

## AGRO LÍDER LTDA

NIRE 42203255148  
CNPJ: 05.443.140/0001-58

### 10ª (DÉCIMA) ALTERAÇÃO E CONSOLIDAÇÃO DE CONTRATO SOCIAL

Por este instrumento particular de alteração e consolidação de contrato social de sociedade empresária limitada, as partes contratantes a seguir individualizadas:

**01) RICARDO URBANCIC**, brasileiro, divorciado, engenheiro agrônomo, natural de Chapecó, SC, residente e domiciliado, na cidade de Chapecó Estado de Santa Catarina, à Rua Independência, nº 430 E, Bairro Jardim Itália, CEP: 89.802-061, portador da Cédula de Identidade nº 12R 1.713.339 - SSP/SC e do CPF sob nº 739.384.599-72, e;

**02) ELIZETE ANGELA GUAREZI**, brasileira, empresária, solteira, 07/11/1979, residente e domiciliada na Avenida Nereu Ramos nº 1050-E, Apartamento nº 502, Ed. La Defanse, Bairro Presidente Médici, CEP: 89801-106, nesta cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, portadora da Cédula de Identidade RG nº 7.805.670-SSP/SC e inscrita no CPF/MF sob o nº 030.120.749-61, e;

**03) LETICIA BELATTO BORDIGNON**, brasileira, professora, solteira, 04/10/1992, residente e domiciliada na Avenida Nereu Ramos nº 1050-E, Apartamento nº 502, Ed. La Defanse, Bairro Presidente Médici, CEP: 89801-106, nesta cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, portadora da Cédula de Identidade RG nº 5.067.917-SSP/SC e inscrito no CPF/MF sob o nº 045.622.699-01, e;

**04) ISABELA BELATTO BORDIGNON**, brasileira, estudante, solteira, 19/03/1997, residente e domiciliada na Avenida Nereu Ramos nº 1050-E, Apartamento nº 502, Ed. La Defanse, Bairro Presidente Médici, CEP: 89801-106, nesta cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, portadora da Cédula de Identidade RG nº 5.067.918-SSP/SC e inscrito no CPF/MF sob o nº 045.622.729-61.

**ÚNICOS** sócios componentes da sociedade **AGRO LÍDER LTDA**, pessoa jurídica de direito privado, com sede e foro jurídico na cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, na Rua Rui Barbosa, nº 556 E, Centro, CEP: 89801-040, inscrita no CNPJ sob o nº 05.443.140/0001-58 com seu Contrato Social Constitutivo registrado/arquivado na JUCESC sob nº 42203255148 em 23/12/2002, e a última alteração registrada na JUCESC sob nº 20177583720 em 01/08/2017.

Deliberando por unanimidade, consoante faculdade estabelecida pelo parágrafo 3º do art. 1.072, da Lei 10.406/02 (Código Civil Brasileiro), na melhor forma da lei e de direito; **RESOLVEM**, de comum e perfeito acordo, alterar seu Contrato Social Constitutivo e alterações posteriores, visto haver: **a)** ampliação e adequação dos objetivos sociais; **b)** aumento do capital social; **c)** cessão de quotas; e, **d)** consolidação do contrato social constitutivo e alterações posteriores, sendo o que fazem mediante os termos e condições seguintes:

**Cláusula Primeira:** Pelo presente instrumento, deliberam os sócios ampliar e adequar os objetivos sociais da sociedade, de sorte que a partir dessa data, passará a desenvolver as seguintes atividades: **O COMÉRCIO VAREJISTA E ATACADISTA DE GRÃOS, HERBICIDAS, INSETICIDAS, FUNGICIDAS, SEMENTES, ADUBOS, CORRETIVOS,**





http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcfTEdxvM9F7ygb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5cvuIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILIAN GHENOI73938459972-RICARDO URBANCIC14138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI104562269901-LETICIA BELATTO BORDIGNON104562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

**RAÇÕES PARA ANIMAIS, FERROS, MATERIAIS DE CONSTRUÇÃO, PREGOS, ARAMES, FERRAGENS E IMPLEMENTOS AGRÍCOLAS; O COMÉRCIO VAREJISTA DE ARTIGOS VETERINÁRIOS; A REPRESENTAÇÃO COMERCIAL; A ELABORAÇÃO DE PROJETOS PARA SUA EXECUÇÃO; A PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS DE INSTALAÇÃO E MONTAGEM DE CERCAS, GRADIS, TELAS METÁLICAS E SEUS ACESSÓRIOS E O COMÉRCIO VAREJISTA DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS.**

**Cláusula Segunda:** Os sócios deliberam aumentar o capital social da presente sociedade na seguinte forma:

**a) ELIZETE ANGELA GUAREZI**, a quantidade de 65.000 (sessenta e cinco mil) quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma, no importe de R\$ 65.000,00 (sessenta e cinco mil reais).

**b) RICARDO URBANCIC**, a quantidade de 65.000 (sessenta e cinco mil) quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma, no importe de R\$ 65.000,00 (sessenta e cinco mil reais).

**§ Primeiro:** O aumento de capital acima previsto e consolidado no importe de R\$ 130.000,00 (cento e trinta e três mil reais), é inteiramente subscrito e integralizado neste ato pelos sócios **ELIZETE ANGELA GUAREZI e RICARDO URBANCIC** mediante a utilização do saldo que a empresa possui devidamente registrada na escrituração contábil da sociedade em conta ADIANTAMENTO PARA FUTURO AUMENTO DE CAPITAL, passando o capital social da sociedade a ser de **R\$ 1.630.000,00 (hum milhão, seiscentos e trinta mil reais)** dividido em **1.630.000 (hum milhão, seiscentos e trinta mil)** quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma, distribuído entre os sócios assim identificada:

Quotistas	Quant.	Valor (R\$)	(%)
RICARDO URBANCIC	815.000	815.000,00	50
ELIZETE ANGELA GUAREZI	755.000	755.000,00	46,32
ISABELA BELLATO BORDIGNON	30.000	30.000,00	1,84
LETÍCIA BELLATO BORDIGNON	30.000	30.000,00	1,84
<b>TOTAL</b>	<b>1.630.000</b>	<b>1.630.000,00</b>	<b>100</b>

**§ Segundo:** A operação de aumento de capital, identificada na presente cláusula, é realizada respeitando-se o direito de preferência exigido pelo Contrato Social Constitutivo, pelo que, todas os sócios manifestam expressa concordância e aprovação mediante a assinatura do presente instrumento.

**Cláusula Terceira:** Ainda por cessão de quotas e direitos sociais, a sócia quotista **ELIZETE ANGELA GUAREZI**, de sua participação no capital social totalmente integralizada em moeda corrente nacional, detentora da quantidade de 755.000 (setecentos e cinquenta e cinco mil) quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma, transfere, como de fato cedido e transferido tem, a quantidade de 5.200 (cinco mil e duzentas) quotas de capital na seguinte forma: à sócia quotista **ISABELA BELLATO BORDIGNON**, os direitos e obrigações sociais inerentes à 2.600 (duas mil e seiscentas) quotas de capital, pelo valor de R\$ 2.600,00 (dois mil e seiscentos reais) e à sócia quotista **LETÍCIA BELLATO BORDIGNON**, os direitos e obrigações sociais inerentes à 2.600 (duas mil e seiscentas) quotas de capital, pelo valor de R\$ 2.600,00 (dois mil e seiscentos reais).





http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcfEExdvXm9FtYgb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5cVvIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILIAN GHENOI7393845992-RICARDO URBANCIC14138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI104562269901-LETICIA BELATTO BORDIGNON104562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

**§ Primeiro:** As operações de cessão de quotas e direitos sociais, identificadas nesta cláusula, são realizadas a título oneroso da cedente para com as mencionadas cessionárias, de acordo com instrumento particular de compra e venda de participação societária desta mesma data, esta que, sub-roga-se de ora em diante, em todos os direitos e obrigações inerentes às quotas ora vendidas.

**§ Segundo:** As operações de cessão de quotas de capital, identificadas na presente cláusula, são realizadas respeitando-se o direito de preferência exigido pelo Contrato Social Constitutivo, pelo que, todos os sócios manifestam expressa concordância e aprovação mediante a assinatura do presente instrumento.

**§ Terceiro:** A cedente ainda, dá às cessionárias, a mais ampla, geral e irrevogável quitação, nada mais havendo a reclamar no presente ou futuro, com relação às ditas quotas, assim como em relação à sociedade.

**Cláusula Quarta:** Em decorrência das operações de cessões de quotas constantes na cláusula terceira supra, o capital social da sociedade, já totalmente integralizado em moeda corrente nacional, permanece inalterado no importe total de **R\$ 1.630.000,00 (hum milhão, seiscentos e trinta mil reais)**, dividido em **1.630.000 (hum milhão, seiscentos e trinta mil)** de quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma e, será distribuído entre os sócios da seguinte forma:

Quotistas	Quant.	Valor (R\$)	(%)
RICARDO URBANCIC	815.000	815.000,00	50
ELIZETE ANGELA GUAREZI	749.800	749.800,00	46
ISABELA BELLATO BORDIGNON	32.600	32.600,00	2
LETÍCIA BELLATO BORDIGNON	32.600	32.600,00	2
<b>TOTAL</b>	<b>1.630.000</b>	<b>1.630.000,00</b>	<b>100</b>

**Cláusula Quinta:** Sem solução de continuidade, deliberam os sócios por fim, na melhor forma de direito, consolidar o Contrato Social Constitutivo desta sociedade e alterações posteriores, conforme abaixo segue transcrito:

## CONSOLIDAÇÃO DO CONTRATO SOCIAL DA SOCIEDADE

**AGRO LÍDER LTDA**  
**NIRE 42203255148**  
**CNPJ: 05.443.140/0001-58**

### CAPÍTULO I

### **DA DENOMINAÇÃO – DA SEDE – DO OBJETIVO – DO INÍCIO E PRAZO DE DURAÇÃO:**

**Cláusula 1º** - A sociedade gira sob a denominação de **AGRO LÍDER LTDA**.

**Cláusula 2º** - A sociedade continua vigorando sob a forma de sociedade empresária limitada e será regida por este Contrato Social, pela Lei 10.406/02 (Código Civil Brasileiro), com regência supletiva pela Lei 6.404/76 (Lei das Sociedades por Ações), conforme faculta o parágrafo único do art. 1.053 da Lei 10.406/02 (Código Civil Brasileiro).







http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcfEXdVxM9FtYgb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5CvuIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILIAN GHENOI73938459972-RICARDO URBANCIC114138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI104562269901-LETICIA BELATTO BORDIGNON104562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

**Cláusula 3º** - A sociedade tem a sua sede e foro jurídico na cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, na Rua Rui Barbosa, nº 556 E, Centro, CEP: 89.801-040, podendo estabelecer filiais, agências e escritórios em outros Municípios e Estados da União.

**Cláusula 4º** - A sociedade tem como objetivos: **O COMÉRCIO VAREJISTA E ATACADISTA DE GRÃOS, HERBICIDAS, INSETICIDAS, FUNGICIDAS, SEMENTES, ADUBOS, CORRETIVOS, RAÇÕES PARA ANIMAIS, FERROS, MATERIAIS DE CONSTRUÇÃO, PREGOS, ARAMES, FERRAGENS E IMPLEMENTOS AGRÍCOLAS; O COMÉRCIO VAREJISTA DE ARTIGOS VETERINÁRIOS; A REPRESENTAÇÃO COMERCIAL; A ELABORAÇÃO DE PROJETOS PARA SUA EXECUÇÃO; A PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS DE INSTALAÇÃO E MONTAGEM DE CERCAS, GRADIS, TELAS METÁLICAS E SEUS ACESSÓRIOS E O COMÉRCIO VAREJISTA DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS.**

**Cláusula 5º** - A sociedade iniciou suas atividades em 02 de janeiro de 2003 e, seu prazo de duração continua por tempo indeterminado.

## **CAPÍTULO II**

### **DO CAPITAL SOCIAL – DAS QUOTAS – DOS QUOTISTAS E SUAS RESPONSABILIDADES:**

**Cláusula 6º** - O capital social da sociedade já totalmente integralizado em moeda corrente nacional, é de R\$ 1.630.000,00 (um milhão e seiscentos e trinta mil reais), dividido em 1.630.000 (um milhão e seiscentos e trinta mil) quotas de capital, de valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma e, se encontra distribuído entre os sócios da seguinte forma:

<b>Quotistas</b>	<b>Quant.</b>	<b>Valor (R\$)</b>	<b>(%)</b>
RICARDO URBANCIC	815.000	815.000,00	50
ELIZETE ANGELA GUAREZI	749.800	749.800,00	46
ISABELA BELLATO BORDIGNON	32.600	32.600,00	2
LETÍCIA BELLATO BORDIGNON	32.600	32.600,00	2
<b>TOTAL</b>	<b>1.630.000</b>	<b>1.630.000,00</b>	<b>100</b>

**Cláusula 7ª** - As quotas sociais são indivisíveis em relação à sociedade e não poderão ser caucionadas, empenhadas, oneradas ou gravadas totais ou parcialmente, a qualquer título, salvo com autorização de sócios representativos da totalidade do capital social.

**Cláusula 8ª** - A responsabilidade de cada sócio é restrita ao valor de suas quotas, mas todos respondem solidariamente pela integralização do capital social.

**§ Único:** Os sócios não respondem subsidiariamente pelas obrigações sociais.

## **CAPÍTULO III**

### **DO AUMENTO DE CAPITAL – CESSÕES DE QUOTAS – FALECIMENTO DE SOCIOS E DA REDUÇÃO DE CAPITAL:**

**Cláusula 9ª** - Em caso de aumento de capital social, os quotistas terão preferência para subscrição, em igualdade de condição e na exata proporção das quotas que possuem no capital social.

**Cláusula 10ª** - Caso um dos sócios queira ceder suas quotas parcial ou totalmente, neste último caso, retirando-se da sociedade, a esta deverá comunicar por escrito sua decisão,







http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcftExdvXyM9FtYgb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5CvuIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILIAN GHENOI73938459972-RICARDO URBANCI14138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI04562269901-LETTICIA BELATTO BORDIGNON04562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

com antecedência de 60 (sessenta) dias, mencionando o preço estipulado e as condições de pagamento, a fim de que os demais sócios possam, a partir da data do recebimento da comunicação, exercer o direito de preferência na aquisição das quotas do sócio cedente ou retirante.

**§ Único:** Decorrido o prazo de 60 (sessenta) dias sem a manifestação dos quotistas remanescentes, as quotas do sócio cedente ou retirante poderão ser livremente transferidas a terceiros.

**Cláusula 11ª** - Não convindo aos sócios remanescentes o ingresso na sociedade do adquirente das quotas do sócio cedente ou retirante, o capital social será diminuído no valor do capital cedido, devendo a sociedade pagar ao sócio cedente ou retirante, o preço estipulado na comunicação, em 12 (doze) parcelas mensais e sucessivas, a partir do encerramento do exercício social em que ocorreu a comunicação.

**Cláusula 12ª** - Em caso de falecimento, retirada, exclusão, incapacidade civil, extinção e/ou falência/insolvência de qualquer dos sócios, a sociedade não se dissolverá, devendo continuar com os sócios remanescentes, a menos que estes resolvam liquidá-la.

**§ Primeiro:** Mediante a concordância dos sócios remanescentes, os herdeiros/sucessores poderão ingressar na sociedade, caso não haja impeditivos legais, os quais, nela se farão representar por um dentre eles, devidamente credenciado pelos demais enquanto indiviso o quinhão respectivo.

**§ Segundo:** Caso os herdeiros/sucessores não tenham interesse em ingressar na sociedade ou, os sócios remanescentes não os admitir, os haveres do sócio falecido, depois de apurados em balanço especialmente levantado para tal fim, serão pagos em 12 (doze) prestações mensais e sucessivas, vencendo-se a primeira, 90 (noventa) dias depois de apresentada à sociedade, a autorização judicial que permita formalizar-se inteiramente a operação, inclusive perante o Registro Público do Comércio.

**Cláusula 13ª** - Nas hipóteses previstas na cláusula 12ª supra, o valor das quotas a serem pagas será obtido através de avaliação patrimonial, apurada através de balanço especialmente levantado para tal fim.

**Cláusula 14ª** - Ficam facultados, mediante consenso unânime entre os sócios remanescentes, herdeiros/sucessores e sócios cedentes ou retirantes, outras condições de pagamento, desde que não afetem a situação econômico-financeira da empresa.

**Cláusula 15ª** - Em caso de diminuição do capital, será proporcional e igual para cada quota.

#### **CAPÍTULO IV**

#### **DO EXERCÍCIO SOCIAL – DEMONSTRAÇÕES FINANCEIRAS – DESTINAÇÃO DOS LUCROS E PREJUÍZOS E DA CONTABILIDADE:**

**Cláusula 16ª** - O exercício social coincidirá com o ano civil.

**Cláusula 17ª** - Ao final de cada exercício social, proceder-se-á a verificação dos lucros e prejuízos, levantados pelo inventário, balanço patrimonial e de resultado econômico, podendo ainda ser levantados balanços intermediários, adotando-se para tanto o que dispõe os artigos 176 a 191, respectivamente da Lei 6.404/76 (Lei das Sociedades por



Ações), observando-se ainda as demais prescrições legais e técnicas pertinentes à matéria.



**Cláusula 18ª** - Os lucros apurados, após a prestação de contas pelo Administrador, serão atribuídos em partes iguais a cada uma das quotas, cabendo a cada um dos sócios, tantas partes quantas possua integralizado na sociedade, exceto se deliberado de forma diversa em reunião ou assembleia pela totalidade dos sócios quotistas, podendo, a distribuição de lucros ser desproporcional a participação de cada sócio e/ou, a critério dos sócios, ficarem em reservas na sociedade.

**Único:** A critério dos sócios quotistas, os lucros apurados poderão ser distribuídos de forma proporcional e desproporcional a participação dos componentes do capital social, a título de dividendos, em períodos inferiores a 12 meses, com base em balanços e/ou balancetes intermediários. zado na sociedade, podendo, a critério dos sócios, ficarem em reservas na sociedade.

**Cláusula 19ª** - Os prejuízos que porventura se verifiquem, serão mantidos em conta especial para serem amortizados nos exercícios futuros, e, não o sendo, serão suportados pelos sócios, proporcionalmente à participação de cada um no capital social.

**Cláusula 20ª** - A sociedade manterá os registros contábeis e fiscais necessários.

#### **CAPÍTULO V**

#### **DA ADMINISTRAÇÃO – PODERES – LIMITES – OBRIGAÇÕES – REMUNERAÇÃO E DESTITUIÇÃO:**

**Cláusula 21ª** - A sociedade será administrada por 02 (dois) Administradores, quotistas ou não, residentes no País, eleitos a qualquer tempo pelos sócios, com mandato por prazo indeterminado, os quais terão todos os poderes e atribuições que a lei lhes confere para a plena administração dos negócios sociais, tendo poderes plenos para representar a sociedade ativa e passivamente, em Juízo ou fora dele, proceder à alienação, no todo ou em parte, do patrimônio social e de seu fundo de comércio, enfim, para dar qualquer destinação comercial adequada ao patrimônio social, sempre respeitada a proporcionalidade da participação no capital social.

**§ Primeiro:** Os Administradores poderão praticar isoladamente os atos de gestão e administração da sociedade. Porém, será necessária a assinatura de ambos os Administradores em conjunto, em todos os atos que importarem em: alienar, permutar, onerar ou transferir sob qualquer forma, os bens sociais integrantes do ativo imobilizado, subscrever ações ou quotas de capital em outras Sociedades, nomear e destituir procuradores, abrir e encerrar contas bancárias e, a contratação de empréstimos e financiamentos de qualquer espécie.

**§ Segundo:** As procurações *ad judicium* poderão ser outorgadas por qualquer dos Administradores isoladamente, por tempo indeterminado, porém, sempre com poderes específicos.

**§ Terceiro:** A sociedade não pode ser vinculada por seus Administradores em atos ou negócios alheios aos interesses sociais ou, em favorecimento pessoal dos Administradores, nem se obrigar por meio deles, em concessões de fianças, avais ou outras garantias em favor de terceiros, ou em seus próprios favores, sob pena de



responsabilidade pessoal e ilimitada pelo excesso de mandato e pelos atos praticados com violação a este parágrafo, salvo com autorização de todos os sócios.



**Cláusula 22ª** - São expressamente vedados, sendo nulos e inoponíveis em relação à Sociedade, os atos praticados por quaisquer dos sócios, Administradores, mandatários, representantes ou funcionários da Sociedade, que a envolverem em obrigações relativas a negócios ou operações estranhas ao objeto social ou, em favorecimento pessoal destas ou de outras pessoas, como concessões de fianças, avais ou outras garantias de qualquer espécie, ou ainda, em desacordo com o disposto na cláusula acima, sob pena de responsabilidade pessoal e ilimitada pelo excesso de mandato e pelos atos praticados em violação a esta cláusula, salvo se autorizado pela totalidade dos sócios quotistas.

**Cláusula 23ª** - Em casos de ausência, licença ou impedimento temporário, os Administradores poderão constituir mandatários, sócios ou não, com poderes e funções devidamente atribuídas em instrumento próprio. Ocorrendo vacância, afastamento, renúncia ou impedimento, definitivo, deverá de imediato ser convocada Reunião de Quotistas que elegerá o novo Administrador.

**Cláusula 24ª** - Fica expressamente prevista a possibilidade de Administrador não sócio, que será investido no cargo mediante lavratura de instrumento competente, o qual, após devidamente registrado/arquivado no Registro Público do Comércio, valerá como comprovante adequado da nomeação, submetendo-se ainda, às mesmas condições estabelecidas neste instrumento.

**Cláusula 25ª** - Os sócios que trabalharem na administração da sociedade perceberão, a título de pró-labore, uma quantia fixa mensal estabelecida de comum acordo entre os sócios no início de cada exercício social que, será creditada em conta corrente, de onde retirarão de acordo com a disponibilidade financeira da sociedade até o máximo de seu crédito, exceto se, deliberado de forma diversa em reunião ou assembléia de quotistas.

**Cláusula 26ª** - Até o final do mês de abril de cada ano, os Administradores são obrigados a prestar aos sócios quotistas, contas justificadas de sua administração, apresentando-lhes o inventário, bem como, o balanço patrimonial e o de resultado econômico, na forma da cláusula 17ª deste instrumento.

**Cláusula 27ª** - Ocupam os cargos de Administradores desta Sociedade os quotistas **RICARDO URBANCIC** e **ELIZETE ANGELA GUAREZI**, ambos já anteriormente identificados e qualificados.

**§ Único:** Os Administradores declaram, sob as penas da lei, que não estão impedidos de exercer a administração da sociedade, por lei especial, ou em virtude de condenação criminal, ou por se encontrar sob os efeitos dela, a pena que vede, ainda que temporariamente, o acesso a cargos públicos, ou por crime falimentar, de prevaricação, peita ou suborno, concussão, peculato, ou contra a economia popular, contra o sistema financeiro nacional, contra as normas de defesa da concorrência, contra as relações de consumo, a fé pública ou a propriedade, (§ 1º do art. 1.011 da Lei 10.406/02, Código Civil Brasileiro).

**Cláusula 28ª** - Os Administradores poderão ser destituídos de suas funções a qualquer tempo, devendo-se para tanto, ser observado o quorum e demais formalidades exigidas pela legislação vigente, especialmente quanto ao registro de tais deliberações perante o Registro Público do Comércio.







http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcfFEXdxvXm9FtYgb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5CvuIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILIAN GHENOI73938459972-RICARDO URBANCI14138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI04562269901-LETTICIA BELATTO BORDIGNON04562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

## **CAPÍTULO VI**

### **DAS DELIBERAÇÕES SOCIAIS E DAS REUNIÕES DOS SÓCIOS:**

**Cláusula 29ª** - As deliberações dos sócios, para os fins previstos em lei, ou sempre que os interesses da sociedade exigirem serão tomadas em reunião, na qual, cada quota do capital social corresponderá a 01 (um) voto.

**§ Único:** Será realizada ao menos 01 (uma) reunião de sócios por ano, até o final do mês de abril, objetivando deliberar sobre as matérias previstas no artigo 1.078 da Lei 10.406/02 (Código Civil Brasileiro).

**Cláusula 30ª** - As reuniões de sócios serão convocadas pelos administradores ou, na ausência destes, pelos sócios nos casos previstos em Lei, com 08 (oito) dias de antecedência, através de carta registrada, fax, e-mail ou por aviso entregue pessoalmente aos sócios, contra recibo.

**§ Único:** Serão dispensadas as formalidades de convocação, quando todos os sócios comparecerem ou se declararem, por escrito, cientes do local, data, hora e ordem do dia.

**Cláusula 31ª** - Os sócios poderão ser representados nas reuniões por outro sócio ou por procurador devidamente constituído em instrumento próprio, com poderes para tanto, devendo dito instrumento, ser levado a registro juntamente com a Ata da Reunião.

**Cláusula 32ª** - O quorum de instalação da Reunião, bem como o quorum para aprovação das deliberações, serão aqueles determinados pela legislação vigente.

**Cláusula 33ª** - Em livro próprio de registro de Atas de reuniões de sócios, será lavrada de forma sumária a Ata dos trabalhos, contendo as ocorrências e deliberações dos sócios, devendo ao final, ser assinada pelos membros da mesa e pelos sócios presentes.

**Cláusula 34ª** - As reuniões tornam-se dispensáveis quando todos os sócios decidirem, por escrito, sobre a matéria que seria objeto delas.

**Cláusula 35ª** - Fica expressamente prevista a possibilidade de exclusão de sócios por justa causa, desde que, observado o quorum e os demais procedimentos exigidos pela legislação vigente à época da exclusão.

**Cláusula 36ª** - As deliberações tomadas em conformidade com o presente contrato e ao amparo da lei vinculam todos os sócios, ainda que ausentes ou dissidentes.

## **CAPÍTULO VII**

### **DA DISSOLUÇÃO E LIQUIDAÇÃO DA SOCIEDADE E DAS DISPOSIÇÕES FINAIS:**

**Cláusula 37ª** - A sociedade será dissolvida nos casos previstos em lei, observando-se sempre, o que a legislação vigente à época dispuser. Na liquidação os haveres da Sociedade serão empregados na liquidação das obrigações sociais e o remanescente, se houver, será rateado entre os sócios proporcionalmente ao número de quotas que cada um possuir integralizadas na sociedade. Ao fim do processo de liquidação, a Sociedade será considerada extinta.





http://assinador.pscs.com.br/assinadorweb/autenticacao?chave1=VcfLExdvXm9FVgpb8Zp63Ag&chave2=Ug8cwsph\_-ckGj5cvuIRA  
ASSINADO DIGITALMENTE POR: 04160700942-LILLIAN GHENO|73938459972-RICARDO URBANCIC|14138700900-ARCIDES DE DAVID  
03012074961-ELIZETE ANGELA GUAREZI|04562269901-LETICIA BELATTO BORDIGNON|04562272961-ISABELA BELATTO BORDIGNON

**Cláusula 38ª** - A sociedade manterá um departamento técnico, quando exigido por lei, com pessoal habilitado e na forma da legislação vigente, inscritos nos órgãos competentes, que se responsabilizará pelo desenvolvimento das atividades e pelos serviços prestados pela empresa.

**Cláusula 39ª** - Fica eleito o Foro da Cidade e Comarca de Chapecó, Estado de Santa Catarina, para as questões oriundas do presente contrato.

Revogam-se as disposições contidas no Instrumento Contratual original e nas alterações posteriores, passando a sociedade a ser regida somente por este Instrumento.

E por estarem justos e contratados, lavram, datam e assinam o presente instrumento em via única, juntamente com 02 (duas) testemunhas instrumentárias abaixo, obrigando-se a cumpri-lo em todos os seus termos.

Chapecó, SC, 05 de junho de 2019.

**RICARDO URBANCIC**

**ELIZETE ANGELA GUAREZI**

**ISABELA BELATTO BORDIGNON**

**LETÍCIA BELATTO BORDIGNON**

**- As testemunhas:**

**LILLIAN GHENO**  
C.I. 4.911.329-1 - SSP/SC

**ARCIDES DE DAVID**  
C.I. 3.408.803-2 - SSP/SC





196526221

## TERMO DE AUTENTICACAO

NOME DA EMPRESA	AGRO LIDER LTDA
PROTOCOLO	196526221 - 05/06/2019
ATO	002 - ALTERACAO
EVENTO	021 - ALTERACAO DE DADOS (EXCETO NOME EMPRESARIAL)

### MATRIZ

NIRE 42203255148  
CNPJ 05.443.140/0001-58  
CERTIFICO O REGISTRO EM 05/06/2019  
SOB N: 20196526221

### REPRESENTANTES QUE ASSINARAM DIGITALMENTE

Cpf: 03012074961 - ELIZETE ANGELA GUAREZI

Cpf: 04562269901 - LETICIA BELATTO BORDIGNON

Cpf: 04562272961 - ISABELA BELATTO BORDIGNON

Cpf: 73938459972 - RICARDO URBANCIC



Junta Comercial do Estado de Santa Catarina

Certifico o Registro em 05/06/2019

Arquivamento 20196526221 Protocolo 196526221 de 05/06/2019 NIRE 42203255148

Nome da empresa AGRO LIDER LTDA

Este documento pode ser verificado em <http://regin.jucesc.sc.gov.br/autenticacaoDocumentos/autenticacao.aspx>

Chancela 150907468361163

Esta cópia foi autenticada digitalmente e assinada em 05/06/2019 por Blasco Borges Barcellos - Secretario-geral;

05/06/2019





**ANEXO IV**  
**DECLARAÇÃO DE QUE NÃO EMPREGA MENOR**

A empresa **Agro Líder Ltda**, inscrita no CNPJ nº 05.443.140/0001-58, por intermédio de seu representante legal Sr. Ricardo Urbancic portador (a) da Carteira de Identidade nº 1.713.339 CPF nº 739.384.599-72, DECLARA, para fins do disposto no inscrito no inciso XXXIII, do Artigo 7, da Constituição Federal, que não emprega menor de dezoito anos em trabalho noturno, perigoso ou insalubre e não emprega menor de dezesseis anos.

Ressalva: ( ) emprega menor, a partir de quatorze anos, na condição de aprendiz.

*(Assinalar com um "X", em caso afirmativo, o campo anterior)*

Chapecó, SC, em 24 de agosto de 2022.

**RICARDO**  
**URBANCIC:73938459972**

Assinado de forma digital por RICARDO URBANCIC:73938459972  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=83310904000140, ou=Secretaria da  
Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e-CPF A1, ou=(EM BRANCO),  
ou=presencial, cn=RICARDO URBANCIC:73938459972  
Dados: 2022.08.24 15:08:50 -03'00'  
Versão do Adobe Acrobat Reader: 2022.002.20191

Ricardo Urbancic  
Diretor Administrativo  
CPF: 739.384.599-72  
RG: 1.713.339





### ANEXO III

#### DECLARAÇÃO DE QUE INEXISTEM FATOS IMPEDITIVOS

AGRO LÍDER LTDA CNPJ nº 05.443.140/0001-58, sediada na Rua Rui Barbosa, 556-E, Centro, Chapecó, SC, declara, sob as penas da lei, que até a presente data inexistem fatos impeditivos para sua habilitação no presente processo licitatório, ciente da obrigatoriedade de declarar ocorrências posteriores.

Chapecó, SC, em 24 de agosto de 2022.

**RICARDO**  
**URBANCIC:73938459972**

Assinado de forma digital por RICARDO URBANCIC:73938459972  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=83310904000140, ou=Secretaria da  
Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e-CPF A1, ou=(EM BRANCO),  
ou=presencial, cn=RICARDO URBANCIC:73938459972  
Dados: 2022.08.24 15:08:25 -03'00'  
Versão do Adobe Acrobat Reader: 2022.002.20191

Ricardo Urbancic  
Diretor Administrativo  
CPF: 739.384.599-72  
RG: 1.713.339





**ANEXO V**  
**DECLARAÇÃO DE INEXISTÊNCIA DE SERVIDOR**

AGRO LÍDER LTDA CNPJ nº 05.443.140/0001-58, sediada na Rua Rui Barbosa, 556-E, Centro, Chapecó, SC, por seu representante legal abaixo assinado, DECLARA que nenhum dos seus dirigentes, gerentes ou acionistas detentores de mais de 5% (cinco) por cento do capital ou controlador, responsáveis técnicos, funcionários ou subcontratados, são servidores da Prefeitura de Nova Trento, sob qualquer regime de contratação.

Chapecó, SC, em 24 de agosto de 2022.

**RICARDO**  
**URBANCIC:73938459972**

Ricardo Urbancic  
Diretor Administrativo  
CPF: 739.384.599-72  
RG: 1.713.339

Assinado de forma digital por RICARDO URBANCIC:73938459972  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=83310904000140, ou=Secretaria da  
Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e-CPF A1, ou=(EM  
BRANCO), ou=presencial, cn=RICARDO URBANCIC:73938459972  
Dados: 2022.08.24 15:09:06 -03'00'  
Versão do Adobe Acrobat Reader: 2022.002.20191





## Detalhe do Produto: VECTOBAC 12 AS

Nome da Empresa	SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRESENTACOES LTDA		
CNPJ	42.462.952/0001-77	Autorização	3.02.586-3
Nome Comercial	VECTOBAC 12 AS		
Classe Terapêutica	INSETICIDA PARA EMPRESAS ESPECIALIZADAS		
Registro	325860015		
Processo	25351.814451/2008-38		
Vencimento do registro	12/01/2029		
Situação do Produto	ATIVO		

## Rótulo

[Visualizar 1º rótulo](#)

Apresentação	ATIVA	Forma Farmacêutica	Nº Apres.	Data de Publicação
GALAO PLASTICO + CAIXA DE PAPELAO		LIQUIDO	1	12/01/2009
Validade	2 anos	Registro	3258600150012	
Princípio Ativo				
Embalagem		<ul style="list-style-type: none"><li>Primária - GALAO PLASTICO</li><li>Secundária - CAIXA DE PAPELAO</li></ul>		
Local de Fabricação		<div>Fabricantes Nacionais</div> <div>[sem dados cadastrados]</div> <div>Fabricantes Internacionais</div> <ul style="list-style-type: none"><li>VALENT BIOSCIENCE CORPORATION - ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA</li></ul>		
Via de Administração		[sem dados cadastrados]		
IFA único		Não		
Conservação		INDICADO NO TEXTO DE ROTULAGEM		

<b>Restrição de prescrição</b>	<i>[sem dados cadastrados]</i>
<b>Restrição de uso</b>	<i>[sem dados cadastrados]</i>
<b>Destinação</b>	<i>[sem dados cadastrados]</i>
<b>Restrito a hospitais</b>	<b>Não Informado</b>
<b>Tarja</b>	<i>[sem dados cadastrados]</i>
<b>Medicamento de referência</b>	<b>Não</b>
<b>Apresentação fracionada</b>	<b>Não</b>

Voltar



**ESTADO DE SANTA CATARINA**  
**PREFEITURA MUNICIPAL DE**  
**GUATAMBU**

**Secretaria Municipal de Agricultura e Meio Ambiente.**

**ATESTADO DE QUALIFICAÇÃO TÉCNICA**

**PREFEITURA MUNICIPAL DE GUATAMBU**, pessoa jurídica de direito público, com sede e foro jurídico na Cidade de Guatambu (SC), sito à Rua Manoel Rolim de Moura, 825 - Centro, CNPJ nº. 95.990.206/0001-12, **ATESTA** que: a empresa **AGRO LÍDER LTDA**, CNPJ nº. 05.443.140/0001-58, forneceu Larvicida Biológico - Vectobac, em bom estado de conservação e armazenamento, com os prazos de validades dos produtos vigentes. Operacionaliza as entregas com inteira segurança e eficiência, respeitando os prazos estabelecidos, não havendo nenhuma situação que a desabone.

Chapecó (SC), 24 de agosto de 2022.

*P/ Michel Schneider*

---

José Antunes Maciel  
Secretário da Agricultura e Meio Ambiente



- PRECAUÇÕES GERAIS**
- CONSERVE FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS E DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS.
  - Durante a aplicação não devem permanecer no local outras pessoas ou animais.
  - Não aplique sobre alimentos e utensílios de cozinha, plantas e aquários.
  - Manter o produto na embalagem original.
  - Não reutilizar as embalagens vazias.
  - Não fumar ou comer durante a aplicação.
  - Em caso de Intoxicação, procurar o Centro de Intoxicações ou Serviço de Saúde, levando a embalagem ou o rótulo do produto.
  - Em caso de contato direto com este produto, lave a parte atingida com água fria corrente e sabão.
  - Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com água corrente em abundância.
  - Se inalado em excesso, remover a pessoa para local ventilado.
  - Usar roupas protetoras adequadas, luvas, protetor ocular e respiratório.

**MODO DE ELIMINAÇÃO E DESATIVAÇÃO DO PRODUTO EM CASO DE DERRAME**

- Para descarte, neutralizar com cal virgem hidratado ou carbonato de sódio a 10-20%.
- Advertir aos usuários sobre as medidas de segurança e precauções a ter em conta para evitar acidentes.

**INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR REFERENTE À DESATIVAÇÃO E DESCARTE DA EMBALAGEM VAZIA**

- As embalagens deverão ser furadas de maneira a torná-las inadequadas para usos.
- Consulte o Órgão Estadual do Meio Ambiente sobre as recomendações específicas para a destinação adequada de resíduos e embalagens.
- As embalagens vazias devem ser devolvidas aos estabelecimentos onde foram adquiridas ou em postos/centrais de recebimento conveniados.

**CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

- Manter a embalagem sempre fechada.
- Armazenar em ambiente fresco, seco.

**MEDIDAS DE SEGURANÇA E PRECAUÇÕES PARA EVITAR ACIDENTES**

- A construção deve ser de alvenaria ou de material não combustível.
- O local deve ser exclusivo para produtos tóxicos, devendo ser isolado de alimentos, bebidas ou outros materiais.
- Coloque placa de advertência com os dizeres: CUIDADO VENENOSO.
- Tranque o local, evitando o acesso de pessoas não autorizadas, principalmente crianças.
- Deve haver sempre embalagens adequadas disponíveis, para envolver embalagens rompidas ou para o recolhimento de produtos vazados.

**INDICAÇÃO PARA USO MÉDICO:**

Grupo químico: inseticida biológico  
Nome comum: *Bacillus thuringiensis*  
Antídoto: Não tem.

Telefone da Empresa: 0800-141-149

Disk Intoxicações (RENACIAT – ANVISA/MS): 0800-722-6001

Serviço de Atendimento ao Consumidor: (11) 3174-0355

Indústria americana

Responsável Técnico: Amauri Doreto da Rocha  
CREA-SP: 0601182896



Importa e Distribuído por:  
SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRESENTAÇÕES LTDA.  
Av. Paulista nº 854 - 11º andar - Bairro: Bela Vista  
CEP: 01310-913 - São Paulo/SP - CNPJ: 42.462.952/0001-77  
Fone: (11) 3174-0355 - Fax: (11) 3174-0377  
Autorização de funcionamento nº 3.02.586-3



*Bacillus thuringiensis*, sorotipo  
*israelensis*, Cepa AM65-52

**"VENDA RESTRITA A  
EMPRESA ESPECIALIZADA"**

Inseticida Biológico

**VectoBac 12AS é eficaz contra:**  
larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

**CONTEÚDO: 10 litros**

© Marca Registrada de Valent BioSciences Corporation, Estados Unidos

**ATENÇÃO – CUIDADO**

**"ANTES DE USAR LEIA COM  
ATENÇÃO AS INSTRUÇÕES  
DO RÓTULO"**

**INDICAÇÃO DE USO:**

**VectoBac 12AS** é um inseticida altamente seletivo para uso contra larvas de *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Simulium pertinax* (borrachudo)

MODO DE APLICAÇÃO	Dose Recomendada Variação
<b><i>Aedes aegypti</i>:</b>	
Águas com pouca presença de larvas	0,5 a 1 litro/ha
Águas com alta presença de larvas	1 a 2 litros/ha
<b><i>Culex quinquefasciatus</i>:</b>	
Águas limpas e/ou com pouca presença de larvas	0,5 a 1 litro/ha
Águas poluídas e/ou com alta presença de larvas	1 a 2 litros/ha
<b><i>Simulium pertinax</i> (borrachudo):</b>	0,5 - 25 ppm

**Aplicação Aérea ou Terrestre para Mosquitos:**

**VectoBac 12AS** pode ser aplicado por equipamento convencional terrestre ou em aplicação aérea em quantidade suficiente para proporcionar cobertura uniforme da área alvo. Em aplicação aérea **VectoBac 12AS** pode ser aplicado tanto não diluído como diluído em água.

Não prepare calda de **VectoBac 12AS** mais do que a necessária para a aplicação desejada.

Em aplicação aérea visando mosquitos, **VectoBac 12AS** pode ser aplicado tanto não-diluído como diluído em água. Em aplicações não-diluídas, aplique 0,50 a 2, L/ha de **VectoBac 12AS**. Mantenha a agitação mesmo abastecendo ou pulverizando. Para todas as aplicações aéreas o tamanho das gotas entre 50 - 100 micras (VMD) produzirão o melhor resultado.

Para aplicações aéreas visando **borrachudos**, **VectoBac 12AS** pode ser aplicado não diluído via aeronave pá fixa (tipo Ipanema) ou helicóptero equipado com barra convencional com bicos hidráulicos ou bicos rotativos (tipo micronair) a dose de aplicação deve ser determinada através do canal de descarga e da quantidade necessária de **VectoBac 12AS** para manter a concentração de 0,5 a 25 ppm no canal de água a ser tratado.

Não prepare calda de **VectoBac 12AS** mais do que a necessária para a aplicação desejada.

**COMPOSIÇÃO:**

**Ingrediente ativo:**

*Bacillus thuringiensis*, sorotipo *israelensis*,  
Cepa AM65-52 .....1,2% p/p  
(Potência Aproximada 1200 Bt UTI/mg)

**Excipientes:**

Conservante; Cossolvente; Tensoativo;  
Espessante; Emulsificante; Anti-espumante .....98,8%

**TIPO DE FORMULAÇÃO:** Suspensão Aquosa  
**REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº**

**Nº DE LOTE:**

**DATA DE  
FABRICAÇÃO:**

**PRAZO DE VALIDADE:** USAR EM 24 MESES, a partir da data de fabricação.

List Nº 00000-00-00

00-0000/00

0713

APROVADO  
20/11/13  
GGSAN/ANVISA-MS



# VectoBac® 12AS

LARVICIDA BIOLÓGICO

SUSPENSÃO AQUOSA



*Simulium pertinax*

**Eficaz no controle biológico  
de larvas de mosquitos  
e borrachudos**



Produto utilizado há 30 anos  
em diversas partes do mundo;



Formulação específica para programas  
de controle de borrachudos;



Resultados superiores em controle  
de larvas de borrachudos;



Segurança e versatilidade nas mais  
diferentes situações de aplicação.



**SUMITOMO CHEMICAL**  
Latin America



# VectoBac® 12AS

LARVICIDA BIOLÓGICO

SUSPENSÃO AQUOSA

É altamente seguro ao homem e ao meio ambiente

## Características

### VectoBac® 12AS, *Bacillus thuringiensis israelensis*

1.200 UTI (Unidades Tóxicas Internacionais)/mg

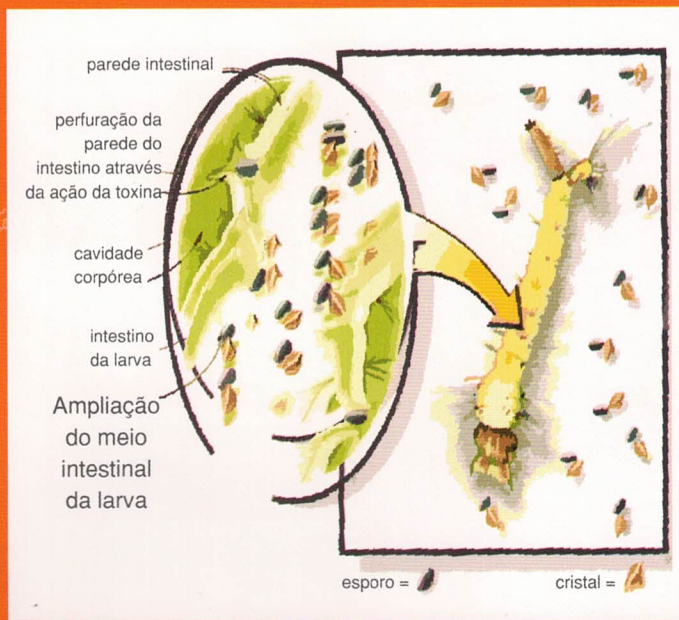
Cepa AM65-52 | Solução aquosa

Registro ANVISA: 3.2586.0010 | Embalagem: 10 litros

As características técnicas e a formulação específica faz com que seja altamente eficiente dentro de programas no controle de borrachudos. As características únicas de dispersão na água (rios/riachos locais de reprodução e fixação das larvas), tamanho de partículas, carregamento e formação de espuma fazem com que tenha uma alta eficiência na mortalidade de larvas de borrachudos, minimizando perdas e falhas na aplicação. **VectoBac® 12AS** é usado há mais de 15 anos dentro de programas de controle de borrachudos em todo o Brasil.

## Modo de ação

O ingrediente ativo de **VectoBac® 12AS** é composto de cristais protéicos e esporos, que aplicados na água são filtrados e ingeridos pelas larvas. Os cristais interagem com a parede intestinal das larvas, rompendo-as rapidamente, cessando sua atividade, esperando-se a morte dos insetos em 24 horas, após a aplicação do produto.



## Modo de Aplicação

**VectoBac® 12AS** pode ser aplicado com equipamentos convencionais terrestres ou em aplicação aérea em quantidade suficiente para proporcionar cobertura uniforme da área alvo. Não preparar calda de **VectoBac® 12AS** mais do que necessária para a aplicação desejada. Reaplicações do produto são necessárias quando começarem a aparecer larvas de 4º estágio e pupas nas amostragens.

## Armazenamento

**VectoBac® 12AS**, em todas as formulações disponíveis, se armazenado em local seco e arejado, dentro de sua embalagem original e à temperatura ambiente, mantém suas características por 2 anos, conforme registro junto à ANVISA. Não é necessário armazenar em câmaras frias.

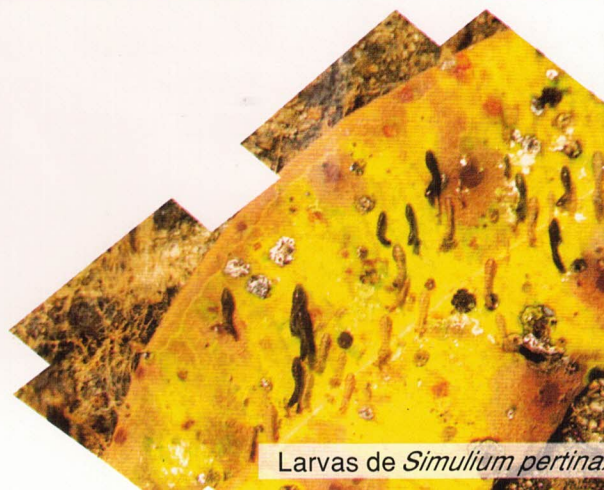
## Recomendações de uso

<i>Aedes aegypti</i>	Águas com pouca presença de larvas: 0,5 a 1 L/ha Águas com alta presença de larvas: 1 a 2 L/ha
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Águas limpas e/ou com pouca presença de larvas: 0,5 a 1 L/ha Águas poluídas e/ou com alta presença de larvas: 1 a 2 L/ha
<i>Simulium pertinax</i> (borrachudo)	0,5 a 25 ppm



**SUMITOMO CHEMICAL**  
Latin America

Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda.  
Av. Paulista, 854 - 11º andar - conj. 112 - Bela Vista  
CEP: 01310-913 - São Paulo - SP - Tel.: 11 3174-0355  
www.sumitomo-chem.co.jp



Larvas de *Simulium pertinax*

**CERTIDÃO FALÊNCIA, CONCORDATA E RECUPERAÇÃO JUDICIAL Nº: 1652212**

À vista dos registros constantes no **sistema eproc do Primeiro Grau de Jurisdição** do Poder Judiciário de Santa Catarina, utilizando como parâmetro os dados informados pelo(a) requerente, NADA CONSTA distribuído em relação a:

**NOME: AGRO LIDER LTDA**

Raiz do CNPJ: 05.443.140

Certidão emitida às 08:05 de 19/08/2022.

**OBSERVAÇÕES**

- 1) Esta certidão tem validade de 60 (sessenta) dias a contar da data da emissão.
- 2) Esta certidão abrange todo o primeiro grau de jurisdição do Poder Judiciário Catarinense.
- 3) Certidão expedida em consonância com a Lei nº 11.101/2005, com a inclusão das classes extrajudiciais: 128 - Recuperação Extrajudicial e 20331 - Homologação de Recuperação Extrajudicial;
- 4) Foram considerados os normativos do CNJ;
- 5) Os dados informados são de responsabilidade do solicitante e devem ser conferidos pelo interessado e/ou destinatário;
- 6) Esta certidão abrange os processos dos Juizados Especiais e das Turmas Recursais;

**ATENÇÃO: A presente certidão é válida desde que apresentada juntamente com a respectiva certidão de registros cadastrados no sistema de automação da justiça - SAJ5, disponível através do endereço <https://esaj.tjsc.jus.br/sco/abrirCadastro.do>**





19/08/2022

0012541173

**PODER JUDICIÁRIO**  
**TRIBUNAL DE JUSTIÇA DO ESTADO DE SANTA CATARINA**  
Comarca de Chapecó

**CERTIDÃO**  
**FALÊNCIA, CONCORDATA E RECUPERAÇÃO JUDICIAL**

**CERTIDÃO Nº: 9844819****FOLHA: 1/1**

À vista dos registros cíveis constantes nos sistemas de informática do Poder Judiciário do Estado de Santa Catarina da Comarca de Chapecó, com distribuição anterior à data de 18/08/2022, verificou-se NADA CONSTAR em nome de:

**AGRO LÍDER LTDA, portador do CNPJ: 05.443.140/0001-58. \*\*\*\*\***

**OBSERVAÇÕES:**

- a) para a emissão desta certidão, foram considerados os normativos do Conselho Nacional de Justiça;
- b) os dados informados são de responsabilidade do solicitante e devem ser conferidos pelo interessado e/ou destinatário;
- c) a autenticidade deste documento poderá ser confirmada no endereço eletrônico <http://www.tjsc.jus.br/portal>, opção Certidões/Conferência de Certidão;
- d) para a Comarca da Capital, a pesquisa abrange os feitos em andamento do Foro Central, Eduardo Luz, Norte da Ilha, Fórum Bancário e Distrital do Continente;
- e) certidão é expedida em consonância com a Lei nº 11.101/2005, com a inclusão das classes extrajudiciais: 128 - Recuperação Extrajudicial e 20331 - Homologação de Recuperação Extrajudicial.

**ATENÇÃO:** A presente certidão é válida desde que apresentada juntamente com a respectiva certidão de registros cadastrados no sistema eproc, disponível através do endereço <https://certeproc1g.tjsc.jus.br>

Certifico finalmente que esta certidão é isenta de custas.

Esta certidão foi emitida pela internet e sua validade é de 60 dias.

Chapecó, sexta-feira, 19 de agosto de 2022.

**PEDIDO Nº:****0012541173**





# REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

## CADASTRO NACIONAL DA PESSOA JURÍDICA

NÚMERO DE INSCRIÇÃO <b>05.443.140/0001-58</b> MATRIZ	COMPROVANTE DE INSCRIÇÃO E DE SITUAÇÃO CADASTRAL	DATA DE ABERTURA <b>23/12/2002</b>
--	---	---------------------------------------

NOME EMPRESARIAL <b>AGRO LIDER LTDA</b>
--

TÍTULO DO ESTABELECIMENTO (NOME DE FANTASIA) <b>AGRO LIDER LTDA</b>	PORTE <b>DEMAIS</b>
--	------------------------

CÓDIGO E DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE ECONÔMICA PRINCIPAL <b>46.83-4-00 - Comércio atacadista de defensivos agrícolas, adubos, fertilizantes e corretivos do solo</b>
--

CÓDIGO E DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES ECONÔMICAS SECUNDÁRIAS <b>33.29-5-99 - Instalação de outros equipamentos não especificados anteriormente</b> <b>46.19-2-00 - Representantes comerciais e agentes do comércio de mercadorias em geral não especializado</b> <b>46.23-1-06 - Comércio atacadista de sementes, flores, plantas e gramas</b> <b>46.61-3-00 - Comércio atacadista de máquinas, aparelhos e equipamentos para uso agropecuário; partes e peças</b> <b>46.72-9-00 - Comércio atacadista de ferragens e ferramentas</b> <b>46.79-6-99 - Comércio atacadista de materiais de construção em geral</b> <b>47.44-0-01 - Comércio varejista de ferragens e ferramentas</b> <b>47.44-0-99 - Comércio varejista de materiais de construção em geral</b> <b>47.89-0-02 - Comércio varejista de plantas e flores naturais</b> <b>47.89-0-04 - Comércio varejista de animais vivos e de artigos e alimentos para animais de estimação</b> <b>47.89-0-05 - Comércio varejista de produtos saneantes domissanitários</b> <b>71.11-1-00 - Serviços de arquitetura</b>
--

CÓDIGO E DESCRIÇÃO DA NATUREZA JURÍDICA <b>206-2 - Sociedade Empresária Limitada</b>
---

LOGRADOURO <b>R RUI BARBOSA</b>	NÚMERO <b>556</b>	COMPLEMENTO <b>E</b>
------------------------------------	----------------------	-------------------------

CEP <b>89.801-040</b>	BAIRRO/DISTRITO <b>CENTRO</b>	MUNICÍPIO <b>CHAPECO</b>	UF <b>SC</b>
--------------------------	----------------------------------	-----------------------------	-----------------

ENDEREÇO ELETRÔNICO <b>AGROLIDER@AGROLIDER.COM.BR</b>	TELEFONE <b>(49) 3321-4900</b>
--	-----------------------------------

ENTE FEDERATIVO RESPONSÁVEL (EFR) *****
--

SITUAÇÃO CADASTRAL <b>ATIVA</b>	DATA DA SITUAÇÃO CADASTRAL <b>23/12/2002</b>
------------------------------------	---

MOTIVO DE SITUAÇÃO CADASTRAL
------------------------------

SITUAÇÃO ESPECIAL *****	DATA DA SITUAÇÃO ESPECIAL *****
----------------------------	------------------------------------

Aprovado pela Instrução Normativa RFB nº 1.863, de 27 de dezembro de 2018.

Emitido no dia **11/08/2022** às **15:16:34** (data e hora de Brasília).

Página: 1/1



**MINISTÉRIO DA FAZENDA**  
**Secretaria da Receita Federal do Brasil**  
**Procuradoria-Geral da Fazenda Nacional**

**CERTIDÃO POSITIVA COM EFEITOS DE NEGATIVA DE DÉBITOS RELATIVOS AOS TRIBUTOS  
FEDERAIS E À DÍVIDA ATIVA DA UNIÃO**

**Nome: AGRO LIDER LTDA**  
**CNPJ: 05.443.140/0001-58**

Ressalvado o direito de a Fazenda Nacional cobrar e inscrever quaisquer dívidas de responsabilidade do sujeito passivo acima identificado que vierem a ser apuradas, é certificado que:

1. constam débitos administrados pela Secretaria da Receita Federal do Brasil (RFB) com exigibilidade suspensa nos termos do art. 151 da Lei nº 5.172, de 25 de outubro de 1966 - Código Tributário Nacional (CTN), ou objeto de decisão judicial que determina sua desconsideração para fins de certificação da regularidade fiscal, ou ainda não vencidos; e
2. não constam inscrições em Dívida Ativa da União (DAU) na Procuradoria-Geral da Fazenda Nacional (PGFN).

Conforme disposto nos arts. 205 e 206 do CTN, este documento tem os mesmos efeitos da certidão negativa.

Esta certidão é válida para o estabelecimento matriz e suas filiais e, no caso de ente federativo, para todos os órgãos e fundos públicos da administração direta a ele vinculados. Refere-se à situação do sujeito passivo no âmbito da RFB e da PGFN e abrange inclusive as contribuições sociais previstas nas alíneas 'a' a 'd' do parágrafo único do art. 11 da Lei nº 8.212, de 24 de julho de 1991.

A aceitação desta certidão está condicionada à verificação de sua autenticidade na Internet, nos endereços <<http://rfb.gov.br>> ou <<http://www.pgfn.gov.br>>.

Certidão emitida gratuitamente com base na Portaria Conjunta RFB/PGFN nº 1.751, de 2/10/2014.

Emitida às 10:29:35 do dia 11/08/2022 <hora e data de Brasília>.

Válida até 07/02/2023.

Código de controle da certidão: **52F3.29A6.AD3B.01CA**

Qualquer rasura ou emenda invalidará este documento.

Voltar

Imprimir



## **Certificado de Regularidade do FGTS - CRF**

**Inscrição:** 05.443.140/0001-58

**Razão Social:** AGRO LIDER LTDA

**Endereço:** RUA RUI BARBOSA 556 E / CENTRO / CHAPECO / SC / 89801-040

A Caixa Econômica Federal, no uso da atribuição que lhe confere o Art. 7, da Lei 8.036, de 11 de maio de 1990, certifica que, nesta data, a empresa acima identificada encontra-se em situação regular perante o Fundo de Garantia do Tempo de Serviço - FGTS.

O presente Certificado não servirá de prova contra cobrança de quaisquer débitos referentes a contribuições e/ou encargos devidos, decorrentes das obrigações com o FGTS.

**Validade:** 17/08/2022 a 15/09/2022

**Certificação Número:** 2022081701255607892808

Informação obtida em 19/08/2022 08:12:25

A utilização deste Certificado para os fins previstos em Lei esta condicionada a verificação de autenticidade no site da Caixa:  
**[www.caixa.gov.br](http://www.caixa.gov.br)**



**ESTADO DE SANTA CATARINA  
SECRETARIA DE ESTADO DA FAZENDA**

**CERTIDÃO NEGATIVA DE DÉBITOS ESTADUAIS**

Nome (razão social): **AGRO LIDER LTDA**  
CNPJ/CPF: **05.443.140/0001-58**

**Ressalvando o direito da Fazenda Estadual de inscrever e cobrar as dívidas que vierem a ser apuradas, é certificado que não constam, na presente data, pendências em nome do contribuinte acima identificado, relativas aos tributos, dívida ativa e demais débitos administrados pela Secretaria de Estado da Fazenda.**

Dispositivo Legal:	Lei nº 3938/66, Art. 154
Número da certidão:	220140111156965
Data de emissão:	07/07/2022 06:36:31
Validade (Lei nº 3938/66, Art. 158, modificado pelo artigo 18 da Lei nº 15.510/11.):	05/09/2022

A autenticidade desta certidão deverá ser confirmada na página da Secretaria de Estado da Fazenda na Internet, no endereço: <http://www.sef.sc.gov.br>

# MUNICÍPIO DE CHAPECÓ



## CERTIDÃO NEGATIVA DE TRIBUTOS MUNICIPAIS

NÚMERO CERTIDÃO:

104775 / 2022

DATA DA EMISSÃO:

08/08/2022

DATA DA VALIDADE:

06/11/2022

CPF / CNPJ:

05.443.140/0001-58

NOME / RAZÃO SOCIAL:

AGRO LIDER LTDA

INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 27542

ATIVIDADE CNAE:

4683400 - Comércio atacadista de defensivos agrícolas, adubos, fertilizantes e corretivos do solo

3329599 - Instalação de outros equipamentos não especificados anteriormente

4619200 - Representantes comerciais e agentes do comércio de mercadorias em geral não especializado

4623106 - Comércio atacadista de sementes, flores, plantas e gramas

4661300 - Comércio atacadista de máquinas, aparelhos e equipamentos para uso agropecuário, partes e peças

4672900 - Comércio atacadista de ferragens e ferramentas

4679699 - Comércio atacadista de materiais de construção em geral

4744099 - Comércio varejista de materiais de construção em geral

4789002 - Comércio varejista de plantas e flores naturais

4789004 - Comércio varejista de animais vivos e de artigos e alimentos para animais de estimação

7111100 - Serviços de arquitetura

4744001 - Comércio varejista de ferragens e ferramentas

4789005 - Comércio varejista de produtos saneantes domissanitários

ENDEREÇO / LOCALIZAÇÃO:

Logradouro: RUI BARBOSA, 556 E

Complemento:

Bairro: CENTRO

Apto:

Bloco:

CEP: 89801-040

AVISO:

Não constam débitos vencidos em aberto, até o momento.



**DESCRIÇÃO:**

Ressalvado o direito de a Fazenda Municipal cobrar e inscrever quaisquer dívidas de responsabilidade do sujeito passivo acima identificado que vierem a ser apuradas, é certificado que não constam pendências com base nos dados acima informado, relativas a tributos de competência do Município de Chapecó

CÓDIGO DE CONTROLE DA CERTIDÃO

**C22104775N9161D12**

A autenticidade desta poderá ser confirmada na página da Município de Chapecó  
**[www.chapeco.sc.gov.br](http://www.chapeco.sc.gov.br)**

Município de Chapecó

Av. Getúlio Dorneles Vargas, 957S



PODER JUDICIÁRIO  
JUSTIÇA DO TRABALHO

## **CERTIDÃO NEGATIVA DE DÉBITOS TRABALHISTAS**

Nome: AGRO LIDER LTDA (MATRIZ E FILIAIS)

CNPJ: 05.443.140/0001-58

Certidão nº: 23838172/2022

Expedição: 27/07/2022, às 15:15:35

Validade: 23/01/2023 - 180 (cento e oitenta) dias, contados da data de sua expedição.

Certifica-se que **AGRO LIDER LTDA (MATRIZ E FILIAIS)**, inscrito(a) no CNPJ sob o nº **05.443.140/0001-58**, **NÃO CONSTA** como inadimplente no Banco Nacional de Devedores Trabalhistas.

Certidão emitida com base nos arts. 642-A e 883-A da Consolidação das Leis do Trabalho, acrescentados pelas Leis ns.º 12.440/2011 e 13.467/2017, e no Ato 01/2022 da CGJT, de 21 de janeiro de 2022. Os dados constantes desta Certidão são de responsabilidade dos Tribunais do Trabalho.

No caso de pessoa jurídica, a Certidão atesta a empresa em relação a todos os seus estabelecimentos, agências ou filiais.

A aceitação desta certidão condiciona-se à verificação de sua autenticidade no portal do Tribunal Superior do Trabalho na Internet (<http://www.tst.jus.br>).

Certidão emitida gratuitamente.

### **INFORMAÇÃO IMPORTANTE**

Do Banco Nacional de Devedores Trabalhistas constam os dados necessários à identificação das pessoas naturais e jurídicas inadimplentes perante a Justiça do Trabalho quanto às obrigações estabelecidas em sentença condenatória transitada em julgado ou em acordos judiciais trabalhistas, inclusive no concernente aos recolhimentos previdenciários, a honorários, a custas, a emolumentos ou a recolhimentos determinados em lei; ou decorrentes de execução de acordos firmados perante o Ministério Público do Trabalho, Comissão de Conciliação Prévia ou demais títulos que, por disposição legal, contiver força executiva.



## ANEXO VII

### DECLARAÇÃO DE QUE ATENDE OS REQUISITOS HABILITATÓRIOS

AGRO LÍDER LTDA CNPJ nº 05.443.140/0001-58, sediada na Rua Rui Barbosa, 556-E, Centro, Chapecó, SC, declara, sob as penas da lei, que atende plenamente os requisitos de habilitação constantes do edital de Pregão nº 055/2022, da Prefeitura Municipal de Nova Trento.

Chapecó, SC, em 24 de agosto de 2022.

**RICARDO**

**URBANCIC:73938459972**

Assinado de forma digital por RICARDO  
URBANCIC:73938459972  
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=83310904000140, ou=Secretaria da  
Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e CPF A1, ou=(EM  
BRANCO), ou=presencial, cn=RICARDO URBANCIC:73938459972  
Dados: 2022.08.24 15:09:30 -03'00'  
Versão do Adobe Acrobat Reader: 2022.002.20191

Ricardo Urbancic  
Diretor Administrativo  
CPF: 739.384.599-72  
RG: 1.713.339





Doc. No. I-4153

Eu, abaixo assinado, Tradutor Público e Intérprete Comercial, com fé pública e validade em todo o Território Nacional, nomeado pela Junta Comercial do Estado do Paraná - JUCEPAR e nela matriculado sob o Nº 12/200-T, CERTIFICO e DOU FÉ que me foi apresentado um documento em língua inglesa a fim de ser por mim traduzido para o português, o que cumpro, em razão do meu ofício, como segue:

## **ESPECIFICAÇÕES E AVALIAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA**

***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52**

### **ÍNDICE**

	Página
ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE	3
INTRODUÇÃO	4
<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
ESPECIFICAÇÕES PARA <i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52	
<i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52	
INFORMAÇÕES	6
<i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52 GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA (OUTUBRO DE 2012)	7
<i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52 GRÂNULOS (OUTUBRO DE 2012)	20
<b>SEGUNDA PARTE</b>	
AVALIAÇÕES PARA <i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52	
RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FAO/OMS 2011 SOBRE <i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52	33
ANEXO 1: REFERÊNCIAS	35
RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FAO/OMS 2006 SOBRE <i>Bacillus thuringiensis subespécie israelensis</i> cepa AM65-52	36
INFORMAÇÕES DE APOIO	40
ANEXO 1: RESUMO DE RISCOS FORNECIDO PELO PROPONENTE	46
ANEXO 2: REFERÊNCIAS	52
<b>ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE<sup>1</sup></b>	

As especificações da OMS são desenvolvidas com o objetivo básico de promover, na medida do possível, a fabricação, distribuição e utilização de pesticidas que cumpram com exigências básicas de qualidade.

A conformidade com as especificações não constitui endosso ou garantia da adequação de um pesticida em particular a uma finalidade específica, incluindo sua adequação para o controle de uma determinada praga, ou sua adequação para o uso em determinada área. Devido à complexidade dos problemas envolvidos, a adequação de pesticidas para





uma finalidade específica e o conteúdo das instruções do rótulo devem ser decididos a nível nacional ou provincial.

Além disso, pesticidas que são fabricados para cumprir com essas especificações não estão isentos de nenhum regulamento de segurança ou disposição administrativa ou legal aplicável a sua fabricação, venda, transporte, armazenamento, manuseio, preparação e/ou utilização.

A OMS renuncia toda e qualquer responsabilidade por qualquer lesão, morte, perda, dano ou outro prejuízo de qualquer tipo que possa surgir como resultado de, ou em conexão com, a fabricação, a venda, o transporte, o armazenamento, o manuseio, a preparação e/ou a utilização de pesticidas que foram considerados, ou declarados, ser fabricados para cumprir com tais especificações.

Além disso, a OMS gostaria de alertar os usuários sobre o fato de que o armazenamento, o manuseio, a preparação e/ou a utilização inadequados dos pesticidas pode resultar na redução ou perda completa da segurança e/ou eficácia.

A OMS não é responsável, e não aceita qualquer responsabilidade, pelo teste de pesticidas para comprovar a conformidade com as especificações, nem por qualquer método recomendado e/ou uso para teste de conformidade. Como resultado, a OMS não garante nem declara, de nenhuma forma, a conformidade efetiva de nenhum pesticida considerado estar em conformidade com uma especificação da OMS.

<sup>1</sup> A presente isenção de responsabilidade se aplica a todas as especificações publicadas pela OMS.

## INTRODUÇÃO

A OMS estabelece e publica especificações\* para materiais técnicos e formulações relacionadas a pesticidas utilizados na saúde pública com o objetivo de que tais especificações possam ser usadas para proporcionar um ponto de referência internacional pelo qual os produtos possam ser julgados tanto para finalidades regulatórias quanto para operações comerciais.

Desde 2002, o desenvolvimento das especificações da OMS segue o **Novo Procedimento**, descrito no Manual para Desenvolvimento e Uso da FAO e as Especificações para Pesticidas da OMS. Esse **Novo Procedimento** segue um processo de avaliação transparente e formal. Ele descreve o pacote de dados mínimo, o procedimento e a avaliação aplicados pela OMS e pelos especialistas da “Reunião Conjunta FAO/OMS sobre Especificações de Pesticidas (JMPS)”.

As especificações da OMS atualmente se aplicam somente a produtos para os quais os materiais técnicos foram avaliados. Consequentemente, a partir do ano de 2002, a publicação das especificações da OMS sob o **Novo Procedimento** mudou. Cada especificação agora consiste de duas partes, ou seja, as especificações e o(s) relatório(s) de avaliação:

**Primeira Parte:** A Especificação sobre os materiais técnicos e as formulações relacionadas do pesticida de acordo com os capítulos 4 a 9 do manual supramencionado.

**Segunda Parte:** O(s) Relatório(s) de Avaliação do pesticida, que refletem a avaliação do pacote de dados realizada pela OMS e pela JMPS. Os dados são fornecidos pelo(s) fabricante(s) de acordo com as exigências do capítulo 3 do manual supramencionado, e são apoiados por outras fontes de informação. O Relatório de Avaliação inclui o nome do(s) fabricante(s) cujos materiais técnicos foram avaliados. Os relatórios de avaliação sobre as especificações desenvolvidas após o conjunto original de especificações são adicionados em ordem cronológica a esse relatório.

As especificações da OMS sob o **Novo Procedimento** não se aplicam necessariamente a produtos nominalmente semelhantes de outro(s) fabricante(s), nem àqueles cujo





ingrediente ativo é produzido por outras vias de fabricação. A OMS tem a possibilidade de estender o escopo das especificações a produtos semelhantes, mas somente quando a JMPS esteja convencida de que os produtos adicionais são equivalentes àqueles que formaram a base da especificação de referência.

**As especificações indicam a data (mês e ano) de publicação da versão atual. As datas de publicação das versões anteriores, caso haja, estão identificadas em nota de rodapé. As avaliações indicam a data (ano) da reunião na qual as recomendações foram feitas pela JMPS.**

\* Nota de rodapé: As publicações estão disponíveis na internet em (<http://www.who.int/whopes/quality/en/>).

## PRIMEIRA PARTE ESPECIFICAÇÕES

***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52**

*Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52

PÁGINA

INFORMAÇÕES

6

*Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52 GRÂNULOS  
DISPERSÍVEIS EM ÁGUA (OUTUBRO DE 2012)

7

*Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52  
GRÂNULOS (OUTUBRO DE 2012)

20

ESPECIFICAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA

***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52**

INFORMAÇÕES

*Nome científico*

*Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52

*Abreviações*

Bt: todas as subespécies de *Bacillus thuringiensis*.

Bti: todas as cepas de *acillus thuringiensis subespécie israelensis* (sorotipo dos flagelos: H-14).

Bti AM65-52: a cepa à qual o código 770 da CIPAC se aplica.

*Número CIPAC*

770

*Testes de identidade*

(i) Exame microscópico: bacilos gram-positivos; presença de esporos e inclusões cristalinas parasporais.

(ii) Análise SDS-PAGE do perfil de peso molecular dos cristais de proteína endotoxina.

(iii) Análise de agarose-GE do perfil de plasmídeo.

Uma metodologia alternativa de identidade específica de cepa pode ser utilizada:

*Genomotipagem.*

Cepas bacterianas podem ser caracterizadas por comparação de seu DNA genômico a uma série de fragmentos de DNA genômico originados de uma mistura de diferentes cepas da mesma espécie. Informações básicas sobre o potencial da tecnologia e sua resolução são fornecidas nas referências a seguir (Salama et al. 2000, Leavis et al. 2007, Vlamincx et al. 2007). Esta tecnologia de hibridação atual tem permitido o ensaio de milhares de sequências de ácidos nucleicos em uma única reação em um substrato



sólido. Um sistema tão massivamente paralelo oferece a oportunidade de aplicações de diagnóstico para a identificação de cepas por meio de um processo comparativo.

#### *Definição do ingrediente ativo*

Uma mistura de cristais de proteína de endotoxina livre produzidos por Bti AM65-52 e os esporos e células portadoras.

#### *Medição da atividade do ingrediente ativo*

Resultados do bioensaio com larvas de 4º instar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora), expressados como unidades tóxicas internacionais (U.T.I.)/mg de produto, relativos a um material de referência Bti. Observação: o único padrão de referência atualmente disponível é Valent BioSciences Corp. cepa AM65-52, lote nº 82-691-W5, que possui biopotência de 7992 U.T.I./mg.

### ESPECIFICAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA

#### ***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis, cepa AM65-52, GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA***

Especificação OMS 770/WG (Outubro de 2012)

*A presente especificação, que é a PRIMEIRA PARTE desta publicação, é baseada em uma avaliação de dados apresentados pelo fabricante, cujo nome está listado nos relatórios de avaliação (770/2006, 770/2011). Ela deve ser aplicável aos produtos relevantes de tal fabricante, mas não representa um endosso de tais produtos, nem uma garantia de que eles estão em conformidade com a especificação. A especificação pode não ser adequada para produtos de outros fabricantes. Os relatórios de avaliação (770/2006, 770/2011), como a SEGUNDA PARTE, formam parte integral desta publicação.*

#### **1 Descrição (Observação 1)**

O material deve consistir de uma mistura homogênea de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52 (Observações 2 e 3), juntamente com cargas e quaisquer outros adjuvantes necessários. Ele deve estar na forma de pequenos grânulos castanho claros (Observação 4), destinados para aplicação por spray após a desintegração e dispersão na água, ou para aplicação direta nos habitats das larvas de mosquito, incluindo recipientes de armazenamento de água. A formulação deve ser seca, de fluxo livre, e livre de matéria estranha visível e caroços.

#### **2 Ingrediente ativo (Observação 1)**

##### **2.1 Identidade**

O ingrediente ativo deve estar em conformidade com os testes de identidade descritos na Observação 5.

##### **2.2. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52, teor (Observação 6)**

A atividade biológica (biopotência) de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52 não deve ser menor do que 2700 unidades tóxicas internacionais/mg, quando determinado pelo método descrito na Observação 6.

#### **3 Impurezas relevantes (Observações 1 e 7)**

##### **3.1 Água (MT 30.5, CIPAC Handbook J, p.120, 2000) Máximo: 50 g/kg.**

#### **4 Contaminantes bacterianos (Observação 1)**

##### **4.1 *Staphylococcus aureus* (Observação 8)**

*Staphylococcus aureus* não deve ser detectado quando testado pelo método descrito na Observação 8.

##### **4.2 Espécies de *Salmonella* (Observação 9)**





Espécies de *Salmonella* não devem ser detectadas quando testado pelo método descrito na Observação 9.

#### **4.3 *Pseudomonas aeruginosa* (Observação 10)**

*Pseudomonas aeruginosa* não deve ser detectado quando testado pelo método descrito na Observação 10.

#### **4.4 *Escherichia coli* (Observação 11)**

*Escherichia coli* não deve exceder 100 unidades formadoras de colônia (UFC)/g de WG quando testado pelo método descrito na Observação 11.

### **5 Propriedades físicas (Observação 1)**

**5.1 Faixa de pH** (MT 75.3, CIPAC Handbook J, p.131, 2000) faixa de pH: 5,6 a 6,0.

**5.2 Espuma persistente** (CIPAC MT 47.2, CIPAC Handbook F, p.152, 1995) Nenhuma espuma mensurável, imediatamente (Observação 12).

**5.3 Teste de peneiramento a úmido** (MT 185, CIPAC Handbook K, p.149, 2003) Não mais do que 2,2% da formulação deve ser retida no teste de peneiramento a 75µm.

**5.4 Grau de dispersão** (MT 174, CIPAC Handbook F, p.435, 1995) (Observação 13)

Um mínimo de 90% de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52, o conteúdo que ficar abaixo de 2,2 deve estar em suspensão após 5 min em Água Padrão D CIPAC a 30 ± 2°C.

**5.5 Capacidade de suspensão** (MT 184, CIPAC Handbook F, p.142, 2003) (Observação 13)

Um mínimo de 90% de *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52, o conteúdo que ficar abaixo de 2,2 deve estar em suspensão após 30 min em Água Padrão D CIPAC a 30 ± 2°C.

**5.6 Capacidade de umedecimento** (MT 53.3, CIPAC Handbook F, p.164, 1995) A formulação deve estar completamente molhada em 5 segundos, sem turbilhão.

**5.7 Pulverulência** (MT 171, CIPAC Handbook F, p.425, 1995) (Observação 14) Quase livre de pó.

### **6 Estabilidade no armazenamento**

**6.1 Estabilidade em temperaturas elevadas** (MT 46.3, CIPAC Handbook J, p.128, 2000) (Observação 15)

Após o armazenamento por 14 dias a 54 ± 2°C, a média determinada do teor de ingrediente ativo não deve ser menor que 84%, em relação à média determinada encontrada antes do armazenamento (Observação 16), e a formulação deve continuar em conformidade com as cláusulas para:

- faixa de pH (5.1);
- teste de peneiramento a úmido (5.3);
- grau de dispersão (5.4);
- capacidade de suspensão (5.5);
- pulverulência (5.7).

#### **Observação 1**

Uma amostra consistindo de, pelo menos, dois sacos lacrados (ou as menores unidades de embalagem) deve ser coletada de cada lote para teste. Antes do teste, sacos lacrados não devem ser abertos e devem ser mantidos longe da incidência direta de luz solar e de outras fontes de calor. O material a ser testado quanto a contaminantes bacterianos



(cláusulas 4.1 - 4.5) deve ser coletado de um saco recentemente aberto em condições assépticas.

#### Observação 2

Ao contrário da maioria das especificações da OMS quanto a formulações, uma especificação para o ingrediente ativo de grau técnico correspondente não é uma referência cruzada nesse caso, porque o WG é produzido em um processo integrado no qual o ingrediente ativo não é isolado.

#### Observação 3

O ingrediente ativo, Bti cepa A65-52, é definido como uma mistura de cristais de proteína de endotoxina livre e as células e esporos Bti portadores desses cristais de endotoxina.

#### Observação 4

Os grânulos possuem odor de mofo.

#### Observação 5

### **Identificação de Bti cepa AM65-52**

A identificação é baseada nos testes a seguir.

(i) Exame microscópico das células bacterianas após coloração de Gram (bastonetes Gram positivos) e de esporos e proteínas cristalinas aderentes sem coloração de Gram.

(ii) Análise SDS-PAGE do perfil de peso molecular das proteínas cristalinas endotoxina Bti.

(iii) Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmídico para as endotoxinas.

No teste (i), a coloração de Gram é um teste bacteriológico utilizado universalmente e não é descrito abaixo. *Bacillus thuringiensis* é observado como bacilos Gram positivos no teste (i), mas esse resultado identifica apenas o amplo grupo de bactérias que inclui Bt. Observação microscópica de esporos e cristais aderentes (irregularmente redondos) apoia a identificação como Bt, mas não de forma definitiva. Os testes (ii) e (iii) identificam a cepa Bti como AM65-52. A identidade pode ser estabelecida por meio tanto do teste (ii) quanto do teste (iii) em combinação com o teste (i), mas, em casos de dúvida, todos os testes devem ser conduzidos.

Antígenos flagelares (H-14) também podem ser utilizados para identificar a presença de Bti, caso antissoros adequados bem caracterizados se tornem disponíveis, mas é importante observar que tais antissoros não identificariam a cepa.

### **Teste de identidade (ii), perfil de peso molecular dos cristais de proteína endotoxina Bti cepa A65-52.**

#### Princípio

Endotoxinas de Bti cepa AM65-52 ocorrem como inclusões irregularmente redondas, desenvolvidas durante esporulação. Os cristais contêm 4 proteínas principais<sup>1,2</sup>, designadas como Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa.

Os cristais são extraídos da formulação por centrifugação e lavagem. As proteínas dos cristais são dissolvidas e desnaturadas (perdendo suas estruturas secundária e terciária) e os pesos moleculares são determinados pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com base no método de Laemmli *et al.*<sup>3</sup>, conforme modificado por toxinas Bt por Brussock & Carrier<sup>4</sup>.

Proteínas padrão tratadas de forma semelhante também são separadas no gel, para fornecer calibradores de peso molecular. Após a coloração do gel e a descoloração para





remover o fundo, 3 importantes bandas de proteínas devem ser aparentes, de 135 kDa (Cry4Aa, Cry4Ba), 70 kDa (Cry11Aa) e 28 kDa (Cyt1Aa).

<sup>1</sup> Höfte, H. e Whiteley, H.R. (1989) *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis* [Proteínas de cristais inseticidas de *Bacillus thuringiensis*]. *Microbiological Reviews* **53**: 242-255.

<sup>2</sup> Crickmore *et al.* (1998) *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins* [Revisão da nomenclatura para os cristais de proteína pesticida de *Bacillus thuringiensis*]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.

<sup>3</sup> Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Clivagem de proteínas estruturais durante a montagem da cabeça do bacteriófago T4]. *Nature* **227** (5259): 680-685.

<sup>4</sup> Brussock, S.M. e T.C. Carrier (1990) *Use of sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis to quantify Bacillus thuringiensis δ-endotoxins* [Uso de dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida para quantificar *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxinas]. Capítulo em: *Química analítica de Bacillus thuringiensis. ACS Symposium Series*. (Hickle, L.A. e W.L. Fitch. eds.) 78-87.

### **Equipamentos e materiais**

*Sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio de Laemmli (SDS-PAGE)*; resolução de géis de 10% de acrilamida ou um gradiente linear de cerca de 5-20% é adequada.

*Banho em água fervente (100°C).*

*Micro centrífuga* (Eppendorf Microfuge, ou equivalente), produzindo 8000 g.

*Padrão de calibragem de peso molecular.* Contendo proteínas na faixa de 14 kDa (lisozima) a 200 kDa (miosina). Proteínas de peso molecular intermediário que podem ser incluídas são β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamato desidrogenase (55 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21 kDa) e mioglobina (17 kDa). Exemplos de kits de calibração comercialmente disponíveis são Mark 12 unstained standard (Invitrogen Cat.# LC5677) ou Broad range SDS-PAGE standard (BioRad Cat.# 161-0317), mas qualquer equivalente adequado pode ser usado. O padrão de calibração deve ser preparado em um tampão de amostra 2X Laemmli.

*Solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)*, 5 mM em água, pH8.

*Cloreto de sódio / solução EDTA*, NaCl/EDTA, 1 M/5 mM em água, pH 8. *Solução de hidróxido de sódio*, 0,1 M em água.

*Tampão 2X Laemmli*, 125 mM tris-HCl (pH 6,8), dodecilsulfato de sódio (SDS) 4%, β-mercaptoetanol 0,2%, glicerina 50%, azul de bromofenol (marcador de rastreamento) em água. Ditiotretol (0,2 M) pode ser usado no lugar de β-mercaptoetanol.

*Solução de azul de Coomassie*, Azul Brilhante de Coomassie R 0,2% em água contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial (ou utilizar um sistema de coloração baseada em Coomassie comercialmente disponível).

*Metanol/ácido acético*, água contendo 25% de metanol e 10% de ácido acético glacial (ou utilizar um sistema de coloração baseada em Coomassie comercialmente disponível).

*Água deionizada. Micropipeta.*

### **Método**

i. Pese aproximadamente 10 mg de WG no tubo da micro centrífuga. Adicione a solução NaCl/EDTA e disperse o produto. Centrifugue a > 8000 g até que os





sólidos suspensos formem um sedimento (normalmente 5 min a 14000 g). Descarte o sobrenadante.

ii. Lave o sedimento duas vezes em 5 mM de EDTA, pH 8,0, centrifugue como descrito acima e descarte o sobrenadante todas as vezes.

iii. Solubilize os cristais de endotoxina no sedimento resuspendendo-os em solução de NaOH 100 µl por 30 min a 37°C.

iv. Centrifugue a suspensão, conforme descrito acima, para remover materiais insolúveis. Colete o sobrenadante e descarte o sedimento.

v. Adicione o tampão 2X Laemmli 100 µl ao sobrenadante, misture e imediatamente aqueça a mistura a 100°C por 5 min.

vi. Resfrie e centrifugue a mistura por 5 min a  $\geq 8000$  g para remover materiais insolúveis. Colete o sobrenadante e descarte o sedimento.

vii. Carregue um pequeno volume (aproximadamente 10-20 µl) do sobrenadante no gel SDS-PAGE. Também carregue o gel com uma quantidade adequada de padrão de calibração de peso molecular em tampão 2X Laemmli. Realize a eletroforese de acordo com as instruções do fabricante do equipamento de gel.

viii. Core o gel com solução azul de Coomassie, para visualizar as proteínas, descore com metanol/ácido acético até que o fundo esteja transparente.

ix. Observe as posições das principais bandas distintas na amostra em relação ao padrão de calibração do peso molecular. Espera-se que as endotoxinas Bti da cepa AM65-52 produzam bandas em posições correspondentes a aproximadamente 135, 70 e 28 kDa.

#### **Teste de identidade (iii), eletroforese em gel de agarose do DNA plasmídico.**

##### **Princípio**

Os esporos Bti são separados da formulação, cultivados em caldo Luria, depois lisados e centrifugados para remover insolúveis. Após a precipitação plasmídica com etanol em baixa temperatura e a centrifugação, as proteínas residuais e o RNA são removidos com proteinase e RNases, respectivamente. O DNA plasmídico é separado por eletroforese em gel de agarose e visualizado por meio de fluorescência com brometo de etídio sob luz UV. Nessas condições, a cepa plasmídica Bti AM65-52 produz bandas de DNA visíveis correspondentes a aproximadamente 3,3, 4,2, 4,9, 10,6, 68 e 75 MDa, sendo que a última contém os genes da toxina Bti. Os componentes 68 e 75 MDa geralmente aparecerão como uma banda acima da camada de esfregaço cromossômico. Outros plasmídeos que se sabe da presença são as bandas 105 e 135 MDa, que são muito grandes para isolar facilmente.

##### **Equipamentos e materiais**

*Incubador*, 37°C.

Banho de água, 68°C.

Banho de água no agitador, 28°C.

*Refrigerador*,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Refrigerador*,  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Gelo*, picado.

*Centrífuga de bancada*, tendo tubos de 50 ml, para operar a 4000 g.

*Micro centrífuga refrigerada* (Eppendorf Microfuge, ou equivalente), para operar a 14000 g.

*Misturador Vortex*.

*Secador a vácuo*, Savant Speedvac ou equivalente.



*Caldo Luria*, Sigma-Aldrich L3522 ou equivalente, reconstituído de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave.

*Água*, duplamente destilada.

*Ácido clorídrico*, concentrado.

*Ácido acético*, glacial.

*Solução tampão Tris*, 1 M. Dissolva 121,1 g da base tris em cerca de 800 ml de água, ajuste ao pH 7,6 com HCl concentrado (cerca de 60 ml) e complete com água até atingir 1 litro.

*Solução de cloreto de sódio*, 5 M. Dissolva 292,2 g de NaCl em água, e complete até atingir 1 litro.

*Solução EDTA*, 0,5 M em água, ajustada ao pH 8,0.

*Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS)*, grau de eletroforese, 10% em água. Dissolva 100 g de SDS em cerca de 900 ml de água (aquecendo a 68°C para ajudar na dissolução), ajuste ao pH 7,2 com algumas gotas de HCl concentrado e complete com água até atingir 1 litro.

*Solução tampão TES*. Dilua uma mistura de 3 ml de tampão tris, 1 ml da solução EDTA e 1 ml da solução NaCl (conforme descrito acima) em 100 ml com água.

*Meio de sacarose*. Dilua 12,50 g de sacarose junto com 1 ml da solução NaCl e 2,5 ml da solução tris em 50 ml com água.

*Solução SDS-NaCl*. Dilua uma mistura de 2 ml da solução SDS e 1,4 ml da solução NaCl em 10 ml com água.

*Solução de acetato de sódio*. Dissolva 40,81 g de acetato de sódio 3H<sub>2</sub>O em cerca de 80 ml de água, ajuste ao pH 5,6 com ácido acético glacial e complete com água até atingir 100 ml.

*Solução tampão Tris-borato*. Dissolva 108 g da base tris, 55 g de ácido bórico e 5 ml da solução EDTA em cerca de 800 ml de água, ajuste ao pH 8,3 e dilua a 1 litro (10X o tampão de tris-borato). Dilua 1+9 com água para produzir 1X o tampão de tris-borato.

*Solução de lisozima*. 50 mg/ml em meio de sacarose.

*Etanol*, 100% e 70% de solução aquosa, resfriada a 4°C.

*Solução RNase T1*, 100 U/ml.

*Solução RNase A*, 10 mg/ml.

*Solução Proteinase*, 10 mg/ml.

*Géis agarose*. Prepare 0,8% dos géis em solução tampão 1X tris-borato. Um gel de 20 cm de comprimento, 10 cm de largura e 3-4 mm de profundidade requer cerca de 100 ml de solução agarose. Utilize 1,5% de ágar para end plugs, se necessário. Quando o gel se solidificar, cubra minimamente sua superfície com a solução tampão tris-borato (aproximadamente 40 ml).

*Papel filme PVDC* ("película aderente"), Saran<sup>TM</sup> ou equivalente.

*Aparelho de eletroforese*, adequado para executar géis de agarose. BioRad; GE (anteriormente Pharmacia), ou equivalente.

*Marcador de peso molecular*, 1kB ladder (Invitrogen), Pulse marker (Sigma) ou equivalente.

*Corante de rastreamento para eletroforese*, contendo azul de bromofenol 0,25% e Ficoll 400 15%.

*Solução de brometo de etídio*, 5 µg/ml em água (observação: utilizar luvas de borracha nitrílica para manusear a solução e os géis tratados).

*Lâmpada UV*, para visualização das bandas de DNA.





### Método

- i. Transfira, de forma asséptica, cerca de 1 mg de Bti WG para um frasco estéril contendo 2 ml de meio/água, e misture completamente.
- ii. Mantendo as condições assépticas, inocule 100 µl da mistura celular Bti suspensa em 20 ml de caldo Luria e incube, com agitação, a 28°C por cerca de 16 horas.
- iii. Sedimente as células em uma centrífuga de bancada à velocidade máxima por 15 minutos, e descarte o sobrenadante.
- iv. Adicione 1 ml de solução tampão TES, vortex para ressuspender o grânulo, transfira a suspensão para um tubo da micro centrífuga e sedimente as células por 2 minutos a 5°C. Descarte o sobrenadante.
- v. Adicione 180 µl de meio de sacarose e vortex para ressuspender o sedimento. Adicione 20 µl de solução de lisozima, misture manualmente e devagar (não use um misturador vortex) e incube a 37°C por 60 minutos.
- vi. Adicione 48 µl da solução de NaCl, 12 µl da solução EDTA e 260 µl da solução SDS-NaCl, e lentamente inverta o tubo, duas vezes. Incube a mistura por 10 minutos a 68°C, depois coloque o tubo em gelo por 60 minutos. Centrifugue a 4°C por 15 minutos para sedimentar os detritos da parede celular e transfira 300 µl do sobrenadante para outro tubo de micro centrífuga.
- vii. Adicione 33 µl de solução de acetato de sódio e 670 µl de etanol 100% frio, vortex para misturar e coloque no freezer por  $\geq 1$  hora. Centrifugue a 5°C por 15 minutos, e descarte o sobrenadante.
- viii. Adicione aproximadamente 200 µl de etanol 70% frio, vortex para misturar, depois centrifugue a 5°C por 10 minutos, e descarte o sobrenadante. Seque o sedimento em um secador a vácuo por cerca de 30 minutos. Adicione 200 µl da solução tampão TES ao sedimento seco, vortex para ressuspendê-lo, deixe a mistura descansar em temperatura ambiente por 15 minutos e depois vortex novamente para misturar.
- ix. Adicione 2 µl de solução RNase e 2 µl de solução RNase A, misture e incube a mistura a 37°C por 30 minutos. Adicione 20 µl de solução proteinase e incube a mistura a 37°C por 1 hora.
- x. Misture 15 µl da solução amostra com 3 µl do corante rastreador e transfira tudo para um poço no gel de agarose. Inclua uma quantidade adequada do marcador de peso molecular, de acordo com as instruções do fabricante, em um poço adjacente.
- xi. Submeta o gel a 50V por cerca de 15 minutos. Desligue a tensão antes de remover o excesso da solução tampão da superfície do gel, depois cubra-o com o filme PVDC. Ajuste a voltagem para liberar uma corrente de 20 mA e deixe ligada no gel ao longo da noite (16-17 horas). Inverta a polaridade da voltagem por 30 segundos imediatamente antes de desligá-la e retirá-la do gel.
- xi. Core o gel com a solução de brometo de etídio por 20 minutos, com agitação suave. Descore o gel em solução tampão 1X tris-borato por 20 minutos, trocando a solução tampão 3 vezes durante esse tempo. Coloque o gel sob uma lâmpada UV e fotografe-o. A cepa AM65-52 Bti de plasmídeos deve produzir 5 bandas fluorescentes abaixo do esfregaço cromossômico e, dependendo da qualidade de separação do gel, 1 banda pode aparecer acima do esfregaço cromossômico. Devido a possíveis mudanças de conformação de formas super enroladas à relaxadas do plasmídeo durante a preparação, os tamanhos reais dos plasmídeos são melhor determinadas por comparação no mesmo gel com uma cepa Bt que tenha tamanhos conhecidos de plasmídeos, tais como os padrões de referência Bti HD-1 ou HD-2.

### Observação 6



## Determinação de biopotência

### Princípio

A biopotência é medida em unidades tóxicas internacionais (U.T.I.) por mg do produto. A biopotência é testada por comparação da mortalidade das larvas de mosquito produzida pelo produto em teste com a mortalidade produzida por um pó seco de pulverização de referência\* de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, utilizando larvas de quarto ínstar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora). A toxicidade (U.T.I./mg) dos produtos testados é determinada de acordo com a seguinte fórmula:

U.T.I./mg de produto testado =

$$\frac{\text{padrão de referência U.T.I./mg} \times \text{padrão CL}_{50} \text{ (mg/l)}}{\text{CL}_{50} \text{ (mg/l) de produto testado}}$$

### Equipamentos e materiais

*Homogeneizador ou agitador top-drive.*

*Banho de gelo* (recipiente de gelo picado).

*Balança analítica* (precisão de  $\pm 0,1$  mg).

*Balança analítica de prato único* (precisão de  $\pm 10$  mg), preferivelmente com facilidade de tara.

*Água deionizada*

*Agente umidificante* (por exemplo, Tween 80)

*Béqueres de 200 ml*, vidro de borosilicato ou plástico

*Frasco de 500 ml*, de boca larga, com tampa de rosca, de vidro transparente

*Frasco de 100 ml*, com tampa de rosca, de vidro transparente

*Micropipeta*

*Pipeta de 10 ml*

*Tubos de 12 ml*, de plástico com rolhas ou tampas.

*Copos de 200 ml*, de plástico ou papel revestido de cera

### Método

#### (i) Produção de larvas de teste

Larvas L4 representam a sensibilidade total da população alvo e são fáceis de manipular. É muito importante utilizar uma população homogênea de quarto ínstar, que é obtida depois de cinco dias da eclosão dos ovos, por meio de métodos padrão de criação.

Ovos de *Aedes aegypti* são colocados em um copo forrado com papel de filtro e um terço cheio de água deionizada. O papel é secado em temperatura ambiente e mantido por vários meses armazenado em um saco plástico selado em temperatura ambiente. Quando as larvas são necessárias, o papel é imerso na água sem cloro. Para sincronizar a eclosão, adicione alimento de larva na água 24 horas antes de adicionar os ovos. O crescimento bacteriano vai desoxigenar a água e isso provoca a eclosão dos ovos. Isso normalmente induz os primeiros ínstars a eclodir dentro de 12 horas. Depois, essas larvas são transferidas para um recipiente (25 x 25 x 10 cm) contendo 2 litros de água sem cloro, para obter uma população de 500 a 700 larvas por recipiente. O alimento para as larvas deve ser flocos de proteína, como utilizado para peixes de aquário, ou pó de biscoito de gato, e os recipientes devem ser mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . É importante que a quantidade de alimento seja pouca para evitar forte crescimento bacteriano que mate as larvas. O ideal é alimentar várias vezes, com 1 ou 2 dias de intervalo, e observar diariamente. Caso a água se torne turva, substitua toda a água, filtrando as larvas e transferindo-as para um recipiente limpo com água limpa e alimento. De cinco a sete





dias depois, uma população homogênea de quarto ínstar (5 dias de vida e de 4 a 5 mm de comprimento) deve ser obtida.

\* O pó de referência originalmente recomendado pela OMS para esse fim, IPS82 cepa 1884 do Instituto Pasteur, não está mais disponível. Até que um pó de referência internacional substituto seja disponibilizado, um padrão de referência da cepa AM65-52 pode ser obtido da Valent Biosciences Corp. para fins de teste da conformidade do produto com a especificação. Esse padrão de referência da cepa AM65-52 foi calibrado contra IPS82 cepa 1884 e possui uma biopotência de 7992 U.T.I./mg.

(ii) Preparação das suspensões de padrão de referência para calibração do bioensaio

Antes de preparar a suspensão, verifique que a agitação/mistura do agente umidificante/mistura de água, descrito no parágrafo a seguir, não cause espuma. Caso cause, dilua (por exemplo, 1:10) o agente umidificante antes de usar.

Pese precisamente 50 mg (com aproximação de 0,1 mg) do pó do padrão de referência e coloque-o em um béquer de 200 ml com 100 ml de água deionizada (ele pode ser transferido diretamente ao frasco de 500 ml caso a boca seja grande o bastante para receber a cabeça do agitador/misturador). Deixe a mistura descansar por 30 minutos e adicione uma gota (cerca de 0,2 mg) do agente umidificante. Coloque o béquer no banho de gelo e agite ou misture a mistura por 2 minutos. Verifique visualmente se ainda existem partículas grandes e repita a agitação/mistura caso ainda existam. Pese ou tare o frasco de 500 ml e transfira a suspensão/solução para ele, lavando completa e cuidadosamente o béquer e o agitador/misturador. Adicione mais água deionizada para fazer com que o peso do conteúdo chegue a 500 g (500 ml), tampe o frasco e agite vigorosamente para misturar o conteúdo. Confirme, por análise microscópica de uma pequena alíquota, se agregados de esporos e cristais ainda persistem. Caso haja, o conteúdo deve passar por mais agitação/mistura no banho de gelo. Essa suspensão/solução primária contém 1 mg/10 ml e deve ser agitada vigorosamente logo antes de remover alíquotas.

Transfira 10 ml de alíquotas da suspensão/solução primária para tubos limpos de 12 ml que sejam tampados/fechados imediatamente. Caso esteja transferindo várias alíquotas, tampe e agite a suspensão/solução primária em intervalos de não mais que 3 minutos, porque os esporos e cristais assentam rapidamente na água. As alíquotas podem ser armazenadas por um mês a 4°C e por dois anos em um freezer a -18°C. Cada um contém 1 mg do pó padrão.

Para preparar uma “solução mãe”, pese ou tare um frasco de 100 ml. Transfira uma das alíquotas de 10 ml para um frasco de 100 ml, lavando-o cuidadosamente, pelo menos duas vezes, com água deionizada, e complete até atingir 100 g. Agite vigorosamente a mistura (ou use o misturador) para produzir uma suspensão homogênea. Alíquotas congeladas devem ser totalmente homogeneizadas antes de usar, porque as partículas se aglomeram durante o congelamento. A “solução mãe” contém 10 mg/l.

A partir da “solução mãe”, diluições subsequentes são preparadas diretamente em copos de plástico cheios (por pesagem) com 150 ml de água deionizada. Para cada copo, 25 larvas L4 de *Aedes aegypti* são adicionadas primeiro por meio de uma pipeta de Pasteur, antes da adição das suspensões bacterianas. O volume de água adicionado com as larvas é removido do copo (por pesagem) e descartado, para evitar mudança do volume de líquido no copo. Por meio de micropipetas, 600 µl, 450 µl, 300 µl, 150 µl, 120 µl e 75 µl de “solução mãe” são adicionados a copos separados e as soluções misturadas para produzir concentrações finais de 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 e 0,005 mg/l, respectivamente, do pó de padrão de referência. Quatro copos replicados são utilizados





para cada concentração e um para controle, que contém apenas 150 ml de água deionizada.

(iii) Preparação de suspensões do produto a ser testado

Um homogenato inicial é feito da mesma maneira descrita acima para o pó de padrão de referência, com a diferença que as determinações de replicatas devem ser feitas sobre diluições preparadas por pesagem de porções de teste separadas do produto. Ou seja, quatro replicatas da suspensão/solução primária devem ser preparadas. Copos e larvas são preparados conforme descrito acima e diluições comparáveis são preparadas para o padrão de referência.

(iv) Determinação da toxicidade

Nenhum alimento é adicionado para as larvas de *Aedes*. Todos os testes devem ser conduzidos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com um ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para evitar efeitos adversos de evaporação da água em baixa umidade, a umidade relativa deve ser mantida em  $50 \pm 15\%$ , se possível.

Cada série de bioensaio deve, de preferência, envolver 6 concentrações x 4 replicatas x 25 larvas para o padrão de referência e o desconhecido, e 100 larvas para o controle. O objetivo é identificar a faixa de concentrações que causam de 5 a 95% de mortalidade (porque 100 larvas são usadas). Dados que apresentam 0 ou 100% de mortalidade são ignorados para o cálculo de  $CL_{50}$ . Para preparar uma curva de dose-resposta válida, apenas concentrações que apresentam mortalidade entre 95 e 5% devem ser usadas. Dentro dessa faixa, um mínimo de duas concentrações deve estar acima da  $CL_{50}$  e duas abaixo, para garantir a validade do valor de  $CL_{50}$  (a sensibilidade da colônia do inseto pode exigir que uma série um pouco diferente de 6 diluições seja usada). A mortalidade é determinada em 24 e 48 horas, por meio de contagem das larvas vivas remanescentes. Caso ocorra pupação, as pupas devem ser removidas e seus números excluídos dos cálculos. Caso mais de 5% das larvas entre na fase de pupa, o teste é invalidado, porque as larvas não ingerem 24 horas antes da pupação e muitas larvas podem ter sobrevivido simplesmente porque eram muito velhas. Por causa da rápida ação de morte de Bti, normalmente não há diferença entre a mortalidade de 24 e 48 horas. Nesse caso, a contagem de 48 horas confirma a leitura de 24 horas e proporciona uma verificação sobre a possível influência de fatores que não façam parte dos componentes de Bti.

Caso a mortalidade no controle exceda 5%, as mortalidades dos grupos tratados devem ser corrigidas de acordo com a fórmula de Abbott [Abbott, W. S., (1925). *A method for computing the effectiveness of an insecticide* [Um método para computar a eficácia de um inseticida]. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265-267]:

$$\text{porcentagem (\%)} \text{ controle} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

onde: X = % de sobrevivência no controle não tratado; Y = % de sobrevivência na amostra tratada.

Testes com uma mortalidade no controle maior que 10%, ou com alguma pupação maior que 5%, devem ser descartados. Linhas de regressão mortalidade-concentração podem ser desenhadas em papel gaussiano-logarítmico, mas isso é bastante subjetivo. É preferível utilizar um programa estatístico, tal como SAS, que incorpora Análise Log-Probit. Com tal programa tão estatístico, a fórmula de Abbott não é necessária porque a correção é automaticamente realizada pelo programa. A toxicidade é determinada pela estimativa e comparação da  $CL_{50}$  do produto testado com as preparações do padrão de referência, por meio da fórmula descrita acima. A toxicidade é definida pela contagem em 24 horas após o início do teste.



Para mais precisão, os bioensaios devem ser repetidos em, pelo menos, três dias diferentes, concomitantemente com o ensaio do padrão de referência, e o desvio padrão dos meios calculados. Uma série de testes é válida caso um desvio padrão relativo (DPR) seja  $< 25\%$ .

#### Observação 7

Demonstrou-se que beta-exotoxina (um nucleotídeo termoe estável composto de adenina, glicose e ácido Allaric) não ocorre nos produtos do fabricante identificado no relatório de avaliação 770/2006, e é improvável que sua presença ocorra naturalmente. No entanto, beta-exotoxina pode ser gerada por algumas cepas de *Bacillus thuringiensis* e, caso detectável pelo método de Bond *et al.*\*, deve ser designada como impureza relevante e uma cláusula seria necessária para limitar sua concentração.

#### Observação 8

### **Enumeração e Identificação de *Staphylococcus aureus***

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Solução tampão de fosfato estéril, pH 7,2* (USP ou equivalente)

*Placas de ágar estéreis e com meio pronto Baird-Parker* (Difco 0768-01-1, BBL 11023, ou equivalente), *suplementadas com enriquecimento de gema de ovo telurito* (Difco 0779-73-1 ou equivalente).

*Plasma de mamífero* (plasma coagulase de coelho, liofilizado, BBL 40658 ou equivalente).

*Frascos estéreis, tampados*, com, no mínimo, 100 ml

*Tubos de ensaio estéreis*

#### **Procedimento**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de solução tampão de fosfato estéril. Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação.

Em duplicata, transfira 1 ml da suspensão (0,1 g de WG) para a superfície das placas de ágar. Espalhe o inóculo uniformemente sobre a superfície e deixe que afunde na superfície do ágar. Cubra, inverta e incube as placas por 21-26 horas antes de examiná-las.

\* Bond R.P.M., *et al.* *The thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis* [A exotoxina termoe estável de *Bacillus thuringiensis*]. In: Burges H. D. and Hussey N. W., eds. *Microbial control of insects and mites* [Controle microbiano de insetos e ácaros]. Academic Press, London, 1971.

*S. aureus* forma colônias pretas, brilhantes e convexas cercadas por uma área clara no ágar Baird-Parker. Caso o resultado seja negativo para *Staphylococcus*, incube as placas por mais 24 horas e leia novamente. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

#### **Testes confirmatórios**

i. Realize marcação gram em uma colônia tipicamente suspeita de cada placa. *S. aureus* são cocos gram positivos que ocorrem em aglomerados. Caso as células não se encaixem nessa descrição, *S. aureus* pode ser considerado ausente da amostra. No entanto, caso as células se encaixem na descrição, realize o teste a seguir.

ii. Teste de coagulase. Utilizando uma alça de inoculação estéril, transfira uma porção da colônia tipicamente suspeita para um tubo de ensaio estéril com 0,5 ml





de plasma de mamífero, e agite para misturar. Conduza o teste em paralelo com controles positivo e negativo. Coloque os tubos na incubadora, examine-os após 3 horas e depois em intervalos adequados por um total de 24 horas. Os controles positivo e negativo devem mostrar coagulação e não coagulação, respectivamente. Caso o teste da colônia suspeita não mostre coagulação visível, pode-se concluir que não há coagulase positiva de *S. aureus*.

#### Observação 9

### **Detecção de espécies de *Salmonella***

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Caldo de lactose*, Difco 0004, BBL 11333, ou equivalente

*Caldo de selenito-cistina*, tubos de ensaio de 10 ml com tampa (Difco 0687, BBL 11606, ou equivalente)

*Placa de ágar verde brilhante com meio pronto*, (Difco 0014, BBL 11073, ou equivalente)

*Placa de ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) com meio pronto, estéril*, (Difco 0788, BBL 11838, ou equivalente)

*Placa de ágar sulfito de bismuto com meio pronto, estéril* (Difco 0073, BBL 11031, ou equivalente).

*Tubo inclinado pré-preparado, estéril, contendo aproximadamente 10 ml de ágar triplice açúcar ferro* (Difco 0265, BBL 11749, ou equivalente).

*Solução verde brilhante*, USP (1:1000 solução aquosa preparada e armazenada a 2-8°C)

*Solução de iodo-iodeto*, USP (Dissolva 5 de iodeto de potássio e 6 g de iodo em 20 ml de água purificada USP; armazene a 2-8°C)

*Caldo fluido tetratationato*, (Difco 0104, BBL 11705, ou equivalente comercialmente preparado), 20 ml em tubos de ensaio tampados. Para cada tubo de 10 ml de caldo tetratationato, adicione 0,1 ml da solução verde brilhante preparada; misture, depois adicione 0,2 ml da solução iodo-iodeto preparada. Misture.

#### **Procedimento**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de caldo de lactose estéril. Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação e incube por 24 horas.

Transfira porções de 1 ml (0,1 g de WG) da cultura incubada para dois tubos separados que contenham, respectivamente, 10 ml de caldo selenito cistina e 10 ml de caldo fluido tetratationato contendo solução iodo-iodeto e solução verde brilhante. Misture e incube os tubos inoculados por 18-24 horas.

Utilizando uma alça de inoculação, passe porções dos tubos de tetratationato e selenito cistina incubados em placas separadas de ágar verde brilhante, ágar XLD e ágar sulfito de bismuto. Cubra, inverta e incube as placas por 18-24 horas, ou por até 48 horas no caso de ágar sulfito de bismuto, antes de examiná-las.

As colônias de *Salmonella* exibem as características a seguir.

Ágar verde brilhante - colônias pequenas, transparentes e sem cor, ou cor-de-rosa/branco opaco, mais tarde se cercando com uma área cor-de-rosa a vermelha.

Ágar XLD - colônias vermelhas, com ou sem centros pretos. Ágar sulfito de bismuto - colônias pretas ou verde escuras.



Caso nenhuma das colônias se encaixe nessas descrições, a amostra atende à exigência de estar livre de espécies de *Salmonella*. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

#### **Testes confirmatórios**

i. Caso colônias que se encaixam em qualquer uma das descrições acima sejam encontradas, realize uma coloração de Gram no material retirado delas. As espécies de *Salmonella* são bacilos Gram negativos. Caso as células se encaixem na descrição, prossiga para o teste confirmatório ii, abaixo.

ii. Com uma alça ou agulha de inoculação, transfira material das colônias suspeitas para um tubo inclinado contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI). Primeiro, perfure a superfície com a agulha/alça, depois esfregue a inclinação. Incube o(s) tubo(s) por 12-24 horas. As espécies de *Salmonella* normalmente fermentam a glicose com a produção de ácido, e algumas espécies também produzem gás e H<sub>2</sub>S (Tabela 1).

O tubo, caso positivo para *Salmonella*, apresentará uma inclinação alcalina (vermelha) e um fundo ácido (amarelo), com ou sem o escurecimento do fundo devido à produção de H<sub>2</sub>S. Caso a presença de *Salmonella* seja indicada, prossiga para a identificação do organismo por meio de aplicação do sistema de identificação automática microbiana Vitek/Vitek2, outro sistema de identificação aprovado, ou por meio da realização de reações bioquímicas ou de cultura adequadas.

Tabela 1. Reações observadas no ágar TSI

Reação	Explicação
Fundo ácido (amarelo), inclinação alcalina (vermelha)	Glicose fermentada
Ácido em todo o meio, fundo e inclinação amarelos	Lactose ou sacarose, ou ambas, fermentadas
Bolha de gás no fundo, meio às vezes dividido	Cultura aerogênica
Escurecimento no fundo	Sulfeto de hidrogênio produzido
Fundo e inclinação alcalinos (meio totalmente vermelho)	Nenhum dos três açúcares fermentado

#### **Observação 10**

#### **Enumeração e Identificação de *Pseudomonas aeruginosa***

##### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Papeis de filtro*.

*Solução tampão de fosfato estéril, pH 7,2* (USP ou equivalente)

*Placas de ágar cetrímide com meio pronto, estéreis*, (ágar BBL 11554-pseudosel, ou equivalente).

*Dicloridrato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina*.

*Reagente oxidase*, (DrySlide® BBL 231746, ou equivalente).

##### **Procedimento**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de solução tampão de fosfato estéril USP. Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação.

Em duplicata, transfira porções de 1 ml (0,1 g de WG) da suspensão para a superfície das placas de ágar cetrímide. Espalhe o inóculo uniformemente sobre a superfície das





placas, cubra e deixe que afunde na superfície. Inverta e incube as placas por 48-72 horas antes de examiná-las.

*P. aeruginosa* forma colônias características azuladas e esverdeadas. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

#### **Testes confirmatórios**

i. Realize a coloração de Gram. Células de *P. aeruginosa* são bacilos Gram negativos delgados.

ii. Realize um teste de oxidase.

Ou

Utilizando uma alça de fio de platina ou uma espátula de madeira estéril, transfira uma porção da colônia suspeita para uma área de reação oxidase DrySlide®. Espalhe o inóculo na área de reação em um tamanho de 3 a 4 mm.

Examine a área de reação depois de 20 segundos. Reação positiva: os organismos produzem uma coloração roxa ou escura dentro de 20 segundos. Reação negativa: os organismos não produzem nenhuma mudança de cor, ou mudam para cinza claro, dentro de 20 segundos.

Ou

Utilize papel de filtro impregnado com Dicloridrato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina ou umedecido com uma gota de reagente oxidase. Concomitantemente, realize o teste em uma cultura de referência *P. aeruginosa*, como controle positivo. Caso uma coloração roxa não se desenvolva dentro de 30 segundos, o resultado é negativo.

iii. Caso seja necessário, confirmação adicional pode ser obtida por meio de testes bioquímicos ou de cultura adequados para a identificação de bacilos oxidase-positivos, Gram-negativos e não fermentadores.

#### **Observação 11**

**Enumeração de *Escherichia coli*** (método de contagem em placas “pour plate”)

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$ .

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Fonte de luz UV de comprimento de onda longo*.

*Solução tampão de fosfato estéril, pH 7,2* (USP ou equivalente).

*Ágar vermelho violeta bile com 4-metil-umbelifenil- $\beta$ -D-glicuronídeo* (ágar VRB com MUG) (Difco 229100 ou equivalente).

*Placas de Petri estéreis*.

#### **Método**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de solução tampão de fosfato estéril. Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação. Caso necessário, dilua ainda mais com solução tampão de fosfato estéril, misturando completamente, para que 1 ml renda não mais que 300 colônias.

Em duplicata, transfira 1 ml da suspensão (0,1 g de WG, caso a suspensão não tenha sido diluída ainda mais) para cada uma de duas placas estéreis. Adicione a cada placa aproximadamente 15-20 ml de ágar VRB com MUG, que tenha sido resfriado até cerca de 45°C.

Cubra as placas de Petri, misture a suspensão com o ágar por meio de rotação das placas em uma direção e depois na direção oposta. Deixe que o conteúdo solidifique em temperatura ambiente, inverta as placas e incube a 35-37°C por 22-26 horas.



Examine as placas para verificar crescimento e, utilizando a fonte de luz UV, para verificar colônias fluorescentes. Cepas típicas de *E. coli* (colônias vermelhas cercadas por precipitado de bile) exibem um halo fluorescente azulado (MUG-positivo). Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios. Caso seja confirmada como *E. coli*, conte o número de colônias MUG-positivas e calcule a contagem média para as duas placas. Não conte as colônias de coliformes que não são *E. coli*, que também podem produzir colônias vermelhas com precipitado de bile, mas são MUG-negativas.

#### **Testes confirmatórios**

i. Colônias que são presumivelmente de *E. coli* devem ser confirmadas por meio do sistema de identificação automática microbiana Vitek ou por meio de realização de outros testes bioquímicos ou de cultura adequados para confirmar a presença de *E. coli*.

#### **Observação 12**

O teste deve ser conduzido com a formulação a 0,67 g/ml em água, o que excede a taxa mais alta de uso recomendada pelo fabricante. O teste deve ser conduzido em água padrão D CIPAC.

#### **Observação 13**

Bioensaio é o único método totalmente confiável para medir o teor (biopotência) de ingrediente ativo ainda em suspensão. No entanto, métodos mais simples, tais como determinação gravimétrica, podem ser utilizados rotineiramente, contanto que tais métodos tenham demonstrado apresentar resultados iguais àqueles do método de bioensaio. Em caso de contestação, o bioensaio deve ser o método árbitro.

#### **Observação 14**

A medição de pulverulência deve ser realizada sobre a amostra “conforme recebida” e, quando praticável, a amostra deve ser coletada do recipiente recentemente aberto, porque mudanças no teor de água das amostras podem influenciar de maneira significativa a pulverulência.

O método óptico, MT 171.2, normalmente mostra boa correlação com o método gravimétrico, MT 171.1, e pode, portanto, ser usado como alternativa quando o equipamento estiver disponível. Quando a correlação estiver em dúvida, ela pode ser verificada com a formulação a ser testada. Em caso de contestação, o método gravimétrico deve ser usado.

#### **Observação 15**

Testes para verificar contaminantes bacterianos (cláusulas 4.1-4.4) não são especificados após o armazenamento do produto por 14 dias a 54°C, porque é improvável que esse regime revele a extensão da proliferação potencial que pode ocorrer em condições normais de armazenamento.

#### **Observação 16**

Amostras representando “antes” e “depois” do teste de estabilidade no armazenamento devem ser testadas concomitantemente após o teste, a fim de minimizar a variação que ocorre em ensaios da biopotência. Materiais para a amostra do teste de “antes” devem ser armazenados em recipientes lacrados a 2-8°C, pela duração do teste, antes do bioensaio. Caso o recipiente esteja armazenado para esse fim em um refrigerador ou freezer, ele deve ser equilibrado a temperatura ambiente e secado externamente antes de aberto, para evitar contaminar os grânulos com umidade atmosférica, o que poderia afetar os resultados dos testes, tais como biopotência e pulverulência.

**ESPECIFICAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA**  
***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis*, cepa AM65-52, GRÂNULOS**





## Especificação OMS 770/GR (outubro de 2012)

A presente especificação, que é a PRIMEIRA PARTE desta publicação, é baseada em uma avaliação de dados apresentados pelo fabricante, cujo nome está listado no relatório de avaliação (770/2011). Ela deve ser aplicável aos produtos relevantes de tal fabricante, mas não representa um endosso de tais produtos, nem uma garantia de que eles estão em conformidade com a especificação. A especificação pode não ser adequada para produtos de outros fabricantes. O relatório de avaliação (770/2011), como a SEGUNDA PARTE, forma parte integral desta publicação.

### 1 Descrição (Observação 1)

O material deve consistir de grânulos contendo *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52 (Observações 2), juntamente com transportadores adequados e quaisquer outros formulantes necessários. Ele deve estar na forma de pequenos grânulos com uma distribuição estreita de partículas (Observação 3), destinados para aplicação direta nos habitats das larvas de mosquito. A formulação deve ser seca, livre de matéria estranha visível e caroços, de fluxo livre, essencialmente isenta de pó e destinada para aplicação manual ou por máquina.

### 2 Ingrediente ativo (Observação 1)

#### 2.1 Identidade

O ingrediente ativo deve estar em conformidade com os testes de identidade descritos na Observação 4.

#### 2.2 *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, cepa AM65-52, teor (Observação 5)

A atividade biológica (biopotência) do *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* cepa AM65-52 não deve ser menor do que 200 unidades tóxicas internacionais/mg, quando determinado pelo método descrito na Observação 5.

### 3 Impurezas relevantes (Observações 1 e 6)

#### 3.1 Água (MT 30.5, CIPAC Handbook J, p.120, 2000) Máximo: 30 g/kg.

### 4 Contaminantes bacterianos (Observação 1)

#### 4.1 *Staphylococcus aureus* (Observação 7)

*Staphylococcus aureus* não deve ser detectado quando testado pelo método descrito na Observação 7.

#### 4.2 Espécies de *Salmonella* (Observação 8)

Espécies de *Salmonella* não devem ser detectadas quando testado pelo método descrito na Observação 8.

#### 4.3 *Pseudomonas aeruginosa* (Observação 9)

*Pseudomonas aeruginosa* não deve ser detectado quando testado pelo método descrito na Observação 9.

#### 4.4 *Escherichia coli* (Observação 10)

*Escherichia coli* não deve exceder 100 unidades formadoras de colônia (UFC)/g de GR quando testado pelo método descrito na Observação 10.

### 5 Propriedades físicas (Observação 1)

#### 5.1 Faixa de pH (MT 75.3, CIPAC Handbook J, p.131, 2000) faixa de pH: 4,5 a 7,0.

#### 5.2 Densidade compactada e volumétrica (MT 186, CIPAC Handbook K, p.151, 2003) Densidade volumétrica: 0,6 a 0,7 g/ml.

Densidade compactada: 0,7 a 0,8 g/ml.

#### 5.3 Faixa de tamanho nominal (MT 170, CIPAC Handbook F, p.420, 1995)





Não menos que 900 g/kg da formulação deve estar dentro da faixa de tamanho entre 841 e 2000  $\mu\text{m}$ .

**5.4 Pulverulência** (MT 171, CIPAC Handbook F, p.425, 1995) (Observação 11)  
Quase livre de pó.

**5.5 Resistência ao atrito** (MT 178, CIPAC Handbook H, p.304, 1998) Mínimo de 97% de resistência ao atrito.

## **6 Estabilidade no armazenamento**

**6.1 Estabilidade em temperaturas elevadas** (MT 46.3, CIPAC Handbook J, p.128, 2000) (Observação 12)

Após o armazenamento por 14 dias a  $54 \pm 2^\circ\text{C}$ , a média determinada de biopotência não deve ser menor que 70%, em relação à média determinada encontrada antes do armazenamento (Observação 13), e a formulação deve continuar em conformidade com as cláusulas para:

- faixa de pH (5.1);
- faixa de tamanho nominal (5.3);
- pulverulência (5.4);
- resistência ao atrito (5.6).

### Observação 1

Uma amostra consistindo de, pelo menos, dois sacos lacrados (ou as menores unidades de embalagem) deve ser coletada de cada lote para teste. Antes do teste, sacos lacrados não devem ser abertos e devem ser mantidos longe da incidência direta de luz solar e de outras fontes de calor. O material a ser testado quanto a contaminantes bacterianos (cláusulas 4.1 - 4.4) deve ser coletado de um saco recentemente aberto em condições assépticas.

### Observação 2

O ingrediente ativo, Bti cepa A65-52, é definido como uma mistura de cristais de proteína de endotoxina livre e as células e esporos Bti portadores desses cristais de endotoxina.

### Observação 3

Os grânulos possuem odor de mofo.

### Observação 4

## **Identificação de Bti cepa AM65-52**

A identificação é baseada nos testes a seguir.

- (i) Exame microscópico das células bacterianas após coloração de Gram (bastonetes Gram positivos) e de esporos e proteínas cristalinas aderentes sem coloração de Gram.
- (ii) Análise SDS-PAGE do perfil de peso molecular das proteínas cristalinas endotoxina Bti.
- (iii) Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmídico para as endotoxinas.

No teste (i), a coloração de Gram é um teste bacteriológico utilizado universalmente e não é descrito abaixo. *Bacillus thuringiensis* é observado como bacilos Gram positivos no teste (i), mas esse resultado identifica apenas o amplo grupo de bactérias que inclui Bt. Observação microscópica de esporos e cristais aderentes (irregularmente redondos) apoia a identificação como Bt, mas não de forma definitiva. Os testes (ii) e (iii) identificam a cepa Bti como AM65-52. A identidade pode ser estabelecida por meio tanto do teste (ii) quanto do teste (iii) em combinação com o teste (i), mas, em casos de dúvida, todos os testes devem ser conduzidos.



Antígenos flagelares (H-14) também podem ser utilizados para identificar a presença de Bti, caso antissoros adequados bem caracterizados se tornem disponíveis, mas é importante observar que tais antissoros não identificariam a cepa.

### **Teste de identidade (ii), perfil de peso molecular dos cristais de proteína endotoxina Bti cepa A65-52.**

#### **Princípio**

Endotoxinas de Bti cepa AM65-52 ocorrem como inclusões irregularmente redondas, desenvolvidas durante esporulação. Os cristais contêm 4 proteínas principais<sup>1,2</sup>, designadas como Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa.

Os cristais são extraídos da formulação por agitação, centrifugação e lavagem. As proteínas dos cristais são dissolvidas e desnaturadas (perdendo suas estruturas secundária e terciária) e os pesos moleculares são determinados pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com base no método de Laemmli *et al.*<sup>3</sup>, conforme modificado por toxinas Bt por Brussock & Carrier<sup>4</sup>.

Proteínas padrão tratadas de forma semelhante também são separadas no gel, para fornecer calibradores de peso molecular.

Após a coloração do gel e a descoloração para remover o fundo, 3 importantes bandas de proteínas devem ser aparentes, de 135 kDa (Cry4Aa, Cry4Ba), 70 kDa (Cry11Aa) e 28 kDa (Cyt1Aa).

#### **Equipamentos e materiais**

*Sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio de Laemmli (SDS-PAGE)*; resolução de géis de 10% de acrilamida ou um gradiente linear de cerca de 5-20% é adequada.

*Banho em água fervente* (100°C).

*Micro centrífuga* (Eppendorf Microfuge, ou equivalente), produzindo 8000 g.

*Padrão de calibragem de peso molecular.* Contendo proteínas na faixa de 14 kDa (lisozima) a 200 kDa (miosina). Proteínas de peso molecular intermediário que podem ser incluídas são β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamato desidrogenase (55 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21 kDa) e mioglobina (17 kDa). Exemplos de kits de calibração comercialmente disponíveis são Mark 12 unstained standard (Invitrogen Cat.# LC5677) ou Broad range SDS-PAGE standard (BioRad Cat.# 161-0317), mas qualquer equivalente adequado pode ser usado. O padrão de calibração deve ser preparado em um tampão de amostra 2X Laemmli.

<sup>1</sup> Höfte, H. e Whiteley, H.R. (1989) *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis* [Proteínas de cristais inseticidas de *Bacillus thuringiensis*]. Microbiological Reviews **53**: 242-255.

<sup>2</sup> Crickmore *et al.* (1998) *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins* [Revisão da nomenclatura para os cristais de proteína pesticida de *Bacillus thuringiensis*]. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 807-813.

<sup>3</sup> Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Clivagem de proteínas estruturais durante a montagem da cabeça do bacteriófago T4].

*Nature* **227** (5259): 680-685.

<sup>4</sup> Brussock, S.M. e T.C. Carrier (1990) *Use of sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis to quantify Bacillus thuringiensis δ-endotoxins* [Uso de dodecil-





sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida para quantificar *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxinas]. Capítulo em: Química analítica de *Bacillus thuringiensis*.

ACS Symposium Series. (Hickle, L.A. e W.L. Fitch. eds.) 78-87.

*Solução de ácido etilenodiaminotetracético* (EDTA), 5 mM em água, pH8. *Cloreto de sódio / solução EDTA*, NaCl/EDTA, 1 M/5 mM em água, pH 8. *Solução de hidróxido de sódio*, 0,1 M em água.

*Solução tampão 2X Laemmli*, 125 mM tris-HCl (pH 6,8), dodecilsulfato de sódio (SDS) 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%, glicerina 50%, azul de bromofenol (marcador de rastreamento) em água. Ditioneitol (0,2 M) pode ser usado no lugar de  $\beta$ -mercaptoetanol.

*Solução de azul de Coomassie*, Azul Brilhante de Coomassie R 0,2% em água contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial (ou utilizar um sistema de coloração baseada em Coomassie comercialmente disponível).

*Metanol/ácido acético*, água contendo 25% de metanol e 10% de ácido acético glacial (ou utilizar um sistema de coloração baseada em Coomassie comercialmente disponível).

*Água deionizada. Micropipeta.*

### **Método**

- i. Pese aproximadamente 1 g de Bti GR em um tubo de 50 ml com tampa de rosca. Adicione 3 ml de Tween 80 0,2% e agite os grânulos na solução por 30 minutos.
- ii. Retire uma alíquota de 200  $\mu$ l da suspensão, evitando grânulos, e passe para um tubo limpo de micro centrífuga.
- iii. Adicione 1 ml da solução NaCl/EDTA e disperse o produto. Centrifugue a  $> 8000$  g até que os sólidos suspensos formem um sedimento (normalmente 5 min a 14000 g). Descarte o sobrenadante.
- iv. Lave o sedimento duas vezes em 5 mM de EDTA, pH 8,0, centrifugue como descrito acima e descarte o sobrenadante todas as vezes.
- v. Solubilize os cristais de endotoxina no sedimento resuspendendo-os em solução de NaOH 100  $\mu$ l por 30 min a 37°C.
- vi. Centrifugue a suspensão, conforme descrito acima, para remover materiais insolúveis. Colete o sobrenadante e descarte o sedimento.
- vii. Adicione o tampão 2X Laemmli 100  $\mu$ l ao sobrenadante, misture e imediatamente aqueça a mistura a 100°C por 5 min.
- viii. Resfrie e centrifugue a mistura por 5 min a  $\geq 8000$  g para remover materiais insolúveis. Colete o sobrenadante e descarte o sedimento.
- ix. Carregue um pequeno volume (aproximadamente 10-20  $\mu$ l) do sobrenadante no gel SDS-PAGE. Também carregue o gel com uma quantidade adequada de padrão de calibração de peso molecular em tampão 2X Laemmli. Realize a eletroforese de acordo com as instruções do fabricante do equipamento de gel.
- x. Core o gel com solução azul de Coomassie, para visualizar as proteínas, descarte com metanol/ácido acético até que o fundo esteja transparente.
- xi. Observe as posições das principais bandas distintas na amostra em relação ao padrão de calibração do peso molecular. Espera-se que as endotoxinas Bti da cepa AM65-52 produzam bandas em posições correspondentes a aproximadamente 135, 70 e 28 kDa.

**Teste de identidade (iii), eletroforese em gel de agarose do DNA plasmídico.**

### **Princípio**





Os esporos Bti são separados da formulação, cultivados em caldo Luria, depois lisados e centrifugados para remover insolúveis. Após a precipitação plasmídica com etanol em baixa temperatura e a centrifugação, as proteínas residuais e o RNA são removidos com proteinase e Rnases, respectivamente. O DNA plasmídico é separado por eletroforese em gel de agarose e visualizado por meio de fluorescência com brometo de etídio sob luz UV. Nessas condições, a cepa plasmídica Bti AM65-52 produz bandas de DNA visíveis correspondentes a aproximadamente 3,3, 4,2, 4,9, 10,6, 68 e 75 MDa, sendo que a última contém os genes da toxina Bti. Os componentes 68 e 75 MDa geralmente aparecerão como uma banda acima da camada de esfregaço cromossômico. Outros plasmídeos que se sabe da presença são as bandas 105 e 135 MDa, que são muito grandes para isolar facilmente.

### **Equipamentos e materiais**

*Incubador*, 37°C.

Banho de água, 68°C.

Banho de água no agitador, 28°C.

*Refrigerador*,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Refrigerador*,  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Gelo*, picado.

*Centrífuga de bancada*, tendo tubos de 50 ml, para operar a 4000 g.

*Micro centrífuga refrigerada* (Eppendorf Microfuge, ou equivalente), para operar a 14000 g.

*Misturador Vortex*.

*Secador a vácuo*, Savant Speedvac ou equivalente.

*Caldo Luria*, Sigma-Aldrich L3522 ou equivalente, reconstituído de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave.

*Água*, duplamente destilada.

*Ácido clorídrico*, concentrado.

*Ácido acético*, glacial.

*Solução tampão Tris*, 1 M. Dissolva 121,1 g da base tris em cerca de 800 ml de água, ajuste ao pH 7,6 com HCl concentrado (cerca de 60 ml) e complete com água até atingir 1 litro.

*Solução de cloreto de sódio*, 5 M. Dissolva 292,2 g de NaCl em água, e complete até atingir 1 litro.

*Solução EDTA*, 0,5 M em água, ajustada ao pH 8,0.

*Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS)*, grau de eletroforese, 10% em água. Dissolva 100 g de SDS em cerca de 900 ml de água (aquecendo a 68°C para ajudar na dissolução), ajuste ao pH 7,2 com algumas gotas de HCl concentrado e complete com água até atingir 1 litro.

*Solução tampão TES*. Dilua uma mistura de 3 ml de tampão tris, 1 ml da solução EDTA e 1 ml da solução NaCl (conforme descrito acima) em 100 ml com água.

*Meio de sacarose*. Dilua 12,50 g de sacarose junto com 1 ml da solução NaCl e 2,5 ml da solução tris em 50 ml com água.

*Solução SDS-NaCl*. Dilua uma mistura de 2 ml da solução SDS e 1,4 ml da solução NaCl em 10 ml com água.

*Solução de acetato de sódio*. Dissolva 40,81 g de acetato de sódio  $3\text{H}_2\text{O}$  em cerca de 80 ml de água, ajuste ao pH 5,6 com ácido acético glacial e complete com água até atingir 100 ml.



*Solução tampão Tris-borato.* Dissolva 108 g da base tris, 55 g de ácido bórico e 5 ml da solução EDTA em cerca de 800 ml de água, ajuste ao pH 8,3 e dilua a 1 litro (10X o tampão de tris-borato). Dilua 1+9 com água para produzir 1X o tampão de tris-borato.

*Solução de lisozima.* 50 mg/ml em meio de sacarose.

*Etanol*, 100% e 70% de solução aquosa, resfriada a 4°C.

*Solução RNase T1*, 100 U/ml.

*Solução RNase A*, 10 mg/ml.

*Solução Proteinase*, 10 mg/ml.

*Géis agarose.* Prepare 0,8% dos géis em solução tampão 1X tris-borato. Um gel de 20 cm de comprimento, 10 cm de largura e 3-4 mm de profundidade requer cerca de 100 ml de solução agarose. Utilize 1,5% de ágar para end plugs, se necessário. Quando o gel se solidificar, cubra minimamente sua superfície com a solução tampão tris-borato (aproximadamente 40 ml).

*Papel filme PVDC* (“película aderente”), Saran<sup>TM</sup> ou equivalente.

*Aparelho de eletroforese*, adequado para executar géis de agarose. BioRad; GE (anteriormente Pharmacia), ou equivalente.

*Marcador de peso molecular*, 1kB ladder (Invitrogen), Pulse marker (Sigma) ou equivalente.

*Corante de rastreamento para eletroforese*, contendo azul de bromofenol 0,25% e Ficoll 400 15%.

*Solução de brometo de etídio*, 5 µg/ml em água (observação: utilizar luvas de borracha nitrílica para manusear a solução e os géis tratados).

*Lâmpada UV*, para visualização das bandas de DNA.

### **Método**

- i. Transfira, de forma asséptica, cerca de 100 mg de Bti GR para um frasco estéril contendo 2 ml de meio/água, e misture completamente.
- ii. Mantendo as condições assépticas, inocule 100 µl da mistura celular Bti suspensa em 20 ml de caldo Luria e incube, com agitação, a 28°C por cerca de 16 horas.
- iii. Sedimente as células em uma centrífuga de bancada à velocidade máxima por 15 minutos, e descarte o sobrenadante.
- iv. Adicione 1 ml de solução tampão TES, vortex para ressuspender o sedimento, transfira a suspensão para um tubo da micro centrífuga e sedimente as células por 2 minutos a 5°C. Descarte o sobrenadante.
- v. Adicione 180 µl de meio de sacarose e vortex para ressuspender o sedimento. Adicione 20 µl de solução de lisozima, misture manualmente e devagar (não use um misturador vortex) e incube a 37°C por 60 minutos.
- vi. Adicione 48 µl da solução de NaCl, 12 µl da solução EDTA e 260 µl da solução SDS-NaCl, e lentamente inverta o tubo, duas vezes. Incube a mistura por 10 minutos a 68°C, depois coloque o tubo em gelo por 60 minutos. Centrifugue a 4°C por 15 minutos para sedimentar os detritos da parede celular e transfira 300 µl do sobrenadante para outro tubo de micro centrífuga.
- vii. Adicione 33 µl de solução de acetato de sódio e 680 µl de etanol 100% frio, vortex para misturar e coloque no freezer por  $\geq 1$  hora. Centrifugue a 5°C por 15 minutos, e descarte o sobrenadante.
- viii. Adicione aproximadamente 200 µl de etanol 70% frio, vortex para misturar, depois centrifugue a 5°C por 10 minutos, e descarte o sobrenadante. Seque o sedimento em um secador a vácuo por cerca de 30 minutos. Adicione 200 µl da solução





tampão TES ao sedimento seco, vortex para ressuspendê-lo, deixe a mistura descansar em temperatura ambiente por 15 minutos e depois vortex novamente para misturar.

ix. Adicione 2 µl de solução RNase e 2 µl de solução RNase A, misture e incube a mistura a 37°C por 30 minutos. Adicione 20 µl de solução proteinase e incube a mistura a 37°C por 1 hora.

x. Misture 15 µl da solução amostra com 3 µl do corante rastreador e transfira tudo para um poço no gel de agarose. Inclua uma quantidade adequada do marcador de peso molecular, de acordo com as instruções do fabricante, em um poço adjacente.

xi. Submeta o gel a 50V por cerca de 15 minutos. Desligue a tensão antes de remover o excesso da solução tampão da superfície do gel, depois cubra-o com o filme PVDC. Ajuste a voltagem para liberar uma corrente de 20 mA e deixe ligada no gel ao longo da noite (16-17 horas). Inverta a polaridade da voltagem por 30 segundos imediatamente antes de desligá-la e retirá-la do gel.

xii. Core o gel com a solução de brometo de etídio por 20 minutos, com agitação suave. Descore o gel em solução tampão 1X tris-borato por 20 minutos, trocando a solução tampão 3 vezes durante esse tempo. Coloque o gel sob uma lâmpada UV e fotografe-o. A cepa AM65-52 Bti de plasmídeos deve produzir 5 bandas fluorescentes abaixo do esfregaço cromossômico e, dependendo da qualidade de separação do gel, 1 banda pode aparecer acima do esfregaço cromossômico. Devido a possíveis mudanças de conformação de formas super enroladas à relaxadas do plasmídeo durante a preparação, os tamanhos reais dos plasmídeos são melhor determinadas por comparação no mesmo gel com uma cepa Bt que tenha tamanhos conhecidos de plasmídeos, tais como os padrões de referência Bti HD-1 ou HD-2.

#### Observação 5

#### **Determinação de biopotência**

##### Princípio

A biopotência é medida em unidades tóxicas internacionais (U.T.I.) por mg do produto. A biopotência é testada por comparação da mortalidade das larvas de mosquito produzida pelo produto em teste com a mortalidade produzida por um pó seco de pulverização de referência de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, utilizando larvas de quarto ínstar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora). A toxicidade (U.T.I./mg) dos produtos testados é determinada de acordo com a seguinte fórmula:

U.T.I./mg de produto testado =

$$\frac{\text{padrão de referência U.T.I./mg} \times \text{padrão CL}_{50} \text{ (mg/l)}}{\text{CL}_{50} \text{ (mg/l) de produto testado}}$$

##### Equipamentos e materiais

*Homogeneizador ou agitador top-drive Banho de gelo* (recipiente de gelo picado)

*Balança analítica* (precisão de  $\pm 0,1$  mg)

*Balança analítica de prato único* (precisão de  $\pm 10$  mg), preferivelmente com facilidade de tara.

*Água deionizada*

\* O pó de referência originalmente recomendado pela OMS para esse fim, IPS82 cepa 1884 do Instituto Pasteur, não está mais disponível. Até que um pó de referência internacional substituto seja disponibilizado, um padrão de referência da cepa AM65-52 pode ser obtido da Valent Biosciences Corp. para fins de teste da conformidade do produto com a especificação. Esse padrão de referência da cepa AM65-52 foi calibrado contra IPS82 cepa 1884 e possui uma biopotência de 7992 U.T.I./mg.





*Agente umidificante* (por exemplo, Tween 80)

*Béqueres de 200 ml*, vidro de borosilicato ou plástico

*Frasco de 500 ml*, de boca larga, com tampa de rosca, de vidro transparente

*Frasco de 100 ml*, com tampa de rosca, de vidro transparente

*Micropipeta Pipeta de 10 ml*

*Tubos de 12 ml*, de plástico com rolhas ou tampas.

*Copos de 200 ml*, de plástico ou papel revestido de cera

### **Método**

#### **(i) Produção de larvas de teste**

Larvas L4 representam a sensibilidade total da população alvo e são fáceis de manipular. É muito importante utilizar uma população homogênea de quarto ínstar, que é obtida depois de cinco dias da eclosão dos ovos, por meio de métodos padrão de criação.

Ovos de *Aedes aegypti* são colocados em um copo forrado com papel de filtro e um terço cheio de água deionizada. O papel é secado em temperatura ambiente e mantido por vários meses armazenado em um saco plástico selado em temperatura ambiente. Quando as larvas são necessárias, o papel é imerso na água sem cloro. Para sincronizar a eclosão, adicione alimento de larva na água 24 horas antes de adicionar os ovos. O crescimento bacteriano vai desoxigenar a água e isso provoca a eclosão dos ovos. Isso normalmente induz os primeiros ínstars a eclodir dentro de 12 horas. Depois, essas larvas são transferidas para um recipiente (25 x 25 x 10 cm) contendo 2 litros de água sem cloro, para obter uma população de 500 a 700 larvas por recipiente. O alimento para as larvas deve ser flocos de proteína, como utilizado para peixes de aquário, ou pó de biscoito de gato, e os recipientes devem ser mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . É importante que a quantidade de alimento seja pouca para evitar forte crescimento bacteriano que mate as larvas. O ideal é alimentar várias vezes, com 1 ou 2 dias de intervalo, e observar diariamente. Caso a água se torne turva, substitua toda a água, filtrando as larvas e transferindo-as para um recipiente limpo com água limpa e alimento. De cinco a sete dias depois, uma população homogênea de quarto ínstar (5 dias de vida e de 4 a 5 mm de comprimento) deve ser obtida.

#### **(ii) Preparação das suspensões de padrão de referência para calibração do bioensaio**

Antes de preparar a suspensão, verifique que a agitação/mistura do agente umidificante/mistura de água, descrito no parágrafo a seguir, não cause espuma. Caso cause, dilua (por exemplo, 1:10) o agente umidificante antes de usar.

Pese precisamente 50 mg (com aproximação de 0,1 mg) do pó do padrão de referência e coloque-o em um béquer de 200 ml com 100 ml de água deionizada (ele pode ser transferido diretamente ao frasco de 500 ml caso a boca seja grande o bastante para receber a cabeça do agitador/misturador). Deixe a mistura descansar por 30 minutos e adicione uma gota (cerca de 0,2 mg) do agente umidificante. Coloque o béquer no banho de gelo e agite ou misture a mistura por 2 minutos. Verifique visualmente se ainda existem partículas grandes e repita a agitação/mistura caso ainda existam. Pese ou tare o frasco de 500 ml e transfira a suspensão/solução para ele, lavando completa e cuidadosamente o béquer e o agitador/misturador. Adicione mais água deionizada para fazer com que o peso do conteúdo chegue a 500 g (500 ml), tampe o frasco e agite vigorosamente para misturar o conteúdo. Confirme, por análise microscópica de uma pequena alíquota, se agregados de esporos e cristais ainda persistem. Caso haja, o conteúdo deve passar por mais agitação/mistura no banho de gelo. Essa



suspensão/solução primária contém 1 mg/10 ml e deve ser agitada vigorosamente logo antes de remover alíquotas.

Transfira 10 ml de alíquotas da suspensão/solução primária para tubos limpos de 12 ml que sejam tampados/fechados imediatamente. Caso esteja transferindo várias alíquotas, tampe e agite a suspensão/solução primária em intervalos de não mais que 3 minutos, porque os esporos e cristais assentam rapidamente na água. As alíquotas podem ser armazenadas por um mês a 4°C e por dois anos em um freezer a -18°C. Cada um contém 1 mg do pó padrão.

Para preparar uma “solução mãe”, pese ou tare um frasco de 100 ml. Transfira uma das alíquotas de 10 ml para um frasco de 100 ml, lavando-o cuidadosamente, pelo menos duas vezes, com água deionizada, e complete até atingir 100 g. Agite vigorosamente a mistura (ou use o misturador) para produzir uma suspensão homogênea. Alíquotas congeladas devem ser totalmente homogeneizadas antes de usar, porque as partículas se aglomeram durante o congelamento. A “solução mãe” contém 10 mg/l.

A partir da “solução mãe”, diluições subsequentes são preparadas diretamente em copos de plástico cheios (por pesagem) com 150 ml de água deionizada. Para cada copo, 25 larvas L4 de *Aedes aegypti* são adicionadas primeiro por meio de uma pipeta de Pasteur, antes da adição das suspensões bacterianas. O volume de água adicionado com as larvas é removido do copo (por pesagem) e descartado, para evitar mudança do volume de líquido no copo. Por meio de micropipetas, 600 µl, 450 µl, 300 µl, 150 µl, 120 µl e 75 µl de “solução mãe” são adicionados a copos separados e as soluções misturadas para produzir concentrações finais de 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 e 0,005 mg/l, respectivamente, do pó de padrão de referência. Quatro copos replicados são utilizados para cada concentração e um para controle, que contém apenas 150 ml de água deionizada.

#### (iii) Preparação de suspensões do produto a ser testado

Pese a quantidade desejada da amostra granular e coloque a amostra em um frasco de vidro contendo 100 ml da solução Tween 0,2%. Coloque o frasco da amostra em um agitador manual e agite o frasco da amostra por, no mínimo, 20 minutos. Realize a diluição subsequente da mesma maneira descrita acima para o pó de padrão de referência, com a diferença que as determinações de replicatas devem ser feitas sobre diluições preparadas por pesagem de porções de teste separadas do produto. Ou seja, quatro replicatas da suspensão/solução primária devem ser preparadas. Copos e larvas são preparados conforme descrito acima e diluições comparáveis são preparadas para o padrão de referência.

#### (iv) Determinação da toxicidade

Nenhum alimento é adicionado para as larvas de *Aedes*. Todos os testes devem ser conduzidos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com um ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Para evitar efeitos adversos de evaporação da água em baixa umidade, a umidade relativa deve ser mantida em  $50 \pm 15\%$ , se possível.

Cada série de bioensaio deve, de preferência, envolver 6 concentrações x 4 replicatas x 25 larvas para o padrão de referência e o desconhecido, e 100 larvas para o controle. O objetivo é identificar a faixa de concentrações que causam de 5 a 95% de mortalidade (porque 100 larvas são usadas). Dados que apresentam 0 ou 100% de mortalidade são ignorados para o cálculo de  $CL_{50}$ . Para preparar uma curva de dose-resposta válida, apenas concentrações que apresentam mortalidade entre 95 e 5% devem ser usadas. Dentro dessa faixa, um mínimo de duas concentrações deve estar acima da  $CL_{50}$  e duas abaixo, para garantir a validade do valor de  $CL_{50}$  (a sensibilidade da colônia do inseto pode exigir que uma série um pouco diferente de 6 diluições seja usada).





A mortalidade é determinada em 24 e 48 horas, por meio de contagem das larvas vivas remanescentes. Caso ocorra pupação, as pupas devem ser removidas e seus números excluídos dos cálculos. Caso mais de 5% das larvas entre na fase de pupa, o teste é invalidado, porque as larvas não ingerem 24 horas antes da pupação e muitas larvas podem ter sobrevivido simplesmente porque eram muito velhas. Por causa da rápida ação de morte de Bti, normalmente não há diferença entre a mortalidade de 24 e 48 horas. Nesse caso, a contagem de 48 horas confirma a leitura de 24 horas e proporciona uma verificação sobre a possível influência de fatores que não façam parte dos componentes de Bti.

Caso a mortalidade no controle exceda 5%, as mortalidades dos grupos tratados devem ser corrigidas de acordo com a fórmula de Abbott [Abbott, W. S., (1925). *A method for computing the effectiveness of an insecticide* [Um método para computar a eficácia de um inseticida]. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265-267]:

$$\text{porcentagem (\%)} \text{ controle} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

onde: X = % de sobrevivência no controle não tratado; Y = % de sobrevivência na amostra tratada.

Testes com uma mortalidade no controle maior que 10%, ou com alguma pupação maior que 5%, devem ser descartados. Linhas de regressão mortalidade-concentração podem ser desenhadas em papel gaussiano-logarítmico, mas isso é bastante subjetivo. É preferível utilizar um programa estatístico, tal como SAS, que incorpora Análise Log-Probit. Com tal programa tão estatístico, a fórmula de Abbott não é necessária porque a correção é automaticamente realizada pelo programa. A toxicidade é determinada pela estimativa e comparação da CL<sub>50</sub> do produto testado com as preparações do padrão de referência, por meio da fórmula descrita acima. A toxicidade é definida pela contagem em 24 horas após o início do teste.

Para mais precisão, os bioensaios devem ser repetidos em, pelo menos, três dias diferentes, concomitantemente com o ensaio do padrão de referência, e o desvio padrão dos meios calculados. Uma série de testes é válida caso um desvio padrão relativo (DPR) seja < 25%.

#### Observação 6

Demonstrou-se que beta-exotoxina (um nucleotídeo termoestável composto de adenina, glicose e ácido Allaric) não ocorre nos produtos do fabricante identificado no relatório de avaliação 770/2006, e é improvável que sua presença ocorra naturalmente. No entanto, beta-exotoxina pode ser gerada por algumas cepas de *Bacillus thuringiensis* e, caso detectável pelo método de Bond *et al.*\*, deve ser designada como impureza relevante e uma cláusula seria necessária para limitar sua concentração.

#### Observação 8

### **Enumeração e Identificação de *Staphylococcus aureus***

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1%*, ou equivalente

*Placas de ágar estéreis e com meio pronto Baird-Parker (Difco 0768-01-1, BBL 11023, ou equivalente), suplementadas com enriquecimento de gema de ovo telurito (Difco 0779-73-1 ou equivalente).*

*Plasma de mamífero (plasma coagulase de coelho, liofilizado, BBL 40658 ou equivalente)*





*Frascos estéreis, tampados, de pelo menos 100 ml*

*Tubos de ensaio estéreis*

### **Procedimento**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1% (pré-aquecido a NMT 45°C). Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação.

Em duplicata, transfira 1 ml da suspensão (0,1 g de GR) para a superfície das placas de ágar. Espalhe o inóculo uniformemente sobre a superfície e deixe que afunde na superfície do ágar. Cubra, inverta e incube as placas por 21-26 horas antes de examiná-las.

*S. aureus* forma colônias pretas, brilhantes e convexas cercadas por uma área clara no ágar Baird-Parker. Caso o resultado seja negativo para *Staphylococcus*, incube as placas por mais 24 horas e leia novamente. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

### **Testes confirmatórios**

i. Realize marcação gram em uma colônia tipicamente suspeita de cada placa. *S. aureus* são cocos gram positivos que ocorrem em aglomerados. Caso as células não se encaixem nessa descrição, *S. aureus* pode ser considerado ausente da amostra. No entanto, caso as células se encaixem na descrição, realize o teste a seguir.

ii. Teste de coagulase. Utilizando uma alça de inoculação estéril, transfira uma porção da colônia tipicamente suspeita para um tubo de ensaio estéril com 0,5 ml de plasma de mamífero, e agite para misturar. Conduza o teste em paralelo com controles positivo e negativo. Coloque os tubos na incubadora, examine-os após 3 horas e depois em intervalos adequados por um total de 24 horas. Os controles positivo e negativo devem mostrar coagulação e não coagulação, respectivamente. Caso o teste da colônia suspeita não mostre coagulação visível, pode-se concluir que não há coagulase positiva de *S. aureus*.

### **Observação 8**

### **Deteção de espécies de *Salmonella***

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1%*, ou equivalente

\* Bond R.P.M., et al. *The thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis* [A exotoxina termoestável de *Bacillus thuringiensis*]. In: Burges H. D. and Hussey N. W., eds. *Microbial control of insects and mites* [Controle microbiano de insetos e ácaros]. Academic Press, London, 1971.

*Caldo de selenito-cistina*, tubos de ensaio de 10 ml com tampa (Difco 0687, BBL 11606, ou equivalente)

*Placa de ágar verde brilhante com meio pronto*, (Difco 0014, BBL 11073, ou equivalente)

*Placa de ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) com meio pronto, estéril*, (Difco 0788, BBL 11838, k)

*Placa de ágar sulfito de bismuto com meio pronto, estéril* (Difco 0073, BBL 11031, ou equivalente).



*Tubo inclinado pré-preparado, estéril, contendo aproximadamente 10 ml de ágar triplice açúcar ferro (Difco 0265, BBL 11749, ou equivalente).*

*Solução verde brilhante, USP (1:1000 solução aquosa preparada e armazenada a 2-8°C)*

*Solução de iodo-iodeto, USP (Dissolva 5 de iodeto de potássio e 6 g de iodo em 20 ml de água purificada USP; armazene a 2-8°C)*

*Caldo fluido tetratationato , (Difco 0104, BBL 11705, ou equivalente comercialmente preparado), 10 ml em tubos de ensaio tampados. Para cada tubo de 10 ml de caldo tetratationato, adicione 0,1 ml da solução verde brilhante preparada; misture, depois adicione 0,2 ml da solução iodo-iodeto preparada. Misture.*

### **Procedimento**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1% (pré-aquecido a NMT 45°C). Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação e incube por 24 horas.

Transfira porções de 1 ml (0,1 g de GR) da cultura incubada para dois tubos separados que contenham, respectivamente, 10 ml de caldo selenito cistina e 10 ml de caldo fluido tetratationato contendo solução iodo-iodeto e solução verde brilhante. Misture e incube os tubos inoculados por 18-24 horas.

Utilizando uma alça de inoculação, passe porções dos tubos de tetratationato e selenito cistina incubados em placas separadas de ágar verde brilhante, ágar XLD e ágar sulfito de bismuto. Cubra, inverta e incube as placas por 18-24 horas, ou por até 48 horas no caso de ágar sulfito de bismuto, antes de examiná-las.

As colônias de *Salmonella* exibem as características a seguir.

Ágar verde brilhante - colônias pequenas, transparentes e sem cor, ou cor-de-rosa/branco opaco, colônias cercadas por uma área cor-de-rosa a vermelha.

Ágar XLD - colônias vermelhas, com ou sem centros pretos. Ágar sulfito de bismuto - colônias pretas metálicas ou verde escuras.

Caso nenhuma das colônias se encaixe nessas descrições, a amostra atende à exigência de estar livre de espécies de *Salmonella*. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

### **Testes confirmatórios**

i. Caso colônias que se encaixam em qualquer uma das descrições acima sejam encontradas, realize uma coloração de Gram no material retirado delas. As espécies de *Salmonella* são bacilos Gram negativos. Caso as células se encaixem na descrição, prossiga para o teste confirmatório (ii), abaixo.

ii. Com uma alça ou agulha de inoculação, transfira material das colônias suspeitas para um tubo inclinado contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI). Primeiro, perfure a superfície com a agulha/alça, depois esfregue a inclinação. Incube o(s) tubo(s) por 12-24 horas. As espécies de *Salmonella* normalmente fermentam a glicose com a produção de ácido, e algumas espécies também produzem gás e H<sub>2</sub>S (Tabela 1).

O tubo, caso positivo para *Salmonella*, apresentará uma inclinação alcalina (vermelha) e um fundo ácido (amarelo), com ou sem o escurecimento do fundo devido à produção de H<sub>2</sub>S. Caso a presença de *Salmonella* seja indicada, prossiga para a identificação do organismo por meio de aplicação do sistema de identificação automática microbiana Vitek/Vitek2, outro sistema de identificação aprovado, ou por meio da realização de reações bioquímicas ou de cultura adequadas.

Tabela 1. Reações observadas no ágar TSI

Reação	Explicação
--------	------------





Fundo ácido (amarelo), inclinação alcalina (vermelha)	Glicose fermentada
Ácido em todo o meio, fundo e inclinação amarelos	Lactose ou sacarose, ou ambas, fermentadas
Bolha de gás no fundo, meio às vezes dividido	Cultura aerogênica
Escurecimento no fundo	Sulfeto de hidrogênio produzido
Fundo e inclinação alcalinos (meio totalmente vermelho)	Nenhum dos três açúcares fermentado

#### Observação 9

#### Enumeração e Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

##### Equipamentos e materiais

Balança, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$

Incubadora, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

Papeis de filtro.

Solução tampão de fosfato estéril, pH 7,2 (USP ou equivalente) com Tween-80 1%, ou equivalente.

Placas de ágar cetrímide com meio pronto, estéreis, (ágar BBL 11554-pseudosel, ou equivalente).

Dicloridrato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina.

Reagente oxidase, (DrySlide® BBL 231746, ou equivalente).

##### Procedimento

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de solução tampão de fosfato estéril USP com Tween-80 1% (pré-aquecida a NMT 45°C). Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação.

Em duplicata, transfira porções de 1 ml (0,1 g de GR) da suspensão para a superfície das placas de ágar cetrímide. Espalhe o inóculo uniformemente sobre a superfície das placas, cubra e deixe que afunde na superfície. Inverta e incube as placas por 48-72 horas antes de examiná-las.

*P. aeruginosa* forma colônias características azuladas e esverdeadas. Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios.

##### Testes confirmatórios

i. Realize a coloração de Gram. Células de *P. aeruginosa* são bacilos Gram negativos delgados.

ii. Realize um teste de oxidase.

Ou

Utilizando uma alça de fio de platina ou uma espátula de madeira estéril, transfira uma porção da colônia suspeita para uma área de reação oxidase DrySlide®. Espalhe o inóculo na área de reação em um tamanho de 3 a 4 mm. Examine a área de reação depois de 20 segundos. Reação positiva: os organismos produzem uma coloração roxa ou escura dentro de 20 segundos. Reação negativa: os organismos não produzem nenhuma mudança de cor, ou mudam para cinza claro, dentro de 20 segundos.

Ou

Utilize papel de filtro impregnado com Dicloridrato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina ou umedecido com uma gota de reagente oxidase. Concomitantemente, realize o teste





em uma cultura de referência *P. aeruginosa*, como controle positivo. Caso uma coloração roxa não se desenvolva dentro de 30 segundos, o resultado é negativo.

iii. Caso seja necessário, confirmação adicional pode ser obtida por meio de testes bioquímicos ou de cultura adequados para a identificação de bacilos oxidase-positivos, Gram-negativos e não fermentadores.

#### Observação 10

**Enumeração de *Escherichia coli*** (método de contagem em placas “pour plate”)

#### **Equipamentos e materiais**

*Balança*, com tara, capaz de pesar 10 g de  $\pm 1\%$ .

*Incubadora*, controlada dentro da faixa de 35-37°C.

*Fonte de luz UV de comprimento de onda longo*.

*Caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1%*, ou equivalente

*Ágar vermelho violeta bile com 4-metil-umbelifenil- $\beta$ -D-glicuronídeo* (ágar VRB com MUG) (Difco 229100 ou equivalente).

*Placas de Petri estéreis*.

#### **Método**

Observe as precauções de assepsia e manuseio durante todo o processo.

Abra o saco que contém a formulação e transfira 10 g para 90 ml de caldo digestão caseína de soja com Tween-20 1% (pré-aquecido a NMT 45°C). Misture bem para desintegrar e dispersar a formulação. Caso necessário, dilua ainda mais com solução tampão de fosfato estéril, misturando completamente, para que 1 ml renda não mais que 300 colônias. Em duplicata, transfira 1 ml da suspensão (0,1 g de GR, caso a suspensão não tenha sido diluída ainda mais) para cada uma de duas placas estéreis. Adicione a cada placa aproximadamente 15-20 ml de ágar VRB com MUG, que tenha sido resfriado até cerca de 45°C.

Cubra as placas de Petri, misture a suspensão com o ágar por meio de rotação das placas em uma direção e depois na direção oposta. Deixe que o conteúdo solidifique em temperatura ambiente, inverta as placas e incube a 35-37°C por 20-24 horas.

Examine as placas para verificar crescimento no escuro e, utilizando a fonte de luz UV, para verificar colônias fluorescentes. Cepas típicas de *E. coli* (colônias vermelhas cercadas por precipitado de bile) exibem um halo fluorescente azulado (MUG-positivo). Resultados aparentemente positivos devem ser submetidos a testes confirmatórios. Caso seja confirmada como *E. coli*, conte o número de colônias MUG-positivas e calcule a contagem média para as duas placas. Não conte as colônias de coliformes que não são *E. coli*, que também podem produzir colônias vermelhas com precipitado de bile, mas são MUG-negativas.

#### **Testes confirmatórios**

i. Colônias que são presumivelmente de *E. coli* devem ser confirmadas por meio do sistema de identificação automática microbiana Vitek ou por meio de realização de outros testes bioquímicos ou de cultura adequados para confirmar a presença de *E. coli*.

#### Observação 11

A medição de pulverulência deve ser realizada sobre a amostra “conforme recebida” e, quando praticável, a amostra deve ser coletada do recipiente recentemente aberto, porque mudanças no teor de água das amostras podem influenciar de maneira significativa a pulverulência. O método óptico, MT 171.2, normalmente mostra boa correlação com o método gravimétrico, MT 171.1, e pode, portanto, ser usado como alternativa quando o equipamento estiver disponível. Quando a correlação estiver em



dúvida, ela pode ser verificada com a formulação a ser testada. Em caso de contestação, o método gravimétrico deve ser usado.

#### Observação 12

Testes para verificar contaminantes bacterianos (cláusulas 4.1-4.4) não são especificados após o armazenamento do produto por 14 dias a 54°C, porque é improvável que esse regime revele a extensão da proliferação potencial que pode ocorrer em condições normais de armazenamento.

#### Observação 13

Amostras representando “antes” e “depois” do teste de estabilidade no armazenamento devem ser testadas concomitantemente após o teste, a fim de minimizar a variação que ocorre em ensaios da biopotência. Materiais para a amostra do teste de “antes” devem ser armazenados em recipientes lacrados a 2-8°C, pela duração do teste, antes do bioensaio.

Caso o recipiente esteja armazenado para esse fim em um refrigerador ou freezer, ele deve ser equilibrado a temperatura ambiente e secado externamente antes de aberto, para evitar contaminar os grânulos com umidade atmosférica, o que poderia afetar os resultados dos testes, tais como biopotência e pulverulência.

### **SEGUNDA PARTE RELATÓRIOS DE AVALIAÇÃO**

#### ***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis cepa AM65-52***

	Página
<b>2011</b>	
<b>Relatório de Avaliação FAO/OMS</b> com base na apresentação dos dados da Valent Biosciences (GR)	<b>33</b>
<b>Anexo 1:</b> Referências	<b>35</b>
<b>2006</b>	
<b>Relatório de Avaliação FAO/OMS</b> com base na apresentação dos dados da Valent Biosciences (WG)	<b>36</b>
<b>Informações de apoio</b>	<b>40</b>
<b>Anexo 1:</b> Resumo de riscos fornecido pelo proponente	<b>46</b>
<b>Anexo 2:</b> Referências	<b>52</b>

### **ESPECIFICAÇÕES E AVALIAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA**

#### ***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis cepa AM65-52***

#### **RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FAO/OMS 770/2012**

#### **Recomendação**

A Reunião recomendou que a nova especificação para grânulos de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) cepa AM65-52, proposta por Valent BioSciences e conforme aditada, deve ser adotada pela OMS.

#### **Lauda**

Os dados foram apresentados em 2010 e estavam amplamente de acordo com as exigências da revisão de 2010 do Manual FAO/OMS e suportava as especificações planejadas para as novas especificações da OMS para formulação granular (GR) de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* cepa AM65-52 (*Bti* AM65-52). O produto é um larvicida bacteriano destinado a ser aplicado diretamente nos habitats de larvas de mosquito em corpos de água abertos, mas o produto não é destinado para uso contra recipientes de reprodução de mosquitos ou para adição à água potável (ver abaixo). O produto foi testado e recomendado pela WHOPES em 2012 (OMS 2012).

#### Identidade, cláusula de descrição





Conforme explicado no relatório de avaliação FAO/OMS de 2006, *Bti* AM65-52 é um larvicida bacteriano que consiste de uma mistura de inclusões cristalinas (proteínas inseticidas), células e esporos da cepa *Bti* AM65-52. *Bti* AM65-52 é produzido em um sistema fechado e o complexo do ingrediente ativo não é isolado. Portanto, não se pode fazer referência a TC ou TK propriamente ditos na cláusula de descrição. A cláusula de descrição faz referência à aplicação de grânulos por máquina, enquanto que *Bti* AM65-52 na formulação GR pode ser aplicado tanto por máquina quanto manualmente.

*Testes de identidade, teor do ingrediente ativo, água como impureza relevante e contaminantes bacterianos*

Os testes de identidade são baseados em uma série de testes cada vez mais complexos, a começar por uma simples análise microscópica até os mais exigentes testes de eletroforese, e são os mesmos que são realizados para a formulação WG.

O teor de ingrediente ativo ou a biopotência de *Bti* AM65-52 GR é 200 U.T.I./mg e é determinado por meio do teste de toxicidade *in vitro* das larvas de 4º instar de *Aedes aegypti*.

Assim como na formulação WG, água foi proposta e aceita como impureza relevante, uma vez que estando presente em quantidades maiores pode desestabilizar *Bti* AM65-52.

A Reunião concluiu que os patógenos humanos no produto de uso final *Bti* AM65-52 são considerados impurezas relevantes, o que pode aumentar ou estender o risco do produto e, portanto, tem de ser limitados a um determinado nível.

A ausência de três diferentes patógenos deve ser verificada (sem detecção de espécies de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*) quando amostras do produto são examinadas por técnicas microbiológicas clássicas sobre meio seletivo e contagem de colônias. Toleram-se um máximo de 100 unidades formadoras de colônia para *Escherichia coli*.

Propriedades físicas e estabilidade no armazenamento

As cláusulas, limites e métodos de teste propostos para propriedades físicas do GR estavam de acordo com as exigências do Manual (FAO/OMS, 2010), com um pequeno desvio: os resultados da distribuição de tamanho de partículas utilizando MT 170 foram expressados em malha em vez de  $\mu\text{m}$ , o que foi mais tarde corrigido. A formulação é quase isenta de pó, mas o limite para resistência ao atrito de 97% foi considerado um tanto baixo e questionado pela Reunião. O fabricante explicou que os grânulos são bastante macios para garantir uma liberação rápida de *Bti*, cepa AM65-52 dos grânulos, o que foi aceito pela Reunião. A biopotência após estabilidade de armazenamento acelerada mostra uma diminuição mais pronunciada na formulação GR (um mínimo de 70% permanecendo após 2 semanas a 54°C) em comparação com 84% na formulação WG. O fabricante explicou que a formulação GR possui uma composição diferente do que a formulação WG e aparentemente a diminuição na biopotência está relacionada a algumas atividades catalíticas de adjuvantes sobre as proteínas inseticidas. A Reunião aceitou a explicação.

Assim como com a formulação WG, não se espera que os contaminantes bacterianos aumentem no armazenamento, portanto a cláusula para limitar a ocorrência de *E. coli* após o armazenamento foi considerada desnecessária.

Propriedades físicas da formulação WG

A Reunião também concordou em atualizar na especificação da formulação WG os métodos CIPAC para algumas propriedades físicas (teste de peneiramento a úmido - MT 185 em vez de MT 167 e capacidade de suspensão - MT 184 em vez de MT 168), para ficar de acordo com a diretriz de especificação WG de novembro de 2010 -





segunda revisão da primeira edição do Manual FAO/OMS e dos métodos CIPAC realmente recomendados.

## ESPECIFICAÇÕES E AVALIAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA

### ***Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52**

#### RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FAO/OMS 770/2006

#### **Recomendação**

A Reunião recomendou que:

- (i) a especificação para *Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* (Bti) cepa AM65-52, grânulos dispersíveis em água (WG), proposta por Valent BioSciences Corp. e conforme aditada, deve ser adotada pela OMS;
- (ii) um novo material de referência de Bti validado internacionalmente deve ser desenvolvido para apoiar a especificação da OMS para Bti.

#### **Lauda**

Os dados de *Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* cepa AM65-52 (Bti AM65-52) foram avaliados para apoiar uma nova especificação OMS para a formulação WG.

O projeto da especificação e os dados de apoio foram fornecidos pela Valent Biosciences Corp., EUA, pelo período de 2003-2006, durante o qual diversos aspectos da especificação e dos métodos de teste de apoio foram elaborados.

Bti AM65-52 é um larvicida bacteriano para o controle de mosquitos, sendo a cepa originalmente isolada da população natural de *Bacillus thuringiensis*.

Bti AM65-52 não é patenteado.

Muitos dos parâmetros físico-químicos utilizados para caracterizar produtos químicos naturais e sintéticos são inadequados para microrganismos, tais como Bti, mas os princípios que fundamentam as especificações da FAO e da OMS para pesticidas permanecem aplicáveis a produtos baseados em organismos vivos.

Bti AM65-52 WG é formulado a partir do ingrediente ativo em um sistema fechado, sem nenhum isolamento do produto técnico, e por isso uma especificação do ingrediente ativo de grau técnico correspondente não foi proposto e nem seria prático. Dados de apoio sobre riscos, produzidos por meio de Bti A65-52 de grau técnico especialmente preparado, foram fornecidos pelo fabricante e a Reunião concordou que, nesse caso, uma especificação poderia ser desenvolvida para a formulação WG na ausência de uma especificação para o ingrediente ativo de grau técnico. A Reunião observou que uma especificação poderia ser subsequentemente desenvolvida para Bti AM65-52 de grau técnico, caso necessário.

Um resumo das informações técnicas confidenciais sobre o processo de fabricação, dados das análises de 5 lotes e a especificação de fabricação foram fornecidos à OMS. A caracterização química completa dos lotes de Bt não foi possível nem adequada e, portanto, balanços de massa não puderam ser estimados. Apenas informações gerais foram fornecidas sobre os produtos naturais complexos utilizados para cultivar Bti, mas o fabricante submeteu os constituintes a verificações de qualidade (detalhes não foram fornecidos) e a Reunião considerou que seria improvável que as impurezas introduzidas a partir dessa fonte fossem motivo de preocupação. Embora uma comparação detalhada não possa ser realizada por razões administrativas, a EPA US confirmou que os dados fornecidos à OMS estavam alinhados com aqueles submetidos para registro nos EUA.

OMS/PCS informou que os dados sobre risco de Bti AM65-52 estavam de acordo com muitos outros dados publicados sobre Bti e produtos à base de Bti e, portanto, não eram



motivo de preocupação. A Reunião observou a ausência de dados sobre mutagenicidade de Bti AM65-52.

O fabricante declarou que a ausência de exotoxina ou outros componentes de Bti que sabidamente se ligam ao DNA levou autoridades regulatórias (UE, diretiva 2001/36/EC; PMRA Canadá 2001, Diretrizes para o Registro de Agentes e Produtos para Controle de Pragas Microbianas) a decidir que testes de genotoxicidade não são necessários para Bti AM65-52.

A EPA US e o IPCS também concluíram que, com exceção de irritação dérmica da pele e dos olhos, nenhum dos estudos sobre riscos de Bt demonstrou qualquer risco claro à saúde humana, mesmo quando ele está presente na água potável ou nos alimentos. Em um teste padrão para a avaliação de sensibilidade da pele por produtos químicos, registrou-se uma resposta positiva. A Reunião concordou que o pacote de dados de risco fornecido foi suficiente para a avaliação.

#### *Cláusula de descrição e observação do cabeçalho*

Conforme indicado acima, a cláusula de descrição não pode fazer referência a um ingrediente ativo de grau técnico correspondente, porque este não é isolado. Por essa razão, não se pode aplicar a nota de cabeçalho padrão revisada (2006) para as especificações da formulação FAO/OMS (que não seja uma formulação de liberação lenta), que permite que qualquer formulador utilizando TC/TK da fonte avaliada utilize a especificação. Portanto, a nota de cabeçalho anterior, restringindo a aplicação à formulação avaliada, foi mantida.

A cláusula de descrição padrão também foi adotada para refletir o fato de que a formulação WG seja aplicada diretamente a um corpo de água ou dispersada em água para aplicação por pulverização.

#### *Identificação e quantificação*

Os esporos de AM65-52 na formulação WG não são inativados e, uma vez que a proliferação das células de Bti pode exercer um papel secundário na atividade biológica, a Reunião concordou que o ingrediente ativo deve ser definido como a mistura de inclusões cristalinas (proteínas inseticidas), células e esporos da cepa AM65-52 de Bti.

A identificação do ingrediente ativo é problemática. A análise microscópica das células pode estabelecer se elas pertencem ao amplo grupo de bactérias em forma de bacilos móveis e Gram positivos. De forma similar, a presença de esporos e cristais de proteína pode sugerir que as bactérias sejam Bti. Portanto, a análise microscópica proporciona uma triagem inicial simples e rápida para identificação. Bti pode ser identificado pelo antígeno flagelar (H-14), mas, infelizmente, anticorpos específicos bem caracterizados (ou antissoros) não estão disponíveis comercialmente, e o fabricante não foi capaz de fornecê-los para o teste de rotina.

A produção de tais anticorpos está além da capacidade da maioria dos laboratórios de teste, mas, caso disponível, eles podem ser usados para confirmar a presença de Bti. A cepa AM65-52 de Bti é melhor identificada por SDS-PAGE das proteínas de cristais produzidas e/ou por agarose GE do DNA plasmídico que codifica as proteínas. Os dois métodos de teste são bem estabelecidos e amplamente utilizados em diversas aplicações semelhantes.

As células e os esporos Bti são componentes necessários do ingrediente ativo, mas o número de células e/ou esporos Bti não é necessariamente um bom indicador da atividade larvívora de qualquer produto à base de Bt. Portanto, a Reunião concordou que especificar um teor mínimo para células ou esporos não é necessário nem adequado para a formulação WG. O IPCS concluiu (IPCS 1999) que os esporos e células Bti não apresentam riscos significativos aos usuários ou ao meio ambiente e, portanto, a





Reunião concordou que não é necessário especificar valores máximos para o teor na formulação WG.

O teor de proteínas de cristal inseticida pode ser determinado por HPLC. No entanto, bioensaio, utilizando larvas de mosquito “padronizadas”, é geralmente aceito como o meio mais confiável de se estabelecer o teor do ingrediente ativo. O bioensaio é um teste padrão da OMS, mas, infelizmente, o material de referência Bti recomendado pela OMS para calibração (IPS82 cepa 1884) não está mais disponível. A Valent Biosciences Corp. propôs que a empresa deveria disponibilizar um padrão de referência da cepa AM65-52 para fins de teste da conformidade do produto com a especificação da OMS. Esse padrão de referência da cepa AM65-52 (lote nº 82-691w5) foi calibrado pela empresa contra IPS82 cepa 1884 e possui uma biopotência de 7992 U.T.I./mg. A Reunião reconheceu que o padrão de referência da empresa não foi calibrado e avaliado independentemente, mas considerou-se que, até que um pó Bti de referência internacional substituto seja disponibilizado, o padrão de referência da Valent BioSciences deve ser utilizado para testar a conformidade com a especificação.

#### *Impurezas relevantes*

A Reunião concordou que o controle do teor de água na formulação WG é essencial para a manutenção da qualidade do produto, e aceitou o limite proposto de 50 g/kg. O método de teste é um método CIPAC padrão.

Beta-exotoxina foi inicialmente proposta como impureza relevante, mas, sendo produzida apenas por algumas outras cepas Bt, não deve ocorrer em culturas puras de Bti. O fabricante declarou que a formulação WG de Bti AM65-52 em consideração é regularmente testada quanto à presença de beta-exotoxina, mas que ela nunca foi detectada. Portanto, a Reunião concordou que ela não deve ser designada como impureza relevante, mas que uma nota de rodapé deve ser inserida na especificação avisando que, caso beta-exotoxina seja detectável em produtos superficialmente semelhantes de outros fabricantes, ela deve ser considerada uma impureza relevante em tais produtos. Um método padrão está disponível para o ensaio de beta-exotoxina.

#### *Contaminantes bacterianos*

A Reunião buscou o conselho da OMS/PCS sobre as cláusulas de especificação para limitar contaminantes bacterianos (ou seja, bactérias que não sejam AM65-52), para resolver diversas questões. Ao contrário da maioria dos pesticidas formulados sinteticamente, a formulação WG de Bti AM65-52 forma um meio no qual, na presença de água, diversas bactérias podem se proliferar. Taxas de proliferação seriam altamente dependentes das condições locais, e, portanto, impossíveis de prever em qualquer aplicação em particular, mas a formulação WG é destinada para uso em fontes de água potável.

Embora se possa argumentar que os próprios usuários também são fontes prováveis de contaminação bacteriana, a WHO/PCS informou que bactérias patogênicas importantes devem ser controladas em qualquer produto que possa ser adicionado à água potável.

Em termos de espécies a serem controladas, o fabricante propôs inicialmente cláusulas para *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, espécies de *Salmonella* e enterococos totais. A OMS/PCS considerou que cláusulas para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e espécies de *Salmonella* são essenciais. A OMS/PCS também considerou que uma cláusula para *Escherichia coli* também é necessária, dada a alta patogenicidade de determinadas cepas. Uma vez que os coliformes totais e os enterococos totais de *E. coli* proporcionam marcadores adequados de contaminação fecal, o fabricante e a Reunião concordaram que o controle de *E. coli*, somente, seria suficiente para este fim.





A OMS/PCS questionou a desistência subsequente do fabricante quanto à proposta de uma cláusula para *Clostridium perfringens*, mas foi explicado que essa espécie é incapaz de se proliferar no meio utilizado para cultivar Bti AM65-52. Portanto, a Reunião concordou que cláusulas eram necessárias para o controle de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, espécies de *Salmonella* e *Escherichia coli*.

Estabelecer limites adequados para tais contaminantes bacterianos foi particularmente problemático. Os limites da OMS para a presença e quantidade de bactérias na água potável estão disponíveis apenas para *E coli* (como um indicador de contaminação fecal). Naturalmente que, como a formulação WG de Bti AM65-52 não é destinada para consumo direto, é difícil fazer uma comparação com o padrão estabelecido para água potável. Amostragem, a quantidade de testes replicados e o cálculo das concentrações bacterianas também foram pontos em que comparações entre água potável e o uso da formulação WG de Bti AM65-52 se provaram problemáticos.

Por fim, e de forma prática e pragmática, a OMS/PCS, o fabricante e a Reunião concordaram que os limites para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e espécies de *Salmonella* devem estar na forma de "... não detectado quando testado pelo método descrito na nota de rodapé". Para *E coli*, ficou acordado que o limite deve ser "... < 100 UFC/g quando testado pelo método descrito na nota de rodapé". Em cenários de provável uso e exposição, esse limite é, no mínimo, tão rigoroso quanto a diretriz da OMS para qualidade da água potável.

Os métodos de teste para contaminantes bacterianos são essencialmente testes padrão para bactérias.

#### *Propriedades Físicas*

As cláusulas, limites e métodos de teste propostos para propriedades físicas da formulação WG estavam de acordo com as exigências do Manual (FAO/OMS, 2006).

#### *Estabilidade no armazenamento*

O fabricante forneceu dados sobre a estabilidade de Bti AM65-52 na formulação WG armazenado a -18, +20 e +25°C por 6, 12, 18 e 24 meses, mas a Reunião de 2004 concordou que era necessário um teste de estabilidade acelerada no armazenamento.

A Reunião reconheceu que uma simples extrapolação desses dados, utilizando a equação de Arrhenius, seria completamente inadequada para uma mistura tão complexa como a formulação WG de Bti AM65-52, por causa da miríade de reações (em sua maioria) desconhecidas envolvidas na degradação. Portanto, o fabricante conduziu estudos sobre amostras da formulação WG do padrão, dentro da especificação, a 54°C por até 4 semanas, englobando o período padrão de 2 semanas do CIPAC MT 46.3. Após 2 e 4 semanas a 54°C, a potência da formulação WG diminuiu em 15-16% e 21%, respectivamente, embora tenha permanecido acima do mínimo especificado de 2700 U.T.I./mg. Após 1 e 2 semanas a 54°C, as propriedades físicas não foram significativamente alteradas. O fabricante propôs um limite de 84% para retenção da potência após 2 semanas a 54°C, sem mudança nas propriedades físicas, e isso foi aceito pela Reunião.

Com base no conselho recebido da OMS/PCS e pela WHOPES, a Reunião concordou que é mais provável que a bactéria diminua do que se prolifere sob as condições de teste e, portanto, testes para contaminantes bacterianos após o teste de estabilidade no armazenamento podem ser enganosos. Os dados do fabricante não indicaram nenhum aumento nos contaminantes bacterianos durante o armazenamento prolongado de sacos lacrados sob condições normais.

## **INFORMAÇÕES DE APOIO PARA O RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO 770/2006**

### **Visão geral das utilizações**



Inicialmente, produtos à base de Bt convencionais foram direcionados primariamente contra pragas lepidópteras de culturas florestais e de agricultura, mas cepas Bt ativas contra pragas coleópteras estão agora disponíveis. Cepas Bti ativas contra vetores dípteros de doenças parasitas e virais são usadas em programas de saúde pública. Bti AM65-52 é utilizado em aplicações de saúde pública, para controlar as larvas de mosquitos e borrachudos, cujos adultos são vetores de doenças. A atividade de Bti AM65-52 contra as larvas de mosquitos *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Uranotaenia* foi demonstrada há muitos anos (Golberg & Margalit 1977).

Geralmente, as formulações Bt podem ser aplicadas em folhagens, solo, ambientes aquáticos e em unidade de armazenamento de alimentos e água. Formulado como WG, Bti AM65-52 é destinado para o controle de mosquitos em água potável ou não potável e pode ser dispersado em água antes ou depois da aplicação.

A maioria dos produtos à base de Bt, incluindo a formulação WG de Bti AM65-52, contém proteínas cristalinas com ação inseticida e esporos viáveis, mas em determinados produtos à base de Bti os esporos são inativados.

Observou-se resistência aos produtos Bt na agricultura, indicando a necessidade de evitar o uso pesado indiscriminado e adotar boas práticas de gestão de pragas.

### Identidade

#### Nome científico

*Bacillus thuringiensis subespécie israelensis*, cepa AM65-52.

#### Abreviações

Bt: todas as subespécies de *Bacillus thuringiensis*.

Bti: todas as cepas de *Bacillus thuringiensis subespécie israelensis* (sorotipo dos flagelos: H-14).

Bti AM65-52: a cepa à qual o código 770 da CIPAC se aplica e o objeto da presente avaliação.

#### Código numérico CIPAC

770

#### Testes de identidade

- (i) Exame microscópico: bacilos gram-positivos; presença de esporos e inclusões cristalinas parasporais.
- (ii) Análise SDS-PAGE do perfil de peso molecular dos cristais de proteína endotoxina.
- (iii) Análise de agarose-GE do perfil de plasmídeo.

#### Definição do ingrediente ativo

Uma mistura de cristais de proteína de endotoxina livre produzidos por Bti AM65-52 e os esporos e células portadoras.

#### Medição da atividade do ingrediente ativo

Resultados do bioensaio com larvas de 4º instar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora), expressados como unidades tóxicas internacionais (U.T.I.)/mg de produto, relativos a um material de referência Bti. Observação: o único padrão de referência atualmente disponível é a cepa AM65-52, lote nº 82-691-W5, da Valent BioSciences Corp., que possui biopotência de 7992 U.T.I./mg.

#### Visão geral da biologia de Bt (IPCS 1999)

Bt é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, móvel e anaeróbica facultativa encontrada em solos, água, na superfície das folhas em diversas partes do mundo. As subespécies Bt ativa coleópteros e lepidópteros são primariamente associadas com o solo e o filoplano (superfície das folhas), enquanto a subespécie Bt ativa díptero são





comumente encontradas em ambientes aquáticos. Esporos Bt são persistentes no meio ambiente e o crescimento vegetativo ocorre quando as condições são favoráveis e os nutrientes estão disponíveis. Após a aplicação de uma subespécie Bt a um ecossistema, os esporos e as células vegetativas podem persistir, em concentrações cada vez menores, por semanas, meses ou anos como um componente da microflora natural. No entanto, proteínas cristalinas com ação inseticida (ICP) associadas com os esporos são processadas biologicamente inativas dentro de horas ou dias.

Bt é geneticamente semelhante a *Bacillus cereus* (Bc), mas distinguido pela formação das inclusões cristalinas características, adjacente ao endósporo, durante os estágios de esporulação III e IV. As inclusões cristalinas parasporais consistem de uma ou mais proteínas cristalinas com ação inseticida (ICP) que são tóxicas a determinados invertebrados, especialmente espécies de larvas de insetos que pertencem às ordens de insetos Coleoptera, Diptera e Lepidoptera. Os cristais possuem diversos formatos (bipiramidal, cuboide, romboide plano, esférico, ou compostos de dois tipos de cristais), dependendo de sua composição ICP. Os cristais de Bti cepa AM65-52 ocorrem como inclusões irregularmente redondas. A morfologia dos cristais, a composição ICP e a especificidade da atividade contra diferentes espécies de insetos estão amplamente correlacionadas.

A taxonomia fenotípica básica de Bt é as subespécies, das quais muitas foram descritas e são diferenciadas por sorotipo por seus antígenos flagelares (H). A maioria das subespécies utilizadas para controle de pragas foram isoladas dos insetos moribundos. Essas ICP codificadoras de genes estão em sua maioria localizadas nos plasmídeos e são designadas pelo termo *cry* (cristal). Cada ICP é o produto de um único gene *cry*. Os tipos de genes *cry* podem ser específicos para Lepidoptera (*cryI*), Diptera e Lepidoptera (*cryII*), Coleoptera (*cryIII*), Diptera (*cryIV*), ou Coleoptera e Lepidoptera (*cryV*), designados de acordo com a classificação de Höfte & Whiteley<sup>1</sup>.

As ICP de Bti e algumas outras subespécies de Bt também incorporam uma proteína citolítica não específica, cujo(s) gene(s) possui(em) a designação *cyt* (citolítica). Os cristais de Bti cepa AM65-52 contêm 4 proteínas principais designadas como Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa, de acordo com a classificação de Crickmore *et al.* (1998)<sup>2</sup>.

A maioria dos plasmídeos com genes ICP é prontamente transferida por conjugação entre as cepas Bt e pode ser transferida para espécies relacionadas de bactérias. A engenharia genética dos plasmídeos levou ao desenvolvimento de cepas com nova atividade inseticida. Os genes dos plasmídeos também foram geneticamente modificados para plantas, para controle de pragas de plantas por expressão de ICP dentro das células das folhas, mas esses não são considerados nesta avaliação.

<sup>1</sup> Höfte, H. e Whiteley, H.R. (1989) *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis* [Proteínas de cristais inseticidas de *Bacillus thuringiensis*]. Microbiological Reviews **53**: 242-255.

<sup>2</sup> Crickmore *et al.* (1998) *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins* [Revisão da nomenclatura para os cristais de proteína pesticida de *Bacillus thuringiensis*].

*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813. Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, e Cyt1Aa correspondem a *CryIVA*, *CryIVB*, *CryIVD* e *CytA*, respectivamente, de Höfte & Whiteley 1989.

Para controle de insetos, Bt esporulado contendo ICP ou complexos de esporos ICP deve ser ingerido por uma larva de inseto suscetível. A ICP (que é uma protoxina) é solubilizada no mesentério da larva e convertida em toxina biologicamente ativa por enzimas proteolíticas. O terminal C e os domínios médios da toxina ativada se ligam a



receptores de membranas celulares epiteliais específicas no intestino da larva, enquanto que o domínio do terminal N inicia um canal de íon e a formação de poros na membrana, que é seguida por consequente lise da célula. A mistura de conteúdos da hemolinfa e do intestino cria condições favoráveis para a germinação de esporos de Bt e proliferação vegetativa, o que pode resultar em septicemia e contribuir para a causa da morte. A ligação do receptor pela ICP é o principal determinante da especificidade do hospedeiro pelas diferentes ICP de Bt.

Durante o crescimento vegetativo, diversas cepas de Bt são capazes de produzir uma variedade de antibióticos, enzimas, metabolitos secundários e toxinas, incluindo toxinas Bt, que podem ter efeitos prejudiciais sobre organismos alvo e não alvo. De particular interesse é a beta-exotoxina, a qual é associada com determinadas subespécies de Bt (subespécie *darmstadiensis*, Btd; subespécie *galleriae*, Btg; subespécie *tenebrionis*, Btte; e subespécie *thuringiensis*, Btt). Beta-exotoxina é um nucleotídeo termoestável (MW 701) composto de adenina, glucose e ácido Allaric, que inibe a polimerase do RNA ao agir de forma competitiva com ATP. A síntese de RNA é um processo vital em todos os tipos de vida e, portanto, a beta-exotoxina é tóxica para quase todas as formas de vida, inclusive humanos e insetos alvo. A beta-exotoxina não é produzida por culturas puras de Bti.

### Composição e propriedades

**Tabela 1. Composição e propriedades de Bti AM65-52 formulado como WG**

Processo de fabricação, dados sobre componentes, impurezas e contaminantes	Informações confidenciais fornecidas e mantidas em arquivo pela OMS.
Teor mínimo declarado de Bti AM65-52	2700 U.T.I./mg
Impurezas relevantes $\geq 1$ g/kg e limites máximos para elas	Água, 50 g/kg
Impurezas relevantes $< 1$ g/kg e limites máximos para elas	nenhum
Contaminantes microbianos relevantes e limites máximos para eles	<i>Staphylococcus aureus</i> , não detectado Espécies de <i>Salmonella</i> , não detectadas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , não detectado <i>Escherichia coli</i> , não mais que 100 unidades formadoras de colônia/g
Estabilizadores e outros aditivos e limites máximos para eles	nenhuma

### Resumo de riscos

Os testes padrão de toxicidade crônica subaguda, utilizados para produtos químicos sintéticos, não são completamente adequados para pesticidas microbianos, que são primariamente regulados com base em estudos de patogenicidade (por exemplo, PMRA Canadá: DIR 2001-2. UE: Anexo 6b da Diretiva 91/414/CEE). A toxicologia de pesticidas microbianos é considerada, mas patogenicidade potencial, infectividade e padrão de eliminação são tão importantes quanto.

Muitos dados sobre os riscos de Bt e Bti estão disponíveis na bibliografia aberta.

*Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) foi avaliado pelo IPCS (IPCS 1999) e pela EPA US (USEPA, 1998). *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* cepa AM65-52 foi analisado para novo registro pela EPA US em 2006. Essa cepa também está sob análise pela Comissão Europeia, com conclusão prevista para o final de 2008.





As conclusões do IPCS foram as seguintes (IPCS 1999). “Por séculos, os seres humanos foram expostos a Bt em seus habitats naturais, particularmente no solo, água e filoplano. No entanto, na literatura científica registrada, apenas alguns efeitos adversos a esses níveis ambientais de Bt foram documentados. Devido ao seu modo específico de ação, é improvável que os produtos à base de Bt representem algum risco aos seres humanos ou a outros vertebrados ou a grande maioria dos invertebrados não alvo, contanto que estejam livres de microrganismos não Bt e de produtos biologicamente ativos que não sejam ICP. Produtos à base de Bt podem ser utilizados com segurança para o controle de pragas de insetos em culturas agrícolas e hortícolas, assim como em florestas. Bt também é seguro para o uso em ambientes aquáticos, incluindo reservatórios de água potável, para o controle de mosquitos, borrachudos e larvas de insetos incômodos. No entanto, deve-se observar que Bt vegetativo tem o potencial para a produção de toxinas do tipo Bc, cuja significância como causa de doenças em humanos não é conhecida... [, embora]... produtos comerciais à base de Bt não contenham metabolitos que sejam considerados perigosos para seres humanos e para o meio ambiente”.

A OMS e a UE (de acordo com a Diretiva do Conselho 67/548/CEE) não atribuíram uma classificação de risco para Bti. A EPA US isentou Bti de uma exigência para tolerâncias, concluindo que produtos à base de Bt não representam uma ameaça a águas subterrâneas, e também não emitiu restrições sobre o uso de Bt ao redor de corpos de água.

### **Formulações**

O principal tipo de formulação disponível é WG. Bti AM65-52 não é coformulado com outros pesticidas. A formulação WG é registrada e vendida na Argélia, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, México, Nova Zelândia, Singapura, Turquia e nos EUA.

### **Métodos de análise e teste**

O método para determinação do teor de ingrediente ativo é o bioensaio da atividade das larvas de mosquito, que é o método padrão da OMS. Bti é determinado como biopotência, comparando a mortalidade das larvas de mosquito produzida pelo produto em teste com a mortalidade produzida por um padrão de referência. A biopotência é medida em unidades tóxicas internacionais (U.T.I.) por mg do produto. A biopotência de Bti é comparada contra um pó de referência liofilizado dessa espécie de bactéria, utilizando larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora). A toxicidade do primeiro padrão de referência foi originalmente atribuída arbitrariamente uma toxicidade de 15.000 U.T.I./mg de pó contra essa cepa de insetos. O bioensaio fornece informações de apoio na identificação de Bti, devido à especificidade de Bti a Diptera.

A identificação do ingrediente ativo depende de uma série de testes, além do teste quantitativo já mencionado. A análise microscópica é uma triagem inicial rápida e simples para a identificação, utilizada para estabelecer se as células das bactérias são bacilos móveis e Gram positivos, com a presença de esporos e proteínas cristalinas que evidenciam Bti. Em princípio, Bti (mas não a cepa) também pode ser identificado pelo antígeno flagelar (H-14), mas antissoros adequados não estão comercialmente disponíveis no momento.

A cepa AM65-52 de Bti é identificável por SDS-PAGE das proteínas de cristais produzidas e/ou por agarose GE do DNA plasmídico que codifica as proteínas.

Métodos de teste para contaminantes bacterianos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, espécies de *Salmonella* e *Escherichia coli* envolvem técnicas bacteriológicas padrão.

Métodos de teste para a determinação de propriedades físico-químicas da formulação WG foram CIPAC, conforme indicado na especificação.



### Propriedades físicas

As propriedades físicas, os métodos para testá-las e os limites propostos para as formulações WG estão em conformidade com as exigências do manual FAO/OMS (FAO/OMS 2006).

### Recipientes e embalagem

A embalagem deve ser impermeável à umidade e à luz.

### Expressão e medida do ingrediente ativo

O ingrediente ativo, Bti cepa A65-52, é definido como uma mistura de proteínas cristalinas de endotoxina livre e as células Bti portadoras de, e os esporos associados com, os cristais de endotoxina. O teor do ingrediente ativo (biopotência) é medido e expressado em unidades tóxicas internacionais (U.T.I.) por mg do produto. A biopotência é medida por comparação da mortalidade das larvas de mosquito produzida pelo produto em teste com a mortalidade produzida por um pó liofilizado de referência, utilizando larvas de quarto ínstar de *Aedes aegypti* (cepa Bora Bora).

A cepa original de referência (IPS82, Bti cepa 1884, que não está mais disponível) teve uma toxicidade arbitrariamente atribuída de 15.000 U.T.I./mg de pó contra essa cepa de insetos.

Até que um novo material de referência internacional seja disponibilizado para apoiar a especificação da OMS, a Valent Biosciences Corp. se comprometeu em fornecer um padrão de referência da cepa AM65-52 (lote nº 82-691-W5), que possui uma biopotência de 7992 U.T.I./mg.

### ANEXO 1

#### RESUMOS DE RISCOS FORNECIDO PELO PROPONENTE

Observação: A Valent BioSciences Corp. forneceu confirmação por escrito de que dados toxicológicos e ecotoxicológicos incluídos no resumo a seguir foram derivados de Bti AM65-52 técnico tendo perfis de impurezas e contaminantes microbianos correspondentes àqueles da formulação WG, referida na Tabela 2 acima, embora o ingrediente ativo de grau técnico não seja normalmente isolado como tal.

**Tabela A. Perfil de toxicologia do material técnico Bti cepa AM65-52, com base em toxicidade aguda, irritação e sensibilidade.**

Espécies	Teste	Duração e condições ou diretrizes adotadas	Resultado	Referência
Rato, Sprague-Dawley (5 m, 5 f)	Oral aguda	Ratos em jejum, por sonda. US EPA FIFRA, subdivisão F, §81-1 □ U.T.I./mg não registrado*.	DL <sub>50</sub> > 5000 mg/kg de peso corporal. Sem mortalidade, sem efeitos clinicamente significativos ou efeitos sobre o peso corporal, sem tecidos anormais na necropsia.	6314-95-0090-TX-001
Coelho, albino (5 m, 5 f)	Dérmica aguda	US EPA FIFRA, subdivisão F, §81-2 U.T.I./mg não registrado*.	DL <sub>50</sub> > 5000 mg/kg de peso corporal. Sem mortalidade. Fezes moles e coloração anogenital em diversos coelhos, principalmente no dia 0-2, peso	6314-95-0091-TX-001





			corporal não adversamente afetado. Nenhum efeito relacionado ao tratamento em tecidos na necropsia.	
Rato, albino (5 m, 5 f)	Inalação aguda	EPA FIFRA, subdivisão F, §81-3 4 horas de exposição U.T.I./mg não registrado*.	CL <sub>50</sub> > 2,84 mg/l Sem mortalidade, mas com diminuição da atividade, crosta ao redor dos olhos e nariz, e piloereção no dia da exposição. Assintomáticos a partir do dia 1 e peso corporal inalterado pela exposição.	1723-94.
Coelho, albino (3 m, 3 f)	Irritação da pele	EPA FIFRA, subdivisão F, § 81-5 U.T.I./mg não registrado*.	Eritema bem definido em todos os locais de aplicação de 30 a 60 minutos, eritema bem leve a bem definido em todos nos dias 1 a 4, eritema bem leve em um coelho no dia 10 e em dois coelhos no dia 14. Nenhum edema no local da aplicação. Classificado como não irritante.	6314-95- 0093-TX- 001
Coelho, albino (3 m, 3 f)	Irritação dos olhos	EPA FIFRA, subdivisão F §81-4 U.T.I./mg não registrado*.	No grupo sujo, opacidade da córnea em um coelho em 24 horas, sem efeito iridal. Sem efeito iridal e na córnea no grupo limpo. Vermelhidão da conjuntiva, quemose e descarga em 1 hora nos dois grupos. Vermelhidão mínima da conjuntiva persistiu em um coelho de cada grupo até o dia 4, mas não estava presente no dia 7. Classificado como não irritante.	6314-95- 0092-TX- 001



**Tabela A. Perfil de toxicologia do material técnico Bti cepa AM65-52, com base em toxicidade aguda, irritação e sensibilidade.**

Espécies	Teste	Duração e condições ou diretrizes adotadas	Resultado	Referência
Porquinho da Índia (jovem adulto m, f)	Sensibilidade da pele	EPA FIFRA Subdiv. F §81-6, 40 CFR 152-36 □ U.T.I./mg não registrado*.	O material técnico 50% p/v na água para indução e 5% p/v na água para desafio primário produziu sensibilidade dérmica. O material técnico 0,5% p/v na água para novo desafio não elicitou respostas de sensibilidade.	94-8488-21

**Tabela B. Perfil de toxicologia adicional do material técnico Bti cepa AM65-52, com base na administração única.**

Espécies	Teste	Duração e condições ou diretrizes adotadas	Resultado	Referência
Rato, Sprague-Dawley (21 m, 21 f)	Patogenicidade e toxicidade oral aguda	EPA FIFRA 40 CFR 158-740. Dose oral única de aproximadamente $10^8$ UFC. U.T.I./mg não registrado*.	Sem mortalidade, sem sinais significativos de toxicidade, sem evidência de patogenicidade. Irritação em todos os animais tratados precocemente no estudo e pulmões dilatados (dia 4) nos animais tratados. Bti encontrado nos pulmões de apenas um animal tratado no dia 4. Em todos os animais tratados, a eliminação total ocorreu no dia 8, com exceção das fezes, que ficaram limpas no dia 22. Atóxico e não patogênico para ratos.	G-7264.222
Rato, Sprague-Dawley (24 m, 24 f)	Patogenicidade e toxicidade intravenosa aguda	EPA FIFRA 40 CFR 158-740. Injeção intravenosa única de aproximadamente $10^7$ UFC. U.T.I./mg não registrado*.	Sem mortalidade nos dias 22 ou 50 dos períodos de teste. Sem patogenicidade ou toxicidade relacionada ao tratamento. Micróbio do teste presente em altos níveis no baço e	G-7264.222





			no fígado, baixos em outros tecidos e no sangue. Ocorreu eliminação total para o conteúdo no cérebro, sangue e ceco, mas não dos pulmões, do baço, do fígado, dos nódulos linfáticos e dos rins. Nos tecidos sem eliminação, as contagens microbianas permaneceram iguais no teste do dia 50.	
--	--	--	---	--

\*Doses baseadas na contagem de esporos ou mg do produto.

**Tabela B. Perfil de toxicologia adicional do material técnico Bti cepa AM65-52, com base na administração única.**

Espécies	Teste	Duração e condições ou diretrizes adotadas	Resultado	Referência
Camundongo, (5 m, 5 f por tratamento)	Teste de injeção intraperitoneal	EPA FIFRA 40 CFR 180-1011. 0,5, 0,05 ou 0,005 mg do material técnico por animal (correspondente a $10^8$ , $10^7$ e $10^6$ UFC/animal), injetada na cavidade peritoneal. Potência de Bti A65-52 6600 U.T.I./mg	Sem sinais de toxicidade durante os 7 dias do período de teste.	VTP/TE-05
Rato, Sprague-Dawley (24 m, 24 f)	instilação endotraqueal	EPA FIFRA 40 CFR 158.740. Instilação endotraqueal única de $10^8$ UFC. U.T.I./mg não registrado*.	Sem mortalidade nos 50 dias do período de teste. A toxicidade relacionada ao tratamento aparente no início do estudo com relação à respiração, locomoção, posição do corpo e aparência externa. Sem patogenicidade. Lesões pulmonares persistentes não	G-7264.225



			<p>foram consideradas causadas pelo processo infeccioso, mas pela presença de numerosas partículas estranhas nos pulmões. Bti presente em todos os tecidos dos animais tratados, exceto no cérebro. No dia 50, a eliminação total foi observada no sangue, nos rins e nos nódulos linfáticos. Não se observou eliminação total no dia 50 para o baço, fígado, pulmões e ceco, mas a contagem microbiana foi substancialmente reduzida em comparação com os níveis de pico, exceto no baço. Bti não se proliferou. Na necropsia nos dias 4, 8, 15, 22, 36 e 50, as observações patológicas de todos os animais foram normais.</p>	
--	--	--	--	--

**Tabela C. Perfil de ecotoxicologia do material técnico Bti cepa AM65-52.**

Espécies	Teste	Duração e condições	Resultado	Referência
<i>Daphnia magna</i> (pulga d'água)	Toxicidade aguda	Duração: 10 dias. Três recipientes de exposição replicados contendo 10 dafnídeos cada (30 mg/ml, em por concentração e controle). Soluções de teste renovadas a cada 48 horas. U.T.I./mg não registrado*.	CE <sub>50</sub> > 50 mg/l. Após o dia 10 de exposição, 93% de sobrevivência a 50 mg/ml, em comparação com 97% de sobrevivência nos controles não tratados.	2439.6137
Larvas de	Teste	Bti A65-52 WG	Efeitos adversos em	Liber K. et





mosquito quironomídeo, espécie não declarada	mesocosmo	aplicado em 2 ocasiões em 1, 9, 22,5, 45 ou 90 kg/ha. U.T.I./mg não registrado*.	$\geq 45$ kg/ha foram transientes e recuperação ocorreu 14-32 dias após a aplicação.	al. 1998
Perca-sol de Guelras Azuis ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	Teste de renovação estática de 30 dias	Ração misturada com Bti AM65-52 em concentração nominal 500 vezes maior do esperado no ambiente ( $3,89 \times 10^{10}$ UFC/g de alimento). 6600 U.T.I./mg	Sem comportamento anormal. Sem lesões, necroses ou tumores atribuíveis a Bti AM65-52. Sem efeitos adversos sobre a sobrevivência e o crescimento. Não infeccioso, não patogênico.	90-2-3228
Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Teste de renovação estática de 32 dias	1,945 g do material de teste ( $3,89 \times 10^{11}$ UFC) suspenso em 100 ml de água adicionada a 49,9 litros de água reconstituída mole e adicionada a 3 aquários de teste. Ração para peixe comercialmente preparada foi fornecida uma vez por dia a uma taxa de promoção de crescimento de 4,5% do peso corporal. Ração misturada com Bti AM65-52 em concentração nominal 500 vezes maior do esperado no ambiente ( $3,89 \times 10^{10}$ UFC/g de alimento). 6600 U.T.I./mg	Sem efeitos adversos sobre a sobrevivência, sem evidência de ineficácia ou patogenicidade na forma das lesões, tumores ou necroses.	90-2-3242
Sargo-choupa ( <i>Cyprinodon variegates</i> )	Teste de renovação estática de 30 dias	Concentrações aquosas e alimentares nominais equivalentes a 100	Sem evidência de ineficácia ou patogenicidade, e sem efeito adverso	90-4-3288



		vezes e 500 vezes a concentração esperada no meio ambiente, respectivamente. 6600 U.T.I./mg	sobre o crescimento dos peixes.	
<i>Apis mellifera</i> (abelha)	Toxicidade oral	Bti AM65-52 suspenso em água/mel, 1:1 v/v. Tratamentos 24 g/acre (0,1 x taxa de campo) a 2400 g/acre (10 x taxa de campo), duração de 14 dias. □ U.T.I./mg não registrado*.	Atóxico como veneno estomacal em abelhas operárias adultas de 0,5 a 10 vezes a dosagem de campo para controle de insetos.	BATFT/C 90-833-F/C

**Tabela C. Perfil de ecotoxicologia do material técnico Bti cepa AM65-52.**

Espécies	Teste	Duração e condições	Resultado	Referência
Pato selvagem ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	Toxicidade oral	Sonda oral a 3077 mg/kg (3,4-6,2 × 10 <sup>11</sup> UFC/kg/dia por 5 dias). U.T.I./mg não registrado*.	TEL > 3077 mg/kg de peso corporal. Sem mortalidade, aparência e comportamento normais. Sem efeito sobre o peso corporal ou o consumo de ração. Sem patogenicidade, toxicidade ou efeito sobre a sobrevivência de patos jovens.	161-115.
Codornizes do Norte ( <i>Colinus virginianus</i> )	Toxicidade oral	Sonda oral a 3077 mg/kg pc/dia por 5 dias 6600 U.T.I./mg, 2,0 x 10 <sup>11</sup> UFC/g.	Sem patogenicidade, toxicidade ou efeito sobre a sobrevivência de aves jovens. DL <sub>50</sub> > 3077 mg/kg (equivalente a > 1874 mg/kg pc/d) NOEC = 3077 mg/kg (equivalente a > 1874 mg/kg pc/d)	161-114

## ANEXO 2. REFERÊNCIAS

Número do documento ou outra referência	Ano e título do relatório ou detalhes da publicação
Valent Biosciences 161-114	1990. Material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ): Um estudo de patogenicidade e toxicidade oral aviária na codorniz.





161-115.	1990. Material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ): Um estudo de patogenicidade e toxicidade oral aviária no pato selvagem.
2439.6137	1999. VectoBac TP (ABG-6164S) - toxicidade para pulgas d'água ( <i>Daphnia magna</i> ) em condições de renovação estatística.
90-2-3228	1990. Material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) - infectividade e patogenicidade para Perca-sol de Guelras Azuis ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) durante um teste de renovação estática de 30 dias.
90-2-3242	1990. Material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) - infectividade e patogenicidade para Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) durante um teste de renovação estática de 32 dias.
90-4-3288	1990. Material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) - infectividade e patogenicidade para Sargo-choupa ( <i>Cyprinodon variegates</i> ) durante um teste de renovação estática de 30 dias.
BATFT/C 90-833-F/C	1990. Teste de toxicidade na alimentação da abelha adulta / avaliação da crônica comparativa toxicidade de veneno estomacal de <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>israelensis</i> ( <i>Bti</i> ) em abelhas operárias adultas.
FAO/OMS,	Manual para Desenvolvimento e Uso da FAO e Especificações para Pesticidas da OMS.
2006	Março de 2006 revisão da 1ª edição. Disponível apenas na internet, em <a href="http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/">http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/</a> e <a href="http://www.who.int/whopes/quality/">http://www.who.int/whopes/quality/</a> .
G-7264.222	1990. Estudo de patogenicidade/toxicidade oral aguda do material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) em ratos.
G-7264.224	1990. Estudo de patogenicidade/toxicidade intravenosa aguda do material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) em ratos.
G-7264.225	1990. Estudo de patogenicidade/toxicidade dérmica aguda do material técnico VectoBac ( <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> ) em ratos.
Golberg & Margalit 1977	Golberg, L.J. and Margalit, J., 1977. <i>A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens</i> [Um esporo bacteriano demonstrando ser um rápido larvicida da atividade de Margalit 1977 contra <i>Anopheles sergentii</i> , <i>Uranotaenia unguiculata</i> , <i>Culex univittatus</i> , <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex pipiens</i> ]. Mosq. News, 37, 355-358.
IPCS, 1999	Crítérios de Saúde Ambiental, Nº 217. <i>Bacillus thuringiensis</i> , 1999, 105pp.
Liber et al., 1998	Liber, K., Schmude, K.L. and Rau, D.M., 1998. <i>Toxicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis to chironomids in pond mesocosms</i> [Toxicidade do <i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> em mesocosmos de lago]. Ecotoxicology, 7: 343-354.
US EPA, 1998	Decisão de Elegibilidade para Registro de <i>Bacillus thuringiensis</i> - EPA738-R98-004, 157pp.
VTP/TE-05	1990. <i>Intraperitoneal injection test with Vectobac technical powder</i> [Teste de injeção intraperitoneal com o pó técnico Vectobac].
OMS, 2002.	A classificação recomendada da OMS de pesticidas por risco e diretrizes para a classificação 2000-2002, documento WHO/PCS/01.5. OMS, Genebra, 2002.



O texto acima é verdadeiro e dou fê,  
Curitiba, 05 de Janeiro de 2018.  
Leonardo Pinto Andrade de Abreu



## PROTOCOLO DE ASSINATURA(S)

O documento acima foi proposto para assinatura digital na plataforma Portal de Assinaturas Certisign. Para verificar as assinaturas clique no link: <https://www.portaldeassinaturas.com.br/Verificar/58B3-C73F-3D66-1747> ou vá até o site <https://www.portaldeassinaturas.com.br:443> e utilize o código abaixo para verificar se este documento é válido.

**Código para verificação: 58B3-C73F-3D66-1747**



### Hash do Documento

2700DF9047D91327A8D72F1C0AA4EB1D964A05A5F278CAD880DEFAEDA3EEDF77

O(s) nome(s) indicado(s) para assinatura, bem como seu(s) status em 23/04/2021 é(são) :

☒ Leonardo Pinto Andrade De Abreu - 085.092.767-65 em  
05/01/2018 09:48 UTC-02:00

**Tipo:** Certificado Digital

