vector, by triatomines, with vector control being the main measure to mitigate cases of infection by *T. cruzi*. The history of triatomine control in Brazil is mainly based on the use of insecticides, making integrated pest management necessary as an alternative to contain these vectors. Among them, the use of biological controllers has been carried out, aiming to help in the establishment of rational and effective strategies to control arthropod vectors, since they cause low environmental damage. Several works consider the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to be pathogenic for triatomines, giving them competence to control the vectors of Chagas disease. Thus, we tested the effectiveness of commercial products composed of the fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* in the biological control of *Rhodnius neglectus*, as an alternative to the use of insecticides. Analyzes of the potential of *B. bassiana* resulted in the non-hatching of 28.3% of the eggs, the mortality of 8.57% of the first-stage nymphs (N1) and 24.44% of the adults. *M. anisopliae* was responsible for the non-hatching of 25% of the eggs, mortality of 21.43% of the N1 nymphs and 13.33% of the adults. These results, when compared to the control group (30% non-hatching of eggs, no nymph mortality and 30% mortality in adults), demonstrate the ineffectiveness of these fungi in the control of *R. neglectus*, since the control group resulted in hatching/mortality equal to or greater than treatments with entomopathogenic fungi.

**Keywords:** triatomines; Chagas disease; fungi; biocontrol; Integrated Pest Management

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS.....	17
Anexo 1.....	17
Anexo 2.....	45
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59



## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da DC (WHO, 2021). Estima-se que seis a sete milhões de pessoas estejam infectadas com o parasito e que 75 milhões estejam em risco de infecção, resultando, todos os anos, em cerca de 14 mil mortes por complicações cardíacas e digestivas, sendo a DC a doença que mais mata na América Latina quando comparada às outras doenças parasitárias (WHO, 2021; DNDi, 2022).

A transmissão dessa enfermidade pode ocorrer de várias formas, a saber, por transplante de órgãos de doadores infectados, acidentes laboratoriais, ingestão de alimentos ou líquidos contaminados (como polpa de açaí, garapa e carne crua), de forma congênita e por meio de transfusão de sangue (WHO, 2021; DNDi, 2022). No entanto, a principal forma de disseminação da DC na América Latina é vetorial pelos triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) (WHO, 2021).

Os triatomíneos são insetos hematófagos que tem o hábito de defecar/urinar durante ou após o repasto sanguíneo (DNDi, 2022). Caso o vetor esteja infectado com *T. cruzi*, os dejetos/excretas liberados podem infectar o hospedeiro ao entrar em contato com o orifício da picada (DNDi, 2022). Além disso, os barbeiros infectados podem ser processados e ingeridos por meio do consumo de alimentos *in natura*, o que, geralmente, resulta na infecção de grupos de pessoas, apresentando maior frequência de sintomas graves e mortalidade (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991, 2012; BENCHIMOL-BARBOSA, 2006; VARGAS et al., 2018).

Com base na importância dos triatomíneos para a transmissão da DC, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que o controle de vetores é a principal

medida para mitigar os casos de infecção por *T. cruzi* (WHO, 2021). O histórico do controle de vetores da DC no Brasil se fundamenta, principalmente, em controle químico com inseticidas [Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), Hexaclorociclohexano a 6,5% (HCH), Benzeno Hexaclorado (BHC), Deltametrina e Malathion] (ZERBA, 1991; PESSOA et al., 2015). Embora o manejo integrado de pragas (MIP) – definido como “uso de táticas de controle (isoladas ou associadas de forma harmoniosa) baseadas em análises de custo/benefício, que levam em conta o interesse e/ou o impacto sobre os produtores, a sociedade e o ambiente” (KOGAN, 1998) – considera o uso de inseticidas como um das alternativas de controle [fundamentada em uma abordagem multidisciplinar que, para a sua aplicação, deve considerar aspectos de ecologia, parasitologia, genética, imunologia, química, economia e sociologia (NARI, 1995)], a alternância ou associação de compostos biológicos e químicos pode contribuir para o manejo estratégico desses artrópodes nocivos, auxiliando tanto na prevenção da resistência, como no retorno à susceptibilidade (GILL e GARG, 2014).

Diversas evidências de desenvolvimento de resistência a inseticidas foram observadas nos vetores da DC: resistência ao Dieldrin, BHC, Malathion, Cipermetrina (RR 12,4) e ao Propoxur em populações de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (FOX et al., 1966; GONZÁLEZ-VALDIVIESO et al., 1971; COCKBURN, 1972; NELSON e COLMENARES, 1979; NOCERINO e HERNANDEZ, 1986), resistência ao Dieldrin e ao Propoxur em populações de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (GONZÁLEZ-VALDIVIESO et al., 1971; COCKBURN, 1972; NOCERINO e HERNANDEZ, 1986, VASSENA et al., 2000), resistência ao Dieldrin, Deltametrina (razão de resistência - RR 7,0),  $\beta$ -ciflutrina (RR 3,6), Fipronil e a Cipermetrina (RR 3,3) em populações de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (FOX et al., 1966, VASSENA et al., 2000, ACEVEDO et al., 2011) e resistência a

deltametrina em populações de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (PESSOA, 2008). Com base nessas publicações, pesquisas alternativas, como utilização de controladores biológicos têm sido realizadas (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ et al., 2004; SANTOS et al., 2014; MARTI et al., 2015), visando auxiliar no estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes vetores (ALVES, 1998, CHANDLER et al., 2000), uma vez que causa baixos danos ambientais (LACEY e GOETTEL, 1995).

O controle biológico dos triatomíneos pode ser realizado a partir de vespas parasitoides (Microhymenoptera) (SANTOS et al., 2014) e vírus (*Triatoma virus*) (MARTI et al., 2015). Além disso, fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales, Clavicipitaceae), e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales, Cordycipitaceae) também mostraram-se eficientes no biocontrole desses vetores (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ et al., 2004).

Diversos trabalhos consideram os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* como patogênicos para triatomíneos (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ et al., 2004), conferindo-lhes competência para o uso no controle dos vetores da DC. A ação desses fungos se dá por meio dos seus conídios que aderem e penetram na cutícula, onde formam tubos germinativos e hifas que, em seguida, atravessam o tegumento. Posteriormente, ocorre a sua multiplicação no interior dos insetos, resultando na rápida formação de massa hifal na hemocele (que já pode acarretar na morte de algumas espécies de insetos). De forma geral, a maioria dos insetos morre com seis dias, uma vez que ocorre a incubação dos fungos e, conseqüentemente, a lise de tecidos internos (VESTERGAARD et al., 1999). Por fim, em condições de umidade favoráveis, o fungo emerge, formando novos conídios no interior ou na superfície do exoesqueleto

(FARGUES e LUZ, 1998).

A maioria dos testes de eficácia dos fungos entomopatogênicos em triatomíneos foram realizados em *T. infestans* e *R. prolixus* (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ et al., 2004). Embora ambas as espécies apresentem importância mundial na transmissão vetorial da DC (GALVÃO, 2014), existem outras espécies que se destacam como vetores da DC no Brasil, como *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *T. vitticeps* (Stål, 1859), *T. sordida* (Stål, 1859), *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773) e *R. neglectus* Lent, 1954 (CORRÊA, 1968).

*Rhodnius neglectus* é uma espécie endêmica do Brasil que está distribuída em 14 estados: Acre, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Paraíba, Piauí, São Paulo e Tocantins (GALVÃO, 2014), sendo um dos triatomíneos mais coletados no estado de São Paulo (SILVA, 2019). Esse vetor já foi encontrado naturalmente infectado por *T. cruzi* e tem o hábito de invadir residências (CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; SILVA et al., 2022), destacando a sua importância epidemiológica para a DC.

## 2. OBJETIVO GERAL

Testar a eficácia de produtos comerciais compostos pelos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle biológico de *R. neglectus*, como alternativa ao uso de inseticidas.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a taxa de eclosão dos ovos e mortalidade de ninfas de primeiro estágio (N1) e adultos de *R. neglectus* após o tratamento com o fungo *M. anisopliae*;
- b) Avaliar a taxa de eclosão dos ovos e mortalidade de ninfas N1 e adultos de *R. neglectus* após o tratamento com o fungo *B. Bassiana*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para os testes de biocontrole dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (vendidos pela empresa Koppert como Metarril WP E9 e Boveril WP PL63, respectivamente), foram utilizados: 180 ovos, 210 ninfas de primeiro estágio recém-eclodidas (segundo Garcia et al) e 270 adultos (135 machos e 135 fêmeas) de *R. neglectus* alimentados com sangue de pato. Os insetos utilizados foram provenientes do Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), Campus Araraquara, São Paulo, Brasil. Para testar a eficácia do fungo *B. bassiana*, foram utilizados 0,375g de produto comercial ( $1 \times 10^8$  conídios viáveis/g) diluído em 200 ml de água [conforme instrução do fornecedor para controle de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Curculionidae), conforme não há dose recomendada para Triatominae]. Para os testes de eficácia do fungo *M. anisopliae*, foram utilizados 1,2g do produto comercial ( $1,39 \times 10^8$  conídios viáveis/g) diluído em 200 ml de água [dose dobrada em relação à utilizada no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera, Cercopidae), pois não há dose recomendada para Triatominae e embora ambos sejam hemípteros, os triatomíneos são maiores que os cercopídeos]. A aplicação dos produtos foi feita em torre de Potter (Figura 1), utilizando 2 ml dos produtos. Como grupo controle, foi utilizada água.

**Figura 1 – Torre de Potter**

Fonte: Comunicado Técnico 186, Embrapa

Os testes foram realizados da seguinte forma: ovos (grupo 1 – 60 ovos tratados com *B. bassiana*, grupo 2 – 60 ovos tratados com *M. anisopliae* e grupo 3 – 60 ovos tratados com água, com 12 repetições de cinco ovos em cada um dos os grupos), ninfas (grupo 1 – 70 ninfas tratadas com *B. bassiana*, grupo 2 – 70 ninfas tratadas com *M. anisopliae* e grupo 3 – 70 ninfas tratadas com água, com 14 repetições de cinco ninfas em cada grupo)<sup>28</sup> e adultos [grupo 1 – 90 adultos tratados com *B. bassiana*, grupo 2 – 90 adultos tratados com *M. anisopliae* e grupo 3 – 90 adultos tratados com água, com 18 repetições (nove para machos e nove para fêmeas) de cinco adultos em cada um dos os grupos].

A pulverização de fungos e água foi realizada em placas de Petri (60x15mm) forradas com papel filtro. Posteriormente, as placas foram fechadas e colocadas em câmara climatizada (temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 horas), por um período total de 15 dias. Após as aplicações, avaliou-se diariamente o número de indivíduos mortos por tratamento e calculou-se a taxa de mortalidade por

frequência relativa (%). Para confirmar que a mortalidade foi resultado de fungos entomopatogênicos, as ninfas mortas foram colocadas em câmaras úmidas (dentro de uma incubadora a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) para promover o desenvolvimento e esporulação do fungo.



#### 4. RESULTADOS

Os resultados da dissertação serão apresentados em forma de capítulo de livro publicado (Anexo 1) e artigo científico (Anexo 2).

**Anexo 1.** Capítulo publicado no livro “Produção do Conhecimento em Educação, Ciência e Tecnologia”.

FREIRE PFS; ROSA JA; ALEVI KCC, 2022. Fungos entomopatogênicos no controle biológico de triatomíneos (hemiptera, triatominae): uma minirrevisão In: CARVALHO C, ALEVI KCC, editores. Produção do conhecimento em educação, ciência e tecnologia. Rio Branco: Stricto Sensu Editora, p. 54-69.

#### **FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA, TRIATOMINAE): UMA MINIRREVISÃO**

**Patricia Forli Schwartz Freire<sup>1</sup>, João Aristeu da Rosa<sup>2</sup>, Kaio Cesar Chaboli Alevi<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

## Resumo

A doença de Chagas (DC) é uma doença negligenciada causada por *Trypanosoma cruzi* e transmitida, principalmente, pelas fezes e/ou urina de triatomíneos infectados com o protozoário. O histórico do controle de vetores da DC no Brasil se fundamenta, principalmente, em controle químico com inseticidas. De forma alternativa, o controle biológico dos triatomíneos pode ser realizado a partir de vespas parasitoides, vírus e fungos entomopatogênicos. Entre as espécies de fungos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são as mais estudadas para uso no controle desses vetores. Diante da importância desses fungos no biocontrole dos triatomíneos, uma minirrevisão dos aspectos biológicos e entomopatogênicos, bem como da sua utilização no manejo integrado e da patogenicidade em triatomíneos contaminados com tripanosomatídeos é apresentada. Com base nas informações revisadas, observou-se que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são importantes alternativas para o controle biológico dos triatomíneos. No entanto, demonstrou-se que o uso desses micoinseticidas deve ser revisado antes da sua aplicação pelos programas de controle de vetores, uma vez que fatores bióticos e abióticos, bem como interação com inseticidas e tripanosomatídeos podem influenciar na ação dos fungos e, conseqüentemente, na mortalidade dos insetos vetores da DC.

**Palavras-chave:** *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; doença de Chagas

**Abstract**

Chagas disease (CD) is a neglected disease caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted mainly by the feces and/or urine of triatomines infected by the protozoan. The history of control of CD vectors in Brazil is mainly based on chemical control with insecticides. Alternatively, biological control of triatomines can be performed using parasitoid wasps, viruses and entomopathogenic fungi. Among the fungal species, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are the most studied for use in the control of these vectors. Given the importance of these fungi in the biological control of triatomines, a mini-review of the biological and entomopathogenic aspects, as well as its use in the integrated management and pathogenicity in triatomines contaminated with trypanosomatids is presented. Based on the reviewed information, it was observed that the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* are important alternatives in the biological control of triatomines. However, it has been demonstrated that the use of these mycoinsecticides must be reviewed before their application by vector control programs, once biotic and abiotic factors, as well as interaction with insecticides and trypanosomatids, can influence the action of fungi and, consequently, the mortality of CD vectors.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Chagas disease

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma enfermidade potencialmente fatal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), que atinge seis a sete milhões de pessoas em todo o mundo (DNDI, 2022; WHO, 2022). Essa doença negligenciada é comumente encontrada em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, onde é transmitida, principalmente, por transmissão vetorial, ou seja, quando humanos entram em contato com fezes e/ou urina de triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) infectados pelo *T. cruzi* (DNDI, 2022; WHO, 2022). Devido ao alto número de pessoas que permanecem sem diagnóstico ou sem tratamento, combinado com áreas remanescentes de transmissão ativa, estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (DNDI, 2022; WHO, 2022).

O tratamento da DC pode ser feito por dois medicamentos: Benznidazol e Nifurtimox (DNDI, 2022; WHO, 2022). Ambos são eficazes na cura da DC se administrados logo após a infecção. No entanto, quanto mais tardio for o início do tratamento, a eficácia diminui (DNDI, 2022; WHO, 2022). Assim, como a DC não tem cura na fase crônica e a fase aguda, geralmente, é assintomática, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que o controle de vetores é a principal medida para reduzir a incidência de novos casos da doença (DNDI, 2022; WHO, 2022).

O histórico do controle de vetores da DC no Brasil se fundamenta, principalmente, em controle químico com inseticidas [Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), Hexaclorociclohexano a 6,5% (HCH), Benzeno Hexaclorado (BHC), Deltametrina e Malathion] (ZERBA, 1991; PESSOA et al., 2015). Embora o manejo integrado de pragas (MIP) – definido como “uso de táticas de controle (isoladas ou associadas de forma harmoniosa) baseadas em análises de custo/benefício, que levam em conta o interesse

e/ou o impacto sobre os produtores, a sociedade e o ambiente” (KOGAN, 1998) – considera o uso de inseticidas como um das alternativas de controle [fundamentada em uma abordagem multidisciplinar que, para a sua aplicação, deve considerar aspectos de ecologia, parasitologia, genética, imunologia, química, economia e sociologia (NARI, 1995)], a alternância ou associação de compostos biológicos e químicos pode contribuir para o manejo estratégico desses vetores, auxiliando tanto na prevenção da resistência, como no retorno à susceptibilidade (GILL; GARG, 2014).

Diversas evidências de desenvolvimento de resistência a inseticidas foram observadas nos triatomíneos: resistência ao Dieldrin, BHC, Malathion, Cipermetrina (RR 12,4) e ao Propoxur em populações de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (FOX et al., 1966; GONZÁLEZ-VALDIVIESO; DIAZ; NOCERINO, 1971; NOCERINO; HERNANDEZ, 1986), resistência ao Dieldrin e ao Propoxur em populações de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (GONZÁLEZ-VALDIVIESO; DIAZ; NOCERINO, 1971; NOCERINO; HERNANDEZ, 1986, VASSENA; PICOLLO; ZERBA, 2000), resistência ao Dieldrin, Deltametrina (razão de resistência - RR 7,0),  $\beta$ -ciflutrina (RR 3,6), Fipronil e a Cipermetrina (RR 3,3) em populações de *T. infestans* (Klug, 1834) (FOX et al., 1966, VASSENA; PICOLLO; ZERBA, 2000, ACEVEDO et al., 2011) e resistência a deltametrina em populações de *T. sordida* (Stål, 1859) (PESSOA, 2008). Com base nessas publicações, pesquisas alternativas, com utilização de controladores biológicos, têm sido realizadas (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ; ROCHA; NERY, 2004; SANTOS et al., 2014; MARTI et al., 2015), visando auxiliar no estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes vetores (ALVES, 1998, CHANDLER et al., 2000), uma vez que causam baixos danos ambientais (LACEY; GOETTEL, 1995).

O controle biológico dos triatomíneos pode ser realizado a partir de vespas

parasitoides (Microhymenoptera) (SANTOS et al., 2014), vírus (*Triatoma virus*) (MARTI et al., 2015) e fungos entomopatogênicos, como os dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Evlachovaea*, *Isaria*, *Gliocladium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* (Tabela 1) (ROMAÑA e FARGUES 1987, 1992; LUZ; ROCHA; HUMBER, 2003; LUZ; ROCHA; NERY, 2004; ROCHA; LUZ, 2011; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2014; MARTI et al., 2015, FLORES-VILLEGAS et al., 2016), sendo a maioria desses fungos encontrados no Brasil, um dos líderes no controle biológico de pragas agrícolas (FARIA; WRIGHT, 2007).

*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são as espécies mais estudadas para uso no controle dos triatomíneos (ROMAÑA; FARGUES 1987, 1992; LUZ; ROCHA; NERY, 2004), sendo a maioria dos testes de eficácia dos fungos entomopatogênicos realizados em *T. infestans* e *R. prolixus* (ROMAÑA; FARGUES 1987, 1992; LUZ; ROCHA; NERY, 2004) (Tabela 1). Embora ambas as espécies apresentem importância mundial na transmissão vetorial da DC (GALVÃO, 2014), existem outras espécies que se destacam como vetores da DC no Brasil, como *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *T. vitticeps* (Stål, 1859), *T. sordida* (Stål, 1859), *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773) e *R. neglectus* Lent, 1954 (CORRÊA, 1968).

Diante da importância dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle biológico dos triatomíneos, uma minirrevisão dos aspectos biológicos e entomopatogênicos, bem como da sua utilização no manejo integrado e da patogenicidade em triatomíneos contaminados com tripanosomatídeos é apresentada.

Tabela 1. Espécies de fungo utilizados no controle biológico de Triatominae.

<b>Fungos Entomopatogênicos</b>	<b>Triatomíneos</b>	<b>Referência</b>
<i>B. bassiana</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	Luz e Farges (1998)
	<i>Triatoma infestans</i>	Luz et al. (1998a)
	<i>Triatoma dimidiata</i>	Vázquez-Martínez et al. (2014)
	<i>Panstrongylus megistus</i>	Dias e Leão (1967)
	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Lino et al. (2014)
	<i>Triatoma sordida</i>	Luz, Rocha e Silva (2004)
	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Paratriatoma lecticularia</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma matogrossensis</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma picturata</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma protracta</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma vitticeps</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Triatoma williami</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Panstrongylus lignarius</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Rhodnius nasutus</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Rhodnius neglectus</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Rhodnius robustus</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Dipetalogaster maxima</i>	Luz et al. (1998b)
	<i>Rhodnius pallescens</i>	Agudelo e Moreno (1997)
<i>Triatoma maculata</i>	Perfetti e Moreno (2018)	
<i>B. brongniartii</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	Romaña e Farges (1987)
	<i>Rhodnius pallescens</i>	Gutiérrez et al. (2003)
<i>M. anisopliae</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Luz e Farger (1998)
	<i>Triatoma dimidiata</i>	Vázquez-Martínez et al. (2014)
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Garcia (2013)
	<i>Triatoma sordida</i>	Rangel et al. (2000)
	<i>Panstrongylus megistus</i>	Rangel et al. (2000)
	<i>Triatoma pallidipennis</i> ,	Flores-Villegas et al. (2016)
	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Sherlock e Guitton (1982)
<i>Rhodnius neglectus</i> .	Sherlock e Guitton (1982)	
<i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigi</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Rocha e Luz (2011)
<i>M. robertsii</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Rocha e Luz (2011)
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Garcia et al. (2016)
<i>M. rileyi</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	Romaña e Farges (1987)
<i>Evlachovaea</i> sp.	<i>Triatoma infestans</i>	Luz, Rocha e Humber (2003)
<i>I. cateniannulata</i>	<i>Triatoma infestans</i>	Rocha e Luz (2011)
<i>I. fumosorosea</i>	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Flores-Villegas et al. (2016)
<i>G. virens</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>	Vázquez-Martínez et al. (2014)
<i>T. flavus</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>	Vázquez-Martínez et al. (2014)
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	Romaña e Farges (1987)

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NOS TRIATOMÍNEOS

A utilização de fungos como bioinseticidas para os triatomíneos foi iniciada em 1967, quando Dias e Leão (1967) avaliaram o efeito de *B. bassiana* no controle de *T. infestans*, *T. vitticeps* e *P. megistus*. A ação desse fungo no inseto se dá por meio dos seus conídios que se aderem ao exoesqueleto e penetram na cutícula, onde formam tubos germinativos e hifas que, em seguida, atravessam o tegumento. Posteriormente, ocorre a sua multiplicação no interior dos insetos, onde as hifas invadem praticamente todos os tecidos e órgãos, resultando na rápida formação de massa hifal na hemocele, que atravessa o corpo de dentro para fora em direção às aberturas no tegumento (já podendo acarretar na morte do inseto). De forma geral, a maioria dos insetos morre com seis dias, uma vez que ocorre a incubação dos fungos e, conseqüentemente, a lise de tecidos internos (possivelmente resultante de atividade enzimática). Por fim, em condições de umidade favoráveis, o fungo emerge e esporula, fase na qual observa-se numerosos conídios desprendidos dos conidióforos no interior ou na superfície do exoesqueleto (FARGUES; LUZ, 1998; PERFETTI; MORENO, 2011, 2018).

Perfetti e Moreno (2011, 2018) realizaram estudos histopatológicos e ultraestruturais em triatomíneos infectados com *B. bassiana* e observaram detalhadamente diversas etapas da proliferação do fungo no inseto. Em microscopia de luz, foi possível observar os conídeos aderidos ao exoesqueleto, os tubos germinativos penetrando a superfície das cutículas, a presença de hifas na hemocele, nos tecidos e órgãos internos, bem como o processo de esporulação. Em microscopia eletrônica de transmissão, os autores também observaram uma invasão maciça de hifas e micélios em toda a hemocele, com resposta de defesa dos hemócitos contra estruturas fúngicas



(hemócitos fagocitando, encapsulando e melanizando o fungo). Além disso, áreas de baixa densidade eletrônica foram observadas, sugerindo a secreção de enzimas durante a penetração tecidual e tegumentar das hifas.

Ruiz-Sanchez, Orchard e Lange (2010) avaliaram a ação da toxina destruxina A, produzida pelo fungo entomopatogenico *M. anisopliae*, nos túbulos de Malpighi de *R. prolixus*. Os autores observaram que a micotoxina não interfere na produção de ATP intracelular, mas inibe a taxa de secreção de fluido e leva a uma diminuição do potencial elétrico do órgão excretor. Alguns autores acreditam que as destruxinas produzidas pelos fungos possivelmente comprometem a capacidade imunológica dos insetos (FLORES-VILLEGAS et al., 2016, 2020). Flores-Villegas et al. (2016) avaliaram a influência da infecção fungica em dois dos principais agentes do sistema imune dos insetos [fenoloxidase (PO) e, seu precursor, a profenoloxidase (proPO)] e observaram que *T. pallidipennis* (Stål, 1872) infectado com *M. anisopliae* apresentaram valores de PO e proPO mais baixos do que o grupo controle.

## 2.2 METARHIZIUM ANISOPLIAE

*Metarhizium anisopliae* é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle biológico de artrópodes (TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014). Em Triatominae, a sua aplicação foi iniciada no ano 1982, quando Sherlock e Guitton (1982) avaliaram a sua ação nas espécies *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* e *R. neglectus*. Os autores realizaram testes com *M. anisopliae* em meio aquoso e em meio puro (fungo em meio de cultura de arroz) e observaram mortalidade de 50 e 100%, respectivamente, demonstrando que o contato direto com o fungo se mostra mais eficaz para o controle desses vetores. Além disso, exemplares mortos pela ação dos fungos foram colocados

em contato com triatomíneos sadios, acarretando em 100% de mortalidade (SHERLOCK e GUITTON, 1982).

Por outro lado, existem diferentes formulações que podem influenciar na ação do *M. anisopliae*: Luz, Rodrigues e Rocha (2012) avaliaram preparados de *M. anisopliae* com óleo vegetal e terra diatomácea, e observaram mortalidade de todas as ninfas tratadas, independente da formulação utilizada (provavelmente pelo aumento da adesão e disseminação de partículas, causado pelo óleo vegetal e terra diatomácea na cutícula lipofílica do inseto). Além disso, os autores associaram o desenvolvimento dos conídios na cutícula externa com a alta umidade proveniente da transpiração causada pelo efeito abrasivo da terra diatomácea e pela ausência de evaporação causada pelos óleos vegetais. Por fim, os autores concluíram que a ação combinada de óleo vegetal e terra diatomácea intensifica a susceptibilidade de ninfas à infecção fúngica, provavelmente pelo estresse causado pela ação abrasiva desses compostos.

A ação entomopatogênica de *M. anisopliae* foi comparada com outras espécies de fungos: Garcia (2013), por exemplo, observaram que os isolados de *M. anisopliae* eram mais virulentos às ninfas de primeiro instar de *R. prolixus* em relação aos isolados de *B. bassiana* e Flores-Villegas et al. (2016) concluíram que ninfas de quinto instar de *T. pallidipennis* tratadas com *M. anisopliae* morreram antes que os exemplares tratados com *I. fumosorosea*. Por outro lado, Vázquez-Martínez et al. (2014) relataram que a taxa de mortalidade de *T. dimidiata* adultos foi de 100% quando tratados com *G. virens* e *B. bassiana*, 75% quando tratados com *T. flavus* e apenas 25% quando tratados com *M. anisopliae*. Essa divergência na taxa de mortalidade causada por *M. anisopliae* pode estar relacionado a fatores bióticos e abióticos (ver o tópico 2.4).

Rangel et al. (2000) avaliaram o efeito de *M. anisopliae* em condições de campo.

Os autores pulverizaram o fungo em galinheiros com triatomíneos (*P. megistus*, *T. infestans* e *T. sordida*) e observaram que, após 17 dias, houve redução populacional de 38,5% das ninfas. Além disso, Murillo-Alonso et al. (2019) avaliaram a ação do fungo no controle de ninfas de terceiro instar de *T. pallidipennis* e observaram que a coloração da parede de tijolos pode influenciar na taxa de mortalidade, pois na vermelha ocorreu mortalidade de 90%, na cinza ocorreu 100% e, por fim, na parede de pedra a mortalidade foi de 88,33%.

### 2.3 BEAUVERIA BASSIANA

*Beauveria bassiana* também é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle biológico de artrópodes (FERRON, 1977; DOBERSKI, 1981), sendo o primeiro fungo testado em Triatominae (DIAS; LEÃO, 1967). Dias e Leão (1967) avaliaram a ação desse fungo em *T. infestans* e *T. vitticeps* e observaram que, embora os insetos apresentassem alguma susceptibilidade a *B. bassiana*, nas condições do experimento realizado pelos autores, não foram capazes de provocar índices significativos de mortalidade.

Em contrapartida, diversos autores relataram alta mortalidade de triatomíneos tratados com *B. bassiana*, a saber, Romaña e Fargues (1987) testaram diferentes cepas de *B. bassiana* em *R. prolixus* e observaram 100% de mortalidade dos triatomíneos para duas delas; Marti et al. (2005), Garcia (2013) e Vázquez-Martínez et al. (2014) também observaram 100% de mortalidade de *T. infestans*, *R. prolixus* (independente da temperatura) e *T. dimidiata*, respectivamente. Além disso, Forlani et al. (2011) testaram um formulado à base de *B. bassiana* e observaram que o fungo foi altamente virulento contra *T. infestans*. Curiosamente, os autores destacam que a sua capacidade inseticida

foi mantida por, pelo menos, cinco meses em condições naturais, ressaltando que a transmissão horizontal de conídios pode estar associada à densidade de insetos.

Assim como observado para *M. anisopliae*, formulações de *B. bassiana* com óleo vegetal foram mais eficazes que em suspensão aquosa: Perfetti e Moreno (2016) observaram que as suspensões de conídio em óleo foram significativamente mais eficientes que em meio aquoso, aumentando, assim, a mortalidade e diminuindo o tempo necessário para causar 50% de mortalidade (TL50) de ninfas de *R. prolixus*. Além disso, Luz et al. (2004) realizaram testes de campo para avaliar o potencial da *B. bassiana* em *T. sordida*. Os autores utilizaram uma formulação de água e óleo para aplicar o fungo em galinheiros infestados de triatomíneos e observaram diminuição no número de insetos após o tratamento. Luz et al. (1999) também testaram a aplicação de *B. bassiana* em condições semelhantes ao campo. Os autores trataram pequenas casas experimentais de madeira com *B. bassiana*, liberaram ninfas de terceiro instar de *T. infestans* e, posteriormente, coletaram-nas e as levaram ao laboratório para avaliar a taxa de mortalidade que variou de 38,1 a 93,8%.

## 2.4 FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE PODEM INFLUENCIAR NA AÇÃO DOS MICROINSETICIDAS

### 2.4.1 Abióticos

#### 2.4.1.1 Umidade relativa (UR)

Existe uma grande discussão sobre a influência da umidade relativa (UR) no efeito entomopatogênico dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, pois embora diversos trabalhos afirmem que a baixa UR do ambiente é um fator limitante para a atividade fungica em Triatominae (FARGUES; LUZ 1998, 2000; LUZ; FARGUES 1998, 1999; LUZ

et al. 1998a, 2004; LUZ; ROCHA; HUMBER, 2003; LUZ & BATAGIN 2005, LAZZARINI; ROCHA; LUZ, 2006; ROCHA; LUZ, 2011), existem trabalhos que demonstram alta patogenicidade em UR relativamente baixas (FLORES-VILLEGAS et al., 2016).

Luz et al. (2004) e Lazzarini et al. (2006) relataram que a atividade dos fungos na mortalidade de *T. infestans* foi ótima com UR de 98% e, com UR de 75%, foi reduzida. Fargues e Luz (1998), por exemplo, demonstraram que em condições diurnas constantes com UR de 75% e 43%, os fungos não esporularam e, com base nisso, destacaram que a alta umidade possa ser uma possível restrição para o uso de *B. bassiana*, ressaltando a importância da aplicação de fungos entomopatogênicos durante as estações chuvosas. No entanto, Flores-Villegas et al. (2016) avaliaram e confirmaram o efeito patogênico de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* em *T. pallidipennis* em condições de UR de 60%. Além disso, Luz et al. (1998, 1999) observaram efeito fúngico de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *T. infestans*, com alta taxa de mortalidade (90%), sob UR de 50%.

#### 2.4.1.2 Temperatura

Além da UR, a temperatura é um fator importante para a ação fúngica. Em condições de alta UR (97%) e temperaturas de 20° e 25° C, por exemplo, as taxas de mortalidade de ninfas de *R. prolixus* tratadas com *B. bassiana* permaneceram altas (> 90%) (FARGUES e LUZ, 2000). No entanto, os autores observaram que em 15° C a mortalidade diminuiu. Da mesma forma, Fargues e Luz (1998) observaram que a intensidade da produção conidial em *R. prolixus* mortos aumentou quando as temperaturas diurnas foram maiores (28 e 35°C). Todavia, Luz e Fargues (1998) demonstram que a produção conidial é pouco afetada pela temperatura em uma faixa de 15 a 25°C, diminuiu em 28°-30° C e é nula a 35° C (demonstrando a inconsistência dos

autores em conseguir padronizar os parâmetros abióticos estudados para o estabelecimento de um protocolo).

Garcia (2013) observou que o tempo de sobrevivência de ninfas de Triatominae infectadas com cepas de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi reduzido com o aumento da temperatura. Perfetti, Moreno e Quintero (2007) relataram que em temperaturas extremas (6° e 40°C), conídios de *B. bassiana* não foram capazes de germinar, enquanto as taxas de germinação foram altas na faixa de 21°-34°C. Lecuona, Rodriguez e Rosa (2005) avaliaram o efeito da temperatura na mortalidade de *T. infestans* tratado com *B. bassiana* e, com base nos resultados, concluíram que, em condições de campo, a aplicação deve ser realizada no final da tarde para evitar o impacto negativo de mudanças abruptas da temperatura.

Outros fatores abióticos, como sal e pH também podem influenciar na capacidade de germinação dos fungos. Perfetti, Moreno e Quintero (2007) observaram que as taxas de germinação de conídios de *B. bassiana* diminuíram significativamente com o aumento da concentração de cloreto de sódio (NaCl), sendo totalmente inibidas em uma faixa de concentração de 7%, em pH de 1,32 e 11-12 (sendo o pH de 4 a 10 considerado como ótimo para germinação).

#### **2.4.2 Bióticos**

Diversos fatores bióticos dos hospedeiros podem influenciar na suscetibilidade ao fungo. Luz, Fargues e Romaña (2003) avaliaram a Influência da fome e da muda induzida por refeição de sangue na suscetibilidade de ninfas de *R. prolixus* a *B. bassiana*. Os autores observaram que no período de um mês, a restrição alimentar não afetou a suscetibilidade ninfa ao fungo. Além disso, nenhuma diferença significativa afetou a

mortalidade de ninfas alimentadas e não alimentadas.

Outro fator biótico avaliado por Luz et al. (1998b) foi a influencia da espécie alvo de triatomíneo na suscetibilidade a *B. bassiana*. Os autores observaram que a taxa de mortalidade, as estimativas de tempo de sobrevivência e a produção de conídios diferiram significativamente entre os gêneros *Triatoma* Laporte, 1832, *Rhodnius* Stål, 1859, *Panstrongylus* Berg, 1879, *Paratriatoma* Barber, 1938 e *Dipetalogaster* Usinger, 1939. Entre as diferentes espécies analisadas, *P. lignarius* (Walker, 1873), *D. maxima* (Uhler, 1894), *T. picturata* (Usinger, 1939), *R. robustus* Larrousse, 1927, *R. prolixus*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* foram as mais suscetíveis à infecção fúngica. Além disso, os autores observaram que *T. williami* Galvão, Souza & Lima, 1965 e *P. lecticularia* (Stål, 1859) apresentaram maior quantidade de conídios nos insetos mortos.

## 2.5 MANEJO INTEGRADO

Como parte de um projeto global responsável por selecionar os melhores patótipos fúngicos que serão utilizados em futuros programas de Manejo Integrado de Pragas de Triatominae, Cazorla e Moreno (2010) avaliaram a compatibilidade "in vitro" de isolados nativos de *B. bassiana* com inseticidas químicos organofosforados (Malation 81,5% e Fenitrothion 45,8%) e piretroides (Beta-Cipermetrina 26,31% e Deltametrina 2,5%). Os autores observaram que nas doses recomendadas, os inseticidas químicos afetaram a porcentagem média de germinação fúngica em mais de 90%, sendo apenas a Deltametrina compatível com *B. bassiana*, quando utilizada na metade da dose recomendada. No entanto, Lecuona et al. (2001) e Alzogaray et al. (1998) observaram que a Deltametrina não afetou nenhuma das cepas de *B. bassiana* estudadas, independente da dose. Além disso, relataram que a Beta-Cipermetrina, em doses baixas,

também poderia ser usada em combinação com o fungo.

Como medida alternativa ao uso de inseticidas, Forlani et al. (2015) propuseram o uso de caixas de madeira contendo esporos de *B. bassiana* e suspensão de exúvias de *T. infestans* (uma vez que os lipídios da cutícula desempenham um papel importante como feromônios de agregação) e concluíram que pode ser uma ferramenta promissora contra populações intradomiciliares.

## 2.6 COINFECÇÃO ENTRE FUNGO E TRIPANOSOMATÍDEOS

Dalzoto (1996) e Flores-Villegas et al. (2018) avaliaram o efeito entomopatogênico dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em *R. robustus* e *T. pallidipennis* infectados com *T. cruzi* e observaram que a sobrevivência dos insetos infectados com o *T. cruzi* e expostos aos fungos patogênicos foi maior, demonstrando que o parasita pode conferir uma medida de resistência ao inseto contra o agente biopesticida, aumentando a sobrevivência e, inclusive, podendo levar à seleção para competência vetorial (uma vez que os fungos resultaram na mortalidade dos insetos não infectados). Além disso, Agudelo e Moreno (1997) avaliaram a susceptibilidade de *R. pallescens* infectado com *T. rangeli* Tejera, 1920 e *B. bassiana* (sendo o fungo mais patogênico que o parasita) e, diferente do observado para *T. cruzi*, a presença de ambos não parece ter efeito sinérgico sobre o vetor da DC.

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como demonstrado nesse capítulo, os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são importantes alternativas para o controle biológico dos triatomíneos. No entanto, com base nas informações apresentadas, demonstrou-se que o uso desses



micoInseticidas deve ser revisado antes da sua aplicação pelos programas de controle de vetores, uma vez que fatores bióticos e abióticos, bem como interação com inseticidas e tripanossomatídeos podem influenciar na ação dos fungos e, conseqüentemente, na mortalidade dos insetos vetores da DC.

#### 4. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, G.R.; CUETO, G.M.; GERMANO, M.; ORIHUELA, P.S.; CORTEZ, M.R.; NOIREAU, F.; PICOLLO, M.I.; VASSENA, C. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 830-835, 2011.

AGUDELO, U.L.A.; MORENO, M.J. Effects of the infection by *Trypanosoma rangeli* and *Beauveria bassiana* on *Rhodnius pallescens*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 438, 1997.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Artrópodes**. Fealq, 1998.

ALZOGARAY, R.; LUZ, C.; SILVA, I.G.; LEUCONA, R.E.; TIGANO, M.S. Effect of deltamethrin on germination and virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on *Triatoma infestans* (Klug.) **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 663-667, 1998.

CAZORLA, D.; MORENO, P.M. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 50, p.261-270, 2010.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 357-384, 2000.

CORRÊA, R.R. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 20, p. 39-81, 1968.

DALZOTO, P.R. **Estudos geneticos no fungo entomopatogenico *Beauveria bassiana* Vuill.** (Monografia) Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1996.

DIAS, J.C.P.; LEÃO, A.E.A. Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomíneos brasileiros criados em laboratório. **Atlas da Sociedade de Biologia**, v. 2, p. 85-87, 1967.

DNDI. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em 13/12/2022.

DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle, *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 195-200, 1981.

FARGUES, J.; LUZ, C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p.323-334, 1998.

FARGUES, J.; LUZ, C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 202-211, 2000.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43, p.237-256, 2007

FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi imperfecti) in imagines of *Acanthoscelides obtectus*. **Entomophaga**. v. 22, p. 393-396, 1977.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; GIROTTI, J.R.; MIJAILOVSKY, S.J.; CARDOZO, R.M.; GENTILE, A.G.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, C.M.; RABINOVICH, J.E.; JUÁREZ, P. Biological Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* with the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Combined with an Aggregation Cue: Field, Laboratory and Mathematical Modeling Assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0003778, 2015.

FLORES-VILLEGAS, A.L.; CABRERA-BRAVO, M.; TORIELLO, C.; BUCIO-TORRES, M.I.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 176, 2016.

FLORES-VILLEGAS, A.L.; CABRERA-BRAVO, M.; FUENTES-VICENTE, J.A.; JIMÉNEZ-CORTÉS J.G.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; BUCIO-TORRES, M.I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Coinfection by *Trypanosoma cruzi* and a fungal pathogen increases survival of Chagasic bugs: advice against a fungal control strategy. **Bulletin of Entomological Research**, v. 110, p. 363-369, 2018.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M.P. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, p. 135-140, 2011.

FOX, I., BAYONA, I.G., OROZCO, H.I. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, p. 974-976, 1966.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GARCIA, A.R.M. **Entomopathogenic fungi for biological control of Chagas disease vector *Rhodnius prolixus***. (Dissertação) Mestrado em Entomologia – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

GARCIA, A.R.; ROCHA, A.P.; MOREIRA, C.C.; ROCHA, S.L.; GUARNERI, A.A.; ELLIOT, S.L. Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, p. e0005128, 2016.

GILL, H.K., GARG, H. **Pesticides: environmental impacts and management strategies**. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. Pesticides - Toxic aspects. InTech, 2014.

GONZÁLEZ-VALDIVIESO, F.E., DIAZ, B.S., NOCERINO, F. **Susceptibility of *Rhodnius prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/188269>>. Acesso em 13/12/2022.

GUTIÉRREZ, F.P.; OSORIO, Y.S.; OSORNO, J.C.; SOTO, S.U. Susceptibility of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) of fifth instar nymph to the action of *Beauveria* spp. **Entomotropica**, v. 18, p. 163-168, 2003.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 243-270, 1998.

LACEY, L.A., GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. **Entomophaga**, v. 40, p. 3-27, 1995.

LAZZARINI, G. M. J.; ROCHA, L. F. N.; LUZ, C. Impact of moisture on *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity in *Triatoma infestans*. **Mycological Research**, v.110, p. 458-492, 2006.

LEUCONA, R.E.; EDELSTEIN, J.D.; BERRETTA, M.F.; ROSSA, R. ARCAS, J.A. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, p. 172-179, 2001.

LECUONA, R.E.; RODRIGUEZ, J., ROSA, F.R. Effect of Constant and Cyclical Temperatures on the Mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) Treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 675-679, 2005.

LINO, Z.R.J.; LÓPEZ-TLACOMULCO, J.J.; ROJAS, G.R.; SANSINENEA, E. Lethal effects of a Mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 551-557, 2014.

LUZ, C.; TIGANO, M.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 p. 839-846, 1998a.

LUZ, C.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.; TIGANO, M.S. *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 977-979, 1998b.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 97-103, 1998.

LUZ, C.; SILVA, I.G.; MAGALHAES, B.P.; CORDEIRO, C.M.T.; TIGANO, M.S. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary assays on formulation and application in the field. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 101-110, 1999.

LUZ, C.; FARGUES, J. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**, v. 146 p. 33-41, 1999.

LUZ, C.; FARGUES, J.; ROMAÑA, C. Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stal (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Infection. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 153-156, 2003.

LUZ C, ROCHA LF, HUMBER RA. Record of *Evlachovaea* sp. (Hyphomycetes) on

*Triatoma sordida* in the state of Goiás, Brazil, and its activity against *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 4, p. 451-454, 2003.

LUZ C., ROCHA L.F.N., NERY G.V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in Central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 783-791, 2004.

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N. NERY, G. V.; MAGALHÃES, B. P.; TIGANO, M. S. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p.211-218, 2004.

LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; SILVA, I.G. Pathogenicity of *Evlachovaea* sp. (Hyphomycetes), a new species isolated from *Triatoma sordida*, in Chagas' disease vectors **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 189- 191, 2004.

LUZ, C.; BATAGIN, I. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. **Mycopathologia** v.160, p.51-62, 2005.

LUZ, C.; RODRIGUES, J.; ROCHA, L.F. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, v. 122, p. 29-35, 2012.

MARTI, G.A.; BALSALOBRE, A.; SUSEVICH, M.L.; RABINOVICH, J.E.; ECHEVERRIA, M.G. Detection of Triatomine infection by *Triatoma virus* and horizontal transmission:



protecting insectaries and prospects for biological control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 124, p. 57-60, 2015.

MURILLO-ALONSO, K.T.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V.M.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; CABRERA-BRAVO, M.; TORIELLO, C. Effects of *Metarhizium anisopliae* on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) over different types of wall surfaces. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, p. 466-477, 2019.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 153-65, 1995.

NOCERINO, F., HERNÁNDEZ, A. Establishment of baseline data on the insecticide susceptibilities of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* in Venezuela. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 20, p. 366-369, 1986.

PERFETTI, D.J.C.; MORENO, P.M.; QUINTERO, M.E.A. Effects of Thermal, Saline and pH Gradients on *in vitro* Germination of a Native Isolate of *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, Pathogenic to *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata*. **Revista Científica**, v. XVII, p. 627-631, 2007.

PERFETTI, D.J.C.; MORENO, P.M. Histopathological and ultraestructural study of *Beauveria bassiana* (Ascomycota) infection on *Rhodnius prolixus* (Triatominae). **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 51, p. 71-79, 2011.

PERFETTI, D.J.C.; MORENO, P.M. Effect of aqueous and oil-based formulations of 13 native isolates of *Beauveria Bassiana* (Ascomycota) on *Rhodnius prolixus* (Triatominae) under experimental conditions. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.27, p.771-782, 2016.

PERFETTI, D.C.; MORENO, P.M. Susceptibility of iv instar nymphs of *Triatoma maculata* (Triatominae) to a native isolate of *Beauveria bassiana* s.l. (LF14) (Ascomycota), with histopathological and ultrastructural aspects. **Saber**, v. 30, p. 284-292, 2018.

PESSOA, G.C.A. **Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae)**. (Dissertação) Mestrado em Ciências da Saúde - Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2008.

PESSOA, G.C.D; VINÃS, P.A.; ROSA, C.L.; DIOTAIUTI, L. History of insecticide resistance of Triatominae vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p; 380-389, 2015.

RANGEL, D.E.N.; PIEDRABUENA, A.E.; ROITMAN, I.; MESSIAS, C.L. Laboratory and field studies for the control of Chagas disease vectors using the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. e21745, 2000.

ROCHA, L.F.; LUZ, C. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. **Transactions of the Royal Society**

of **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, 417-419, 2011.

ROMAÑA, C.A.; FARGUES, J. Sensibilité des larves de l'hémiptère hématophage *Rhodnius prolixus* (Triatominae) aux hyphomycètes entomopathogènes. **Entomophaga**, v. 32, p. 167-179, 1987.

ROMAÑA, C.A.; FARGUES, J. Relative Susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 363-368, 1992.

RUIZ-SANCHEZ, E.; ORCHARD, I.; LANGE, A.B. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). **Toxicon**, v. 55, p. 1162-1170, 2010.

SANTOS, C.B.; TAVARES, M.T.; LEITE, G.R.; FERREIRA, A.L.; ROCHA, L.S.; FALGUETO, A. First report of *Aprostocetus asthenogmus* (Hymenoptera: Eulophidae) in South America and parasitizing eggs of Triatominae vectors of Chagas Disease. **Journal of Parasitology Research**, v. 547439, p. 1-4, 2014.

SHERLOCK, I.R.A.; GUITTON, N. Observações sobre ação do fungo *Metarrhizium anisopliae* metschnikoff sobre algumas espécies de triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 234-239, 1982.

TIAGO, P.V.; OLIVEIRA, N.T.; LIMA, E.A.L.A. Biological insect control using *Metarrhizium*

*anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v.44, p.645-651, 2014.

VASSENA, C.V., PICOLLO, M.I., ZERBA, E.N. Insecticida resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 51-55, 2000.

VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, M.G.; CIREROL-CRUZ, B.E.; TORRES-ESTRADA, J.L.; LÓPEZ, M.H.R. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in Mexico **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 716-722, 2014.

WHO. **Chagas disease**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em 13/12/2022.

ZERBA, E. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. **Medicina**, v. 59, p. 41-46, 1999.

**Anexo 2.** Artigo científico que será submetido para publicação na revista internacional *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*

**Potential of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae)**

Patricia Forli Schwartz Freire<sup>1</sup>, Vinícius Nataniel Gimenez<sup>2</sup>, Cleber Galvão<sup>3\*</sup>, João Aristeu da Rosa<sup>4†</sup>, Kaio Cesar Chaboli Alevi<sup>1,3†</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Tecnologia de Piracicaba, Av. Rio Claro, 290, 13414-048, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

† Contributed equally as last authors

## Abstract

Chagas disease (CD) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The history of control of CD vectors in Brazil is based mainly on chemical control using insecticides. However, several evidences of resistance to insecticides have been observed in triatomines. The biological control of triatomines can be performed using parasitoid wasps (Microhymenoptera), virus (*Triatoma virus*) and entomopathogenic fungi. Given the importance of *Boveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* fungi in the biological control of triatomines, we evaluated the potential of these fungi in the control of *Rhodnius neglectus*. The analyzes showed that both fungi had little influence on the hatching rate of eggs (non-hatching of 25-28.30% of the eggs) and nymph mortality rates (mortality of 8.57-21.43%) and adults (mortality of 13.33-24.44%) when compared to water treatment (non-hatching of 30% of the eggs and mortality of 0-30%). Thus, we demonstrate that the fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* are not effective in the control of *R. neglectus* and we emphasize the need for further studies in new genera and species of Triatominae before the use of entomopathogenic fungi by vector control programs (individually or in integrated management).

**Keywords:** Chagas disease vector, Biological control, Rhodniini

## Introduction

Chagas disease (CD) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae).<sup>1,2</sup> This neglected disease is commonly found in endemic areas of 21 Latin American countries, where it is mainly vector-transmitted by triatomines (Hemiptera, Triatominae), that is, when humans come

into contact with feces and/or urine of these insects infected by *T. cruzi*.<sup>1,2</sup> Thus, as CD has no cure in the chronic phase and the acute phase is usually asymptomatic, the World Health Organization (WHO) suggests that vector control is the main way to mitigate new cases of the disease.<sup>1,2</sup>

The history of control of CD vectors in Brazil is based mainly on chemical control with the following insecticides: Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT), Hexachlorocyclohexane (HCH), Benzene Hexachloride (BHC), Deltamethrin and Malathion.<sup>3,4</sup> However, several evidences of resistance to insecticides have been observed in triatomines.<sup>5-10</sup> Based on this, alternative research using biological controllers has been carried out<sup>11-15</sup>, aiming to assist in the establishment of rational and effective strategies to control arthropod vectors<sup>16</sup>, since they cause low environmental damage.<sup>17</sup>

The biological control of triatomines can be performed using parasitoid wasps (Microhymenoptera)<sup>14</sup>, virus (*Triatoma virus*)<sup>15</sup> and entomopathogenic fungi, such as those of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Evlachovaea*, *Isaria*, *Gliocladium*, *Talaromyces* and *Paecilomyces*.<sup>11-13,18-20</sup> Although several species of fungi were tested, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are the most studied for use in the control of triatomines<sup>11-13</sup>, being most of the efficacy tests of entomopathogenic fungi in triatomines carried out in *T. infestans* and *R. prolixus*.<sup>11-13</sup>

Although *T. infestans* and *R. prolixus* present worldwide importance in the vectorial transmission of CD,<sup>21</sup> there are other species that stand out as vectors of CD in Brazil, such as *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. rubrofasciata* and *R. neglectus*.<sup>22</sup> *Rhodnius neglectus* is an endemic species of Brazil that is distributed in 14 states: Acre, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Paraíba, Piauí, São

Paulo and Tocantins<sup>21,23</sup>, being one of the most collected triatomines in the state of São Paulo.<sup>24</sup> This vector has already been found naturally infected by *T. cruzi* and has the habit of invading homes<sup>25-27</sup>, highlighting its epidemiological importance for CD.

Given the importance of *B. bassiana* and *M. anisopliae* fungi in the biological control of triatomines, we evaluated the potential of these fungi in the control of *R. neglectus*.

## Materials and Methods

For biocontrol tests on the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* (sold by the company Koppert as Metarril E9 and Boveril WP PL63, respectively), were used: 180 eggs, 210 newly-hatched first-instar nymphs (according to Garcia et al.<sup>28</sup>) and 270 adults (135 males and 135 females) of *R. neglectus* fed on duck blood. The insects used were from of the Triatominae Insectory of the Faculty of Pharmaceutical Sciences (FCFAR/UNESP), Araraquara Campus, São Paulo, Brazil. For testing the effectiveness of the fungus *B. bassiana*, 0.375g of commercial product were used ( $1 \times 10^8$  viable conidia/g) diluted in 200 ml of water [according to the supplier's instruction to control *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Curculionidae), as there is no recommended dose for Triatominae]. For the tests of effectiveness of the fungus *M. anisopliae*, were used 1.2g of commercial product ( $1.39 \times 10^8$  viable conidia/g) diluted in 200 ml of water [dose doubled in relation to that used in the control of *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera, Cercopidae), because there is no recommended dose for Triatominae and although both are hemipterans, triatomines are larger than cercopids]. The application of the products takes place in a Potter's tower, using 2 ml of the products. As a control group, water was used.

The tests were carried out as follows: eggs (group 1 – 60 eggs treated with *B. bassiana*, group 2 – 60 eggs treated with *M. anisopliae* and group 3 – 60 eggs treated with



water, with 12 replicates of five eggs in each of the groups), nymphs (group 1 – 70 nymphs treated with *B. bassiana*, group 2 – 70 nymphs treated with *M. anisopliae* and group 3 – 70 nymphs treated with water, with 14 replicates of five nymphs in each group)<sup>28</sup> and adults [group 1 – 90 adults treated with *B. bassiana*, group 2 – 90 adults treated with *M. anisopliae* and group 3 – 90 adults treated with water, with 18 replicates (nine for males and nine for females) of five adults in each of the groups].

The spraying of fungi and water was performed in Petri dishes (60x15mm) lined with filter paper. Subsequently, the dishes were closed and placed in a climate-controlled chamber (temperature of 25°C ± 2°C, relative humidity of 75±5% and 12 hours of photoperiod), for a total period of 15 days. After the applications, the number of dead individuals per treatment was evaluated daily and the mortality rate was calculated by relative frequency (%). To confirm that mortality was the result of entomopathogenic fungi, dead nymphs were placed in humid chambers (inside an incubator at 25±1°C) to promote fungal development and sporulation.

## Results and Discussion

Analysis of the potential of *B. bassiana* in *R. neglectus* resulted in non-hatching of 28.30% of the eggs (17 eggs), in the mortality of 8.57% of the nymphs (6 nymphs) and in the mortality of 24.44% of adults (22 adults), being 12.22% males and 12.22% females (11 males and 11 females). Analysis of the potential of *M. anisopliae* resulted in non-hatching of 25% of the eggs (15 eggs), in the mortality of 21.43% of the nymphs (15 nymphs) and in the mortality of 13.33% of adults (12 adults), being 10% males and 3.33% females (9 males and 3 females). The control group resulted in non-hatching 30% of the eggs (18 eggs), in no nymph mortality and in the mortality of 30% of adults (27 adults), being 9%

males and 18.88% females (10 males and 17 females). Thus, the results demonstrate the ineffectiveness of the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* in the control of *R. neglectus*, as the control group resulted in no hatching/mortality equal to or greater than the experimental groups.

Although there is a global project responsible for future programs of Integrated Pest Management of Triatominae<sup>29,30</sup>, carrying out chemical and biological control concomitantly presents some problems: Cazorla and Moreno<sup>30</sup> evaluated the "in vitro" compatibility of native *B. bassiana* isolates with organophosphate chemical insecticides (Malation 81.5% and Fenitrothion 45.8%) and pyrethroids (Beta-Cypermethrin 26.31% and Deltamethrin 2.5%) and observed that at recommended doses, chemical insecticides affected the average percentage of fungal germination by more than 90%, being only Deltamethrin compatible with *B. bassiana*, when used at half the recommended dose.

Several experiments suggest that the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* are effective in the biological control of Triatominae: Romaña and Fargues<sup>11</sup> tested different strains of *B. bassiana* on *R. prolixus* and observed 100% mortality of triatomines for two of them; Marti et al.<sup>31</sup>, Garcia<sup>32</sup> and Vázquez-Martínez et al.<sup>33</sup> also observed 100% mortality of *T. infestans*, *R. prolixus* and *T. dimidiata*, respectively. Furthermore, Forlani et al.<sup>34</sup> tested a formulation based on *B. bassiana* and observed that the fungus was highly virulent against *T. infestans*. Garcia<sup>32</sup>, for example, observed that isolates of *M. anisopliae* were more virulent to first-instar nymphs of *R. prolixus* compared to isolates of *B. bassiana* and Flores-Villegas et al.<sup>20</sup> concluded that fifth-instar nymphs of *T. pallidipennis* treated with *M. anisopliae* died before the specimens treated with *I. fumosorosea*. However, some authors report the non-efficacy of fungi, namely, Dias and Leão<sup>35</sup> evaluated the action of this fungus on *T. infestans* and *T. vitticeps* and observed that, although the insects showed

some susceptibility to *B. bassiana*, under the conditions of the experiment carried out by the authors, were not able to cause significant mortality rates. Already Vázquez-Martínez et al.<sup>33</sup> reported that the mortality rate of adult *T. dimidiata* was only 25% when treated with *M. anisopliae*.

Sherlock and Guitton<sup>36</sup> evaluated the action of *M. anisopliae* on fourth and fifth instar nymphs of the species *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis* and *R. neglectus*. In 50 days of experiment, the authors observed that the fungus did not result in the mortality of any specimen of *R. neglectus*. On the other hand, Luz et al.<sup>37</sup> evaluated the action of *B. bassiana* on third-instar nymphs of *R. neglectus* and observed a mortality rate of 77.7%. As observed by Sherlock and Guitton<sup>36</sup>, our results demonstrate, for the first time, that the fungus *M. anisopliae* and *B. bassiana* do not result in significant mortality for eggs, first-instar nymphs and adults of *R. neglectus*.

Luz et al. (1998b) evaluated the influence of the target triatomine species on susceptibility to *B. bassiana*. The authors observed that the mortality rate, survival time estimates and conidial production differed significantly between the genera *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma* and *Dipetalogaster*. Among the different species analyzed, *P. lignarius*, *D. maxima*, *T. picturata*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *T. infestans* and *T. brasiliensis* were the most susceptible to fungal infection (mortality > 80%), while *P. lecticularia*, *T. matogrossensis*, *T. protracta*, *T. rubrovaria*, *T. vitticeps*, *T. williami*, *P. megistus*, *R. nasutus* and *R. neglectus* showed lower mortality rates.

Thus, we demonstrate that the fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* are not effective in the control of *R. neglectus* and we emphasize the need for further studies in new genera and species of Triatominae before the use of entomopathogenic fungi by vector control programs (individually or in integrated management).

## Acknowledgements

We appreciate the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) - Finance Code 001, *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ) for financial support.

## Ethical standards

Not applicable.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. WHO (World Health Organization), 2022. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available at: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1). Accessed December 22, 2022.
2. DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative), 2022. Doença de Chagas. Available at: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Accessed December 22, 2022.
3. Zerba E, 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41–46.
4. Pessoa GCD, Vinãs PA, Rosa CL, Diotaiuti L, 2015. History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Rev Soc Bras Med Trop* 48: 380–389.

5. Fox I, Bayona IG, Orozco HI, 1966. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. Bull World Health Organ 35: 974–976.
6. González-Valdivieso FE, Diaz BS, Nocerino F, 1971. Susceptibility of *Rhodnius prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/188269>. Accessed December 22, 2022.
7. Nocerino F, Hernández A, 1986. Establishment of baseline data on the insecticide susceptibilities of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* in Venezuela. Bull Pan Am Health Organ 20: 366–369.
8. Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN, 2000. Insecticida resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med Vet Entomol 14: 51–55.
9. Acevedo GR, Cueto GM, Germano M, Orihuela OS, Cortez MR, Noireau F, Picollo MI, Vassena C, 2011. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. J Med Entomol 48: 830–835.
10. Pessoa GCD, Obara MT, Rezende JG, Mello BV, Ferraz ML, Diotaiuti L, 2015. Deltamethrin toxicological profile of peridomestic *Triatoma sordida* in the North of Minas Gerais, Brazil. Parasit Vect 8: 263.
11. Romaña CA, Fargues J, 1987. Sensibilidad des larves de l'hémiptère hématophage *Rhodnius prolixus* (Triatominae) aux hyphomycètes entomopathogènes. Entomophaga 32, 167–179.
12. Romaña CA, Fargues J, 1992. Relative Susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. Mem Inst Oswaldo Cruz 87, 363–368.

13. Luz C, Rocha LFN, Nery GV, 2004. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in Central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Neot Entom* 33: 783–791.
14. Santos CB, Tavares MT, Leite GR, Ferreira AL, Rocha LS, Falgueto A, 2014. First report of *Aprostocetus asthenogmus* (Hymenoptera: Eulophidae) in South America and parasitizing eggs of Triatominae vectors of Chagas Disease. *J Parasit Res* 547439: 1–4.
15. Marti GA, Balsalobre A, Susevich ML, Rabinovich JE, Echeverria MG, 2015. Detection of Triatomine infection by *Triatoma virus* and horizontal transmission: protecting insectaries and prospects for biological control. *J Invert Pat* 124: 57–60.
16. Chandler D, Davidson G, Pell JK, Ball BV, Shaw K, Sunderland KD, 2000. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Sci Technol* 10: 357–384.
17. Lacey LA, Goettel MS, 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* 40: 3–27.
18. Luz C, Rocha LF, Humber RA, 2003. Record of *Evlachovaea* sp. (Hyphomycetes) on *Triatoma sordida* in the state of Goiás, Brazil, and its activity against *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae). *J Med Entom* 4: 451–454.
19. Rocha LF, Luz C, 2011. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 417–419.
20. Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Toriello C, Bucio-Torres MI, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A, 2016. Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two

- entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. Paras Vect 9: 176.
21. Galvão C, 2014. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba, Brasil: Sociedade Brasileira de Zoologia.
22. Corrêa RR, 1968. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. Rev Bras Malar Doen Trop 20: 39–81.
23. Ramos LJ, Castro GVS, Souza JL, Oliveira J, Rosa JA, Camargo LMA, Cunha RM, Meneguetti DUO, 2018. First report of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from the State of Acre, Brazil, and the Brazilian Western Amazon Region. Rev Soc Bras Med Trop 51: 212–214.
24. Silva RA, Estevão VAO, Duarte NA, 2019. Triatomíneos na Região Metropolitana de São Paulo: vigilância entomológica. BEPA 16:13–18.
25. Silva RA, Maldonado LA, Suto R, Costa AJB, Sabião JF, Luz-Requena KAM, Guariente CS, Almeida CC, Montanholi RO, Rodrigues SC, Bracco EML, Rodrigues TF, Gomes JR, 2022. Fatores associados à infestação por *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954) em palmeiras de áreas urbanas na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, 2014 a 2020. Rev Pan Amaz Saude 13: e202200965.
26. Carvalho, DB, Almeida CE, Rocha CS, Gardim S, Mendonça VJ, Ribeiro AR, Alves ZCPVT, Ruellas KT, Vedoveli A, Rosa JA, 2014. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto city, São Paulo, Brazil. Acta Trop 130: 35–38.
27. Rodrigues, VLCC, Pauliquevis Jr C, Silva RA, Wanderley DMV, Guirardo MM, Rodas LAC, Casanova C, Pachioni ML, Souza WA, Costa AJB, Bitelo D, Tonietti

- VLB, 2014. Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 56: 213–218.
28. Garcia AR, Rocha AP, Moreira CC, Rocha SL, Guarneri AA, Elliot SL, 2016. Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0005128.
29. Pereira FM, Penados D, Dorn PL, Alcántara B, Monroy MC, 2022. The long-term impact of an Ecohealth intervention: Entomological data suggest the interruption of Chagas disease transmission in southeastern Guatemala. *Acta Trop* 235: 106655.
30. Cazorla D, Morales P, 2010. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. *Bol Mal Salud Amb* 50: 261–270.
31. Marti GA, Scorsetti AC, Siri A, Lastra CC, 2005. Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. *Mycopathologia* 159: 389–391.
32. Garcia, 2013. Entomopathogenic fungi for biological control of Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Available at: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/26652/1/texto%20completo.pdf>. Accessed December 22, 2022.
33. Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, López MHR, 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:



- Reduviidae), a vector of Chagas disease in Mexico Rev Soc Bras Med Trop 47: 716–722.
34. Forlani L, Pedrini N, Juárez MP, 2011. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. Res Rep Trop Med 2: 135–140.
35. Dias JCP, Leão AEA, 1967. Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomíneos brasileiros criados em laboratório. Atlas Soc Biol 2: 85–87.
36. Sherlock IRA, Guitton N, 1982. Observações sobre ação do fungo *Metarrhizium anisopliae* metchnikoff sobre algumas espécies de triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Rev Inst Med Trop São Paulo 24: 234–239.
37. Luz C, Silva IG, Cordeiro CM, Tigano MS, 1998. *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. J Med Entomol 35: 977–979.

## 5. CONCLUSÃO

Embora os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentem potencial para controlar *R. neglectus*, a dose utilizada no presente trabalho não foi suficiente para obtenção de baixas taxas de eclosão e altas taxas de mortalidade (Tabela 1), fazendo-se necessário a utilização de outras técnicas de forma integrada, para que o controle e prevenção da DC seja eficaz. Por fim, como não existe recomendação de dose de aplicação para triatomíneos na bula dos produtos comerciais, novos estudos são necessários para o diagnóstico da dose ideal para o controle desses vetores.

**Tabela 1** – Taxas de mortalidade de *R. neglectus* após aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

<b>Mortalidade</b>						
	<i>B. bassiana</i>		<i>M. anisopliae</i>		Água destilada	
<b>Ovos - 60</b>	<b>28,3%</b>	<b>17 ovos</b>	<b>25%</b>	<b>15 ovos</b>	<b>30%</b>	<b>18 ovos</b>
<b>Ninfas - 70</b>	<b>8,57%</b>	<b>6 ninfas</b>	<b>21,43%</b>	<b>15 ninfas</b>	<b>0%</b>	<b>0 ninfas</b>
<b>Adultos - 90</b>	<b>24,44%</b>	<b>22 adultos</b> <b>(11♂/11♀)</b>	<b>13,33%</b>	<b>12 adultos</b> <b>(9♂/3♀)</b>	<b>30%</b>	<b>27 adultos</b> <b>(10♂/17♀)</b>

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G.R., et al. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *Journal of Medical Entomology*, v. 48, p. 830-835, 2011.

ALVES, S. B. Controle Microbiano de Artrópodes. Piracicaba: Fealq, 1163p., 1998.

BENCHIMOL-BARBOSA, P.R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology*, v. 112, p. 132-133, 2006.

CARVALHO, D.B., et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto city, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica*, v. 130, p. 35-38, 2014.

CHANDLER, D., et al. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Science and Technology*, v. 10, n. 4, p. 357-384, 2000.

COCKBURN, J.M. Laboratory investigations bearing on possible insecticide resistance in triatomine bugs. WHO/72.359, 1972.

CORREIA, R.R. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Malariologia*, v. 20, p. 39-81, 1968.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE (DNDI), 2022. Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em 09 de março de 2022.

FARGUES, J., LUZ, C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 8, p. 323-334, 1998.

FOX, I., BAYONA, I.G., OROZCO, H.I. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 35, p. 974-976, 1966.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. 2014.

GARCIA A.R., ROCHA A.P., MOREIRA C.C., ROCHA S.L., GUARNERI A.A., ELLIOT S.L., Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. 2016

GILL, H.K., GARG, H. Pesticides: environmental impacts and management strategies. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Pesticides - Toxic aspects*. Rijeka: InTech; p.187-230, 2014.

GONZÁLEZ-VALDIVIESO, F.E., DIAZ, B.S., NOCERINO, F. Susceptibility of *Rhodnius*

*prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. WHO/VBC/71.264, 1971.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology, v. 43, p. 243-270, 1998.

LACEY, L.A., GOETTEL, M.S. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. Entomophaga, v. 40, p. 3-27, 1995.

LUZ C., ROCHA L.F.N., NERY G.V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in Central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). Neotropical Entomology, v. 33, p. 783-791, 2004.

MARTI, G.A., et al. Detection of Triatomine infection by *Triatoma virus* and horizontal transmission: protecting insectaries and prospects for biological control. Journal of Invertebrate Pathology, v. 124, p. 57-60, 2015.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. Veterinary Parasitology, v. 57, p. 153-65, 1995.

NELSON, M.J., COLMENARES, P. 1979. Topical application of insecticides to *R. prolixus* (Reduviidae: Triatominae) a Chagas disease vector. Document WHO/BVC/79.737. Geneva, WHO, 1979.

NOCERINO, F., HERNÁNDEZ, A. Establishment of baseline data on the insecticide

susceptibilities of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* in Venezuela. Bulletin of the Pan American Health Organization, v. 20, p. 366-369, 1986.

PESSOA, G.C.A. Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae), Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. 95p., 2008.

PESSOA, G.C.D, et al. History of insecticide resistance of Triatominae vectors. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, p; 380-389, 2015.

RODRIGUES, V.L.C.C., et al. Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 56, p. 213-218, 2014.

ROMAÑA, C.A., FARGUES, J. Relative Susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 87, p. 363-368, 1992.

ROMAÑA, C.A., FARGUES, J. Sensibilité des larves de l'hémiptère hématophage *Rhodnius prolixus* (Triatominae) aux hyphomycètes entomopathogènes. Entomophaga, v. 32, p. 167-179, 1987.

SANTOS, C.B., et al. First report of *Aprostocetus asthenogmus* (Hymenoptera:

Eulophidae) in South America and parasitizing eggs of Triatominae vectors of Chagas Disease. *Journal of Parasitology Research*, v. 547439, p. 1-4, 2014.

SHIKANAI-YASUDA, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 33, p. 351-357, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M.A., CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, p. 845–852, 2012.

SILVA, R.A. Estado atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, p. 742-255, 2019.

SILVA, R.A., et al. Monitoring *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954) populations' susceptibility to insecticide used in controlling actions in urban areas northwest of São Paulo state. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0553-2021>.

VARGAS, A. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Caderno de Saúde Publica*, v. 34, p. 1-8, 2018.

VASSENA, C.V., PICOLLO, M.I., ZERBA, E.N. Insecticida resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 14, p. 51-55, 2000.

VESTERGAARD S, ET al. Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 73, p. 25-33, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 09 de março de 2022.

ZERBA, E. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*, v. 59, p. 41-46, 1999.