

# Manual de Protocolos para Testes de Eficácia em Produtos Desinfestantes





# Índice

Introdução	3
O Que São Desinfestantes?	3
O Que São Testes de Eficácia?	4
Quais as Pragas Mais Representativas?	5
Tabela 1 : Pragas Urbanas (Intra e Peridomiciliares)	5
Tabela 2 : Pragas de Jardim	7
Teste de Eficácia para Iscas Baraticidas	8
Teste de Eficácia para Volatilizantes	11
Teste de Eficácia para Espirais	14
Teste de Eficácia em Aerossóis Frente a Insetos Rasteiros	17
Teste de Eficácia em Aerossóis Frente a Insetos Voadores	20
Teste de Eficácia de Contato / Residual em Inseticidas	23
Teste de Eficácia em Rodenticidas Sob a Forma de Iscas	27
Teste de Eficácia em Rodenticidas Sob a Forma de Pós de Contato	31
Teste de Potência em Produtos Larvicidas Biológicos	34
Teste de Eficácia em Produtos Larvicidas Biológicos	37
Teste de Eficácia Curativo para Cupins de Madeira Seca	42
Teste de Eficácia Preventivo/Residual para Cupins de Madeira Seca	45
Teste de Eficácia em Laboratório Frente a Cupim Subterrâneo	48



## Introdução

Seguindo a filosofia da ANVISA - salvar a saúde da população nos produtos e serviços sujeitos ao controle sanitário e garantir que os mesmos sejam adequados aos fins propostos – é que desenvolvemos este trabalho em conjunto com representantes do setor regulado, comunidade científica e laboratórios habilitados pela REBLAS, com o objetivo de preencher uma lacuna existente no país e no mundo: protocolos padronizados para avaliação da eficácia de produtos desinfestantes.



Se a segurança dos produtos advém do conhecimento de suas características toxicológicas, a comprovação da adequação para os fins propostos é feita por meio dos testes de eficácia.

A evolução da regulamentação sanitária para estes produtos culminou, em 1997, com a publicação das Portarias 321 e 322, sendo que a primeira foi revogada pela Resolução – RDC nº 326, de 07 de dezembro de 2005, que passaram a ser as principais ferramentas para a concessão do registro e suas alterações para produtos saneantes categorizados como desinfestantes, sendo tais atribuições competência da Gerência-Geral de Saneantes (GGSAN) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

## O que são Desinfestantes?

São produtos, de venda direta ao consumidor ou para empresas especializadas, que se destinam à aplicação em domicílios e suas áreas comuns, no interior de instalações, em edifícios públicos ou coletivos e seus ambientes afins, para o controle de insetos, roedores e outros vetores incômodos ou nocivos à saúde.

Incluem-se ainda os produtos de venda livre para aplicação em jardins residenciais e plantas ornamentais (cultivadas sem fins lucrativos), a fim de controlar pragas e doenças, bem como aqueles produtos destinados à revitalização e embelezamento das plantas.

## O que são testes de eficácia?



São testes executados em laboratório ou em campo, em condições padronizadas, com o fim de comprovar a capacidade dos produtos para o controle de pragas urbanas e de jardim.

Até o momento, o Brasil não possuía protocolos para testar estas categorias de produtos, nem parâmetros para estabelecer variações dos resultados dos testes de um laboratório para outro, dificultando, assim, o estabelecimento de critérios para aceitação, ou não, dos

mesmos para as finalidades apregoadas para estes produtos.

A padronização envolve o estabelecimento de variáveis críticas para um dado teste, como por exemplo:

- número de espécimes por teste.
- número de repetições.
- forma física dos produtos.
- adoção de um produto padrão para verificar a suscetibilidade/resistência da população exposta ao teste.
- local e data de aplicação.
- dose e modo de aplicação.
- modo de criação das pragas.
- espécies representativas para a realização dos testes; dentre outros.

## Quais as pragas mais representativas?

As tabelas 1 e 2 abaixo relacionam as espécies mais representativas que poderão ser utilizadas para a comprovação da eficácia dos desinfestantes.

**Tabela 1 : Pragas urbanas (intra e peridomiciliares)**

<b>Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>
Ácaro	Dermatophagoides farinae Tyrophagus putrescentiae Chelacaropsis moorei	Ácaro doméstico
Aranha	Nesticoides rufipes Loxoscelis spp	Aranha doméstica
Barata	Blattella germanica Periplaneta americana	Barata francesinha ou alemã Barata de esgoto
Broca	Lyctus spp & Anobiun spp	Broca de madeira seca
Barbeiro	Triatoma spp, Rhodnius spp e Panstrongylus megistus	Barbeiro
Borrachudo	Simulium pertinax	Borrachudo
Carrapato	Rhipicephalus sanguineus Boophilus micropulus	Carrapato dos cães Carrapato bovino
Cupim	Coptotermes gestroi Cryptotermes spp Nasutitermes spp	Cupim de solo Cupim de madeira seca Cupim de solo
Escorpião	Tityus serrulatus, T. Bahiensis	Escorpião amarelo e escorpião marrom
Formiga	Monomorium pharaonis & florícola Solenopsis sevisissima & invicta Camponotus spp Linepithema humile Tapinoma melanocephalum	Formiga faraó Formiga lavapé Formiga carpinteira Formiga argentina Formiga fantasma

Moscas	<i>Musca domestica</i>	Mosca
Mosquito	<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i> e <i>A.albopictus</i> <i>Anopheles spp</i>	Mosquito/pernilongo comum Mosquito da dengue e febre amarela Mosquito da malária
Pulga	<i>Ctenocephalides felis felis</i> <i>Ctenocephalides canis</i>	Pulga dos gatos Pulga dos cães
Roedores	<i>Mus musculus</i> <i>Rattus rattus</i> <i>Rattus norvegicus</i>	Camundongo Rato de telhado Rato de esgoto (rata- zana)
Traça	<i>Tinea pellionella</i> & <i>bis- selliella</i> <i>Lepisma saccharina</i>	Traça de parede (casulo) Traça dos livros

**Tabela 2 : Pragas de jardim**

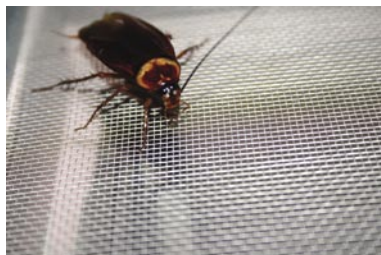
Espécie	Nome científico	Nome comum
Ácaro	<i>Tetranychus urticae</i> <i>Polyphagotarsonemus latus</i>	Ácaro rajado Ácaro branco
Besouro	<i>Diabrotica spp</i> e <i>Cos- talimaita spp</i>	Caramujo-gigante- africano (espécie exótica) e caracóis (espécies Brasil)
Caracol	<i>Achatina fulica</i> e <i>Biomphalaria spp</i> , <i>Australorbis spp</i> , <i>Helix aspersa</i> , <i>Bradyboena similaris</i> , <i>Bulimulus spp</i> <i>Stenogyra spp</i>	Caramujo-gigante- africano (espécie exótica) e caracóis (espécies Brasil)

Cochonilha	Planococcus spp e Orthezia	Cochonilha
Formiga cortadeira	Acromyrmex spp Atta spp	Formiga-quenquém Saúva
Gafanhoto	Schistocerca spp e Rhammatocerus spp	Gafanhoto
Lagarta	Brassolis spp	Lagarta das palmeiras
Lesma	Limax spp, Phyllocaulis spp Stronpheicheilus oblongus, Sarasinula langsdorfii e Sarasinula linguaeformis, Veronicellidae (família)	Lesmas terrestres
Percevejo	Nezara viridula e Lep toglossus spp	Percevejo verde (maria fedida) Percevejo-do-maracujá
Pulgão	Aphis spp	Pulgão
Tripes	Frankliniella spp	Tripes

## Teste De Eficácia para Iscas Baraticidas

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de baraticidas sob a forma de isca.



## 2. Definições

- 2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.2. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.3. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

## 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Arena de superfície lisa, não porosa, inerte, com dimensões de 1m x 1m x 10cm de altura, com o abrigo colocado em uma extremidade e a isca e a dieta em placa de Petri colocadas na outra extremidade, com água, de acordo com a Figura 1:

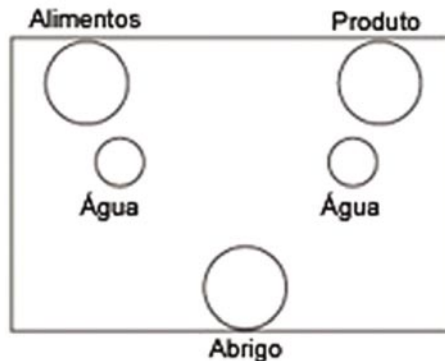


Figura 1

- 3.2. Ração para cachorros adultos.
- 3.3. Sistema-teste:
  - 3.3.1. *Blatella germanica*, adultas, 3 a 4 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas

(23°C a 27°C e 50 a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas em jejum por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

- 3.3.2. *Periplaneta americana*, adultas, 6 a 8 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas em jejum por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

- 3.4. Termohigrômetro.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

- 4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e um controle.

- 4.1.2. Número de indivíduos por repetição: 10 *Periplaneta americana* e 20 *Blattella germanica*, sendo 50% machos e 50% fêmeas.

### 4.2. Específico

- 4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 23°C e 27°C, e a umidade relativa entre 50% e 70%.

- 4.2.2. Inserir no interior da arena a substância teste, na dose recomendada pelo fabricante, e a ração, conforme demonstrado na Figura 1.

- 4.2.3. Introduzir cada espécie do sistema teste, separadamente, próximo ao abrigo.

- 4.2.4. Realizar leituras de mortalidade em até 72 horas, ou de acordo com a recomendação do fabricante.

## 5. Tratamento Estatístico

Os dados obtidos serão submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado. Sendo detectadas diferenças significativas superiores a 5% entre os tratamentos, deverá ser aplicado um teste de médias.



## 6. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade, calculado pela fórmula de Abbott, for de  $90\pm 10\%$  em, no máximo, em até 72 horas, ou no tempo estabelecido pelo fabricante.

### Teste de Eficácia para Volatilizantes

#### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de produtos volatilizantes (repelentes), com ou sem efeito knockdown sobre mosquitos.

#### 2. Definições

- 2.1. Knockdown: posição em que o inseto se encontra, sob efeito do produto aplicado, tombado sobre a superfície.
- 2.2.  $KT_{50}$ : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.
- 2.3. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.4. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

#### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Câmara de teste com volume de 5,8 m<sup>3</sup> (Peet-Grady), sem fluxo forçado de ar.
- 3.2. Detergente alcalino.
- 3.3. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm).
- 3.4. Sistema –teste:
  - 3.4.1. *Aedes* spp, com idade entre 3 e 5 dias, criados em biotério com temperatura e umidades controladas

(23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente).

3.4.2. Opcional: *Culex quinquefasciatus*, com idade entre 2 e 3 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50 a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

3.5. Solução de acetona a 10 % v/v (volume por volume) em álcool etílico.

3.6. Termohigrômetro.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e um controle, por espécie

4.1.1.2. Número de indivíduos/espécies por repetição: mosquitos – 50 (cinquenta) fêmeas.

4.1.2. A câmara deve ser limpa, entre cada teste, com detergente alcalino, seguido de enxágue com água e exaustão.

4.1.3. Deverá ser realizada uma validação, antes de conduzir o primeiro teste do dia, realizando-se um teste em branco para verificar a ocorrência de knockdown dos insetos testados na câmara. Este ensaio, realizado com 20 indivíduos fêmeas, não pode apresentar um valor de knockdown superior a 5% da população testada. A observação deverá ser feita após 20 minutos, contados a partir da soltura.

### 4.2. Específico

4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste com temperatura entre 23°C e 27°C e a umidade relativa entre 50% e 70%.

4.2.2. Coletar os insetos num recipiente plástico coberto com tela, no mínimo, 12 horas antes da condução do teste.

4.2.3. Registrar a voltagem e a temperatura do aparelho a ser usado no teste.

4.2.4. Ligar o aparelho na tomada, sem o produto e fora da câmara.

4.2.5. Manter ligado por 30 minutos para pré-aquecimento (no caso

de aparelhos elétricos).

- 4.2.6. Após este período, transferir o aparelho para o interior da câmara, colocar o produto e manter o conjunto ligado pelo período de 5 minutos para pastilhas e 40 minutos para líquidos.
- 4.2.7. Soltar os insetos na câmara e iniciar a contagem de tempo para o cálculo do knockdown.
- 4.2.8. Medir e registrar a temperatura do aparelho (quando for o caso).
- 4.2.9. Limpar a câmara com solução de acetona.
- 4.2.10. Medir a eficácia do produto nos tempos de 0; 4; 8 e 11,5 horas, e, em cada um destes, o knockdown nos tempos de 40"; 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.
- 4.2.11. Após 15 minutos da última leitura do knockdown, acionar o sistema de exaustão no interior da câmara.

## 5. Tratamento Estatístico

O  $KT_{50}$  será obtido observando-se a regressão linear por meio do programa Probit.

## 6. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o  $KT_{50}$  for menor que  $25 \pm 5$  minutos, em cada um dos tempos avaliados.

## Teste de Eficácia para Espirais

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de produtos repelentes sob a forma de espirais.

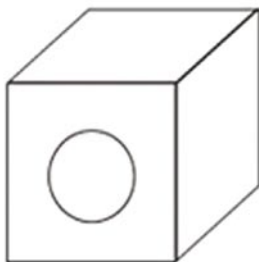
### 2. Definições

- 2.1. Knockdown: posição em que o inseto se encontra, sob efeito do produto aplicado, tombado sobre a superfície.
- 2.2.  $KT_{50}$ : tempo que 50% da população dos insetos testados leva

- para ser afetada pela substância-teste.
- 2.3. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
  - 2.4. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Balança analítica.
- 3.2. Câmara – teste em vidro de espessura mínima de 0,5 cm, com dimensões de 70 x 70 x 70 cm.



- 3.3. Detergente alcalino.
- 3.4. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm).
- 3.5. Sistema-teste:
  - 3.5.1. *Aedes* spp, com idade entre 3 e 5 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
  - 3.5.2. Opcional: *Culex quinquefasciatus*, com idade entre 2 e 3 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

- 3.6. Solução de acetona a 10 % v/v (volume por volume) em álcool etílico.
- 3.7. Termohigrômetro.
- 3.8. Ventilador a pilha.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

#### 4.1.1. Delineamento experimental:

- 4.1.1.1. Cinco repetições por tratamento e um controle, por espécie.
- 4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição: Mosquitos - 20 (vinte) fêmeas.
- 4.1.2. A câmara deve ser limpa, entre cada teste, com detergente alcalino, seguido de enxágüe com água, solução de acetona e exaustão.
- 4.1.3. Deverá ser realizada uma validação, antes de conduzir o primeiro teste do dia, realizando-se um teste em branco, para verificar a ocorrência de knockdown dos insetos testados na câmara. Este ensaio, realizado com 20 indivíduos fêmeas, não pode apresentar um valor de knockdown superior a 5% da população testada. A observação deverá ser feita após 20 minutos, contados a partir da soltura.

### 4.2. Específico

- 4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 23° C e 27°C, e a umidade relativa entre 50% e 70 %.
- 4.2.2. Coletar os insetos num recipiente plástico coberto com tela.
- 4.2.3. Pesar 0,5 g da espiral, introduzirá-la no suporte no interior da câmara e acender as duas extremidades, simultaneamente.
- 4.2.4. Ligar o ventilador.
- 4.2.5. Manter o produto na câmara até sua queima completa.
- 4.2.6. Abrir a câmara de teste, desligar o ventilador e soltar os insetos no interior da mesma.
- 4.2.7. Registrar o número de insetos em knockdown nos tempos 40''; 1'; 1'30''; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.
- 4.2.8. Ventilar a câmara após 15 minutos após a última leitura do knockdown.

4.2.10. Recolher os mosquitos.

## 5. Tratamento Estatístico

O  $KT_{50}$  será obtido observando-se a regressão linear por meio do programa Probit.

## 6. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o  $KT_{50}$  for menor que  $25 \pm 5$  minutos.

## Teste de Eficácia em Aerossóis Frente a Insetos Rasteiros

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de inseticidas sob a forma de aerossol frente a insetos rasteiros.



### 2. Definições

- 2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente de qualquer apêndice após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.1. Knockdown: posição em que o inseto se encontra, sob efeito do produto aplicado, tombado sobre a superfície.
- 2.2.  $KT_{50}$ : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.
- 2.3. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.4. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação

em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Balança analítica.
- 3.2. Cilindro em aço inoxidável com 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura.
- 3.3. Detergente alcalino.
- 3.4. Dosador automático
- 3.5. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm).
- 3.6. Sistema-teste:
  - 3.6.1. *Blattella germanica*, adultas, entre 3 e 4 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
  - 3.6.2. *Periplaneta americana*, adultas, entre 6 e 8 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
  - 3.6.3. Formigas domésticas, adultas, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
  - 3.6.4. Para testes frente a outros insetos e artrópodes, consultar as tabelas 1 e 2 apresentadas anteriormente.
- 3.7. Solução de acetona a 10 % v/v (volume por volume) em álcool etílico.

### 4. Procedimento Experimental

#### 4.1. Geral

##### 4.1.1. Delineamento experimental:

- 4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e controle;
- 4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:

- 4.1.1.2.1. *Blattella germanica*: 10 (dez);
- 4.1.1.2.2. *Periplaneta americana*: 06 (seis);
- 4.1.1.2.3. Formigas: 100 (cem);

4.1.2. O cilindro deve ser limpo, entre cada teste, com solução de acetona seguido de água e exaustão.

4.1.3. Deverá ser realizada uma validação antes de conduzir o primeiro teste do dia, realizando-se um teste em branco para verificar a ocorrência de knockdown nos insetos testados. O knockdown da população testada não poderá ultrapassar os seguintes valores:

- 4.1.3.1. 20 % até 10 indivíduos;
- 4.1.3.2. 10% de 11 a 50 indivíduos;
- 4.1.3.3. 5% superior a 51 indivíduos.

## 4.2. Específico

4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 23°C e 27°C e a umidade relativa entre 50% e 70%.

4.2.2. Coletar os insetos num recipiente plástico coberto com tela, no mínimo, 12 horas antes da condução do teste.

4.2.3. Transferir os insetos no pote acrílico (vide desenho abaixo) com fundo em tela de aço inox para dentro do cilindro de metal.

4.2.4. Após determinar a dosagem do aerosol, aplicar em dose única para cada repetição conforme o quadro abaixo:

Inseto	Massa de produto
B. germânica	900 ± 50 mg
P. americana	1000 ± 50 mg
Formigas	650 ± 50 mg

4.2.5. Após a aplicação do produto, fechar o cilindro na parte superior por 30 segundos.

4.2.6. Passados 20 minutos, retirar os insetos, levar para o biotério e fornecer água e alimento.

4.2.7. Registrar a mortalidade em até 72 horas.

4.2.8. Limpar o cilindro com detergente alcalino, rinsar com água, solução de acetona e ventilar

## 7. Resultados

O teste será considerado satisfatório se a mortalidade, calculada pelo método de Abbott, for de  $90 \pm 10\%$  em até 72 horas.

## Teste de Eficácia em Aerossóis Frente a Insetos Voadores

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de inseticidas sob a forma de aerossol frente a insetos voadores.

### 2. Definições

- 2.1. Knockdown: posição em que o inseto se encontra, sob efeito do produto aplicado, tombado sobre a superfície.
- 2.2.  $KT_{50}$ : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.
- 2.3. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente de qualquer apêndice após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.4. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.5. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Balança analítica.
- 3.2. Câmara de teste com volume de 5,8 m<sup>3</sup> (Câmara Peet-Grady/CSMA).
- 3.3. Detergente alcalino.
- 3.4. Dosador automático.
- 3.5. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm).
- 3.6. Sistema-teste:
  - 3.6.1. *Musca domestica*, com idade entre 2 e 5 dias, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas

(23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

3.6.2. *Aedes* spp, com idade entre 3 e 5 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

3.6.3. Opcional: *Culex quinquefasciatus*, com idade entre 2 e 3 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

3.7. Solução de acetona a 10 % v/v (volume por volume) em álcool etílico.

3.8. Termohigrômetro

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e um controle.

4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:

4.1.1.2.1. Mosquitos: 50 (cinquenta) fêmeas;

4.1.1.2.2. Moscas: 100 (cem).

4.1.2. A câmara deve ser lavada, entre cada teste, com detergente alcalino, seguido de enxágüe com água. No intervalo de cada aplicação, limpar a câmara com solução de acetona e exaustão.

4.1.3. Deverá ser realizada uma validação antes de conduzir o primeiro teste do dia, realizando-se um teste em branco para verificar a ocorrência de knockdown dos insetos testados na câmara. Este ensaio, realizado com 20 indivíduos fêmeas, não pode apresentar um valor de knockdown superior a 5% da população testada. A observação deverá ser feita após 20 minutos, contados a partir da soltura.



## 4.2. Específico

4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 23°C e 27°C e a umidade relativa entre 50% e 70%.

4.2.2. Coletar os insetos num recipiente plástico coberto com tela.

4.2.3. Abrir a câmara de teste e soltar os insetos no interior da mesma.

4.2.4. Aplicar uma dose da substância teste de  $650 \pm 50$  mg, em 4 disparos em pontos diametralmente opostos, de modo a simular sua aplicação espacial.

4.2.5. Ventilar a câmara passados 20 minutos

4.2.6. Retirar os insetos.

4.2.7. Levar para o biotério e fornecer água e alimento.

4.2.8. Registrar a mortalidade em até 72 horas.

4.2.9. Limpar a câmara com detergente alcalino.

## 5. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade for de  $90 \pm 10\%$  em até 72 horas.

## Teste de Eficácia de Contato / Residual em Inseticidas

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia residual de inseticidas.

### 2. Definições

2.1. Efeito residual: produto que apresenta eficácia por um período pré-estabelecido pelo fabricante.

2.2. Knockdown: posição em que o inseto se encontra, sob efeito do produto aplicado, tombado sobre a superfície.

2.3. KT<sub>50</sub>: tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

2.4. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem ne

nhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.

- 2.5. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.6. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

3.1. Balança analítica.

3.2. Dosador automático.

3.3. Placas de azulejo 15 x 15 cm.

- 3.3.1. Caso o produto seja indicado para aplicação em outras superfícies o teste deverá ser conduzido, nas superfícies e dosagens recomendadas pelo fabricante.

3.4. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm).

3.5. Sistema-teste:

- 3.5.1. Musca domestica, com idade entre 2 e 5 dias, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
- 3.5.2. Aedes spp., com idade entre 3 e 5 dias, criados em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentados com dieta específica e aclimatados por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
- 3.5.3. Blattella germânica, adultas, entre 3 e 4 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

- 3.5.4. *Periplaneta americana*, adultas, entre 6 e 8 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.
- 3.5.5. Formigas domésticas, adultas, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo
- 3.5.6. Para outras pragas consultar as tabelas 1 e 2 constantes deste manual.

### 3.6. Termohigrômetro.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

#### 4.1.1. Delineamento experimental:

- 4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e controle.
- 4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:
  - 4.1.1.2.1. Mosquitos: 25 (vinte e cinco) fêmeas;
  - 4.1.1.2.2. *Blattella germanica*: 10 (dez), 50% machos e 50% fêmeas;
  - 4.1.1.2.3. *Periplaneta americana*: 6 (seis), 50% machos e 50% fêmeas;
  - 4.1.1.2.4. *Musca domestica*: 25 (vinte e cinco);
  - 4.1.1.2.5. Formigas domésticas: 100 (cem);

### 4.2. Específico

- 4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 23°C e 27°C e a umidade relativa entre 50% e 70%.
- 4.2.2. AEROSSÓIS E LÍQUIDOS PARA PRONTO USO: aplicar, no caso de aerossóis com auxílio de um dosador automático, as doses abaixo descritas:

Inseto	Massa de produto
B. germânica	900 ± 50 mg
P. americana	1000 ± 50 mg
Musca domestica	650 ± 50 mg
Formigas domésticas	650 ± 50 mg
Mosquitos	650 ± 50 mg

- 4.2.4. LÍQUIDOS: Preparar a calda na concentração indicada pelo fabricante e aplicar o produto.
- 4.2.5. SÓLIDOS: Polvilhar o produto de acordo com a quantidade indicada pelo fabricante.
- 4.2.6. Armazenar as placas em ambiente com temperatura entre 23°C e 27°C e umidade relativa entre 50% e 70%, mantendo ciclos claro/escuro de 12 horas.
- 4.2.7. Após a secagem natural do produto retirar as placas para a realização do ensaio para o tempo zero.
- 4.2.8. Coletar os insetos em recipiente plástico coberto com tela.
- 4.2.9. Posicionar duas placas, uma com e outra sem a substância-teste.
- 4.2.10. Colocar o recipiente plástico contendo os insetos sobre a placa sem a substância-teste, posicionando as mesmas numa angulação de 45° para moscas e mosquitos, e horizontal para baratas.
- 4.2.12. Deslocar os insetos, após 5 minutos de aclimação, para a placa contendo a substância-teste.
- 4.2.14. Passados 20 minutos, retirar os insetos, levar para o biotério e fornecer água e alimento.
- 4.2.15. Registrar a mortalidade em até 72 horas.
- 4.2.16. Manter um inseto-testemunha, sem tratamento, para com parar a mortalidade.
- 4.2.17. Repetir o experimento tantas vezes quantas forem necessárias para comprovação do período de ação (efeito residual) indicado pelo fabricante.

## 4. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade, calculado pela fórmula de Abbott, for de  $90 \pm 10\%$  em até 72 horas.

## Teste de Eficácia em Rodenticidas Sob a Forma de Iscas

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de rodenticidas sob a forma de iscas.

### 2. Definições

- 2.1. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.2. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Balança analítica.
- 3.2. Detergente alcalino.
- 3.3. EPI apropriado para captura e manuseio dos animais.
- 3.4. Gaiola.
- 3.5. Potes para alimentação e água.
- 3.6. Ração padrão: açúcar cristalizado – 5%, milho triturado 50%, farelo de trigo - 37%, óleo de milho - 5% e farinha de carne - 3%.
- 3.7. Sistema-teste:
  - 3.7.1. *Mus musculus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 10g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 7 dias em biotério. As fêmeas

não devem estar grávidas. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.

3.7.2. *Rattus rattus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.

3.7.3. *Rattus norvegicus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100 g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.

3.8. Termohigrômetro.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Um controle com 10 indivíduos (5 fêmeas e 5 machos), por espécie.

4.1.1.2. Número de indivíduos por repetição: vinte (10 fêmeas e 10 machos), por espécie.

4.1.2. O teste só será válido se for conduzido com e sem opção alimentar, salvo seja alcançada, no teste com opção alimentar, a mortalidade mínima.

### 4.2. Teste com Opção Alimentar

4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste para  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e a umidade relativa entre 30% e 70 %.

4.2.2. Manter os animais em gaiola com dois potes de ração nas extremidades e água na posição central.

4.2.3. Retirar as demais fontes de alimentação. A água deve ser fornecida, sem restrições, durante o período do teste.

4.2.4. No 3º dia uma quantidade fresca e pesada da ração, em quan-

tidade superior à fornecida normalmente.

- 4.2.5. Após 24 horas, a ração restante deverá ser pesada e, a quantidade consumida por cada animal, calculada. Deve ser assegurado que todos os animais estejam se alimentando normalmente da ração contida nos potes.
  - 4.2.6. Colocar o produto num pote limpo, pesar e substituir por um dos potes que guarneciam a ração.
  - 4.2.7. Após 24 horas retirar o produto e pesar.
  - 4.2.8. Repetir as etapas 4.2.7. e 4.2.8. por 2 dias para raticidas de dose múltipla.
  - 4.2.9. Recolocar a ração.
  - 4.2.10. Observar os animais durante 14 dias, 2 vezes ao dia, registrando a mortalidade e sintomas toxicológicos observados.
- ### 4.3. Teste Sem Opção Alimentar
- 4.3.1. Regular a temperatura da sala de teste para 21°C e a umidade relativa entre 30% e 70 %.
  - 4.3.2. Manter os animais em gaiola com a ração colocada na posição central.
  - 4.3.3. Retirar as demais fontes de alimentação. A água deve ser fornecida, sem restrições, durante o período do teste.
  - 4.3.4. No 3º dia uma quantidade fresca e pesada da ração em quantidade superior à fornecida normalmente.
  - 4.3.5. Após 24 horas, a ração restante deverá ser pesada e a quantidade consumida por cada animal, calculada. Deve ser assegurado que todos os animais estejam se alimentando normalmente da ração contida nos potes.
  - 4.3.6. Colocar o produto num pote limpo, pesar e colocar na mesma posição onde anteriormente havia sido colocada a ração.
  - 4.3.7. Após 24 horas, retirar o produto e pesar.
  - 4.3.8. Repetir as etapas 4.2.7. e 4.2.8. por 2 dias para raticidas de dose múltipla.
  - 4.3.9. Recolocar a ração.
  - 4.3.10. Observar os animais durante 14 dias, 2 vezes ao dia, registrando a mortalidade e sintomas toxicológicos observados.

## 5. Resultados

O produto será considerado satisfatório se:

- 5.1. O teste com opção alimentar apresentar um consumo mínimo de 30 % do produto em relação a ração e apresentar, dentro de 14 dias, uma mortalidade, calculada pelo método de Abbott for de  $90 \pm 10\%$ .
- 5.2. No caso de ser observada uma mortalidade inferior a  $90 \pm 10\%$  deverá ser conduzido o teste sem opção alimentar, onde a mortalidade mínima deverá ser de  $90 \pm 10\%$ .

## Teste de Eficácia em Rodenticidas Sob a Forma de Pós de Contato

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de rodenticidas sob a forma de pó-de-contato.



### 2. Definições

- 2.1. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.2. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Balança analítica.
- 3.2. Caixas quadradas (duas) com 1 m<sup>2</sup> de área.
- 3.3. Detergente alcalino.
- 3.4. EPI apropriado para captura e manuseio dos animais.

- 3.5. Gaiola.
- 3.6. Potes para alimentação e água.
- 3.7. Ração padrão: açúcar cristalizado – 5%, milho triturado - 50%, farelo de trigo - 37%, óleo de milho - 5% e farinha de carne - 3%.
- 3.8. Sistema-teste:
  - 3.8.1. *Mus musculus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 10g de peso corpóreo, capturados no ambiente, e aclimatados por pelo menos 7 dias em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
  - 3.8.2. *Rattus rattus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100g de peso corpóreo, capturados no ambiente, e aclimatados por, pelo menos, 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
  - 3.8.3. *Rattus norvegicus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100g de peso corpóreo, capturados no ambiente, e aclimatados por pelo menos 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
- 3.9. Tubo de PVC com 1m de comprimento e diâmetro interno de 75mm.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

#### 4.1.1. Delineamento experimental:

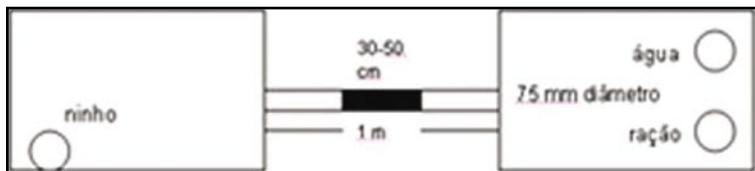
- 4.1.1.1. Um controle com 10 indivíduos (5 fêmeas e 5 machos), por espécie;

4.1.1.2. Número de indivíduos por repetição: vinte (10 fêmeas e 10 machos), por espécie.

## 4.2. Teste

4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e a umidade relativa entre 30% e 70 %.

4.2.2. Montar o sistema conforme indicado no desenho abaixo:



4.2.3. Manter os animais durante 3 dias para reconhecimento do aparato.

4.2.4. Pesar 20g do produto e distribuir uniformemente na parte central, ao longo de 30cm para o *Mus musculus* e, 50cm para demais espécies (vide figura 4.2.2.).

4.2.5. Manter os animais por períodos de 1 a 8 dias.

4.2.6. Após o período de exposição, recolher os animais em gaiolas individuais e observar até 28 dias registrando a mortalidade.

## 5. Resultados

O teste será considerado satisfatório se dentro de 28 dias a mortalidade, calculada pelo método de Abbott, for de  $90 \pm 10\%$ .

## Teste de Potência em Produtos Larvicidas Biológicos

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da potência, em UTI/mg, de larvicidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* e/ou *B. sphaericus* para culicídeos, sob condições de laboratório.

### 2. Definições

2.1. CL50: concentração do biolarvicida (mg/L) capaz de matar

- 50% do número de insetos em teste em um período de tempo determinado (24 ou 48 h segundo o biolarvicida).
- 2.2. Fórmula de Abbott: fórmula aplicada para a correção da mortalidade nos grupos tratados, quando necessário  $[(\% \text{ mortalidade do grupo tratado} - \% \text{ mortalidade do grupo controle}) / (100 - \% \text{ mortalidade do grupo controle})] \times (100)$ .
  - 2.3. Larva morta: aquela que não realiza deslocamento na coluna de água do recipiente teste quando recebe estímulo tátil.
  - 2.4. Potência larvicida da substância-teste expressa em UTI/mg:  $(\text{potência do padrão}) \times (\text{CL50 do padrão} / \text{CL50 da substância-teste})$ .
  - 2.5. Sistema – teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos que se definam como objeto de estudo.
  - 2.6. Substância-teste: é qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.
  - 2.7. UTI: Unidade Tóxicas Internacionais.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Agitador de tubos tipo “Vórtex”.
- 3.2. Água destilada.
- 3.3. Balança analítica.
- 3.4. Marcador de recipientes e tubos.
- 3.5. Micropipetas automáticas e ponteiiras.
- 3.6. Microtubos para 1,5 a 2 mL.
- 3.7. Padrão certificado da substância teste.
- 3.8. Pérolas de vidro com diâmetro entre 4 e 6 mm.
- 3.9. Pipetas tipo Pasteur (2 mL) descartáveis.
- 3.10. Proveta graduada de 100 mL.
- 3.11. Ração para gatos macerada.
- 3.12. Recipientes em plástico de cor branca com 7 cm de diâmetro e altura , volume para 180-200 mL;
- 3.13. Sistema –teste:
  - 3.13.1. *Aedes aegypti*, larvas no início do 4º instar (cápsu

la cefálica de cor clara), mantidas em insetário com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (24 a 28°C, 60 a 80% e 10:14 h claro/escuro, respectivamente), alimentados com dieta específica.

3.13.2. *Culex quinquefasciatus*, larvas no início do 4º instar (cápsula cefálica de cor clara), mantidas em insetário temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (24 a 28°C, 60 a 80% e 10:14 h claro/escuro, respectivamente), alimentados com dieta específica.

3.14. Solução de álcool etílico a 70%.

3.15. Solução de hipoclorito de sódio a 2%.

3.16. Tubos para 15 a 20 mL.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Seis concentrações da substância-teste que promovam mortalidade dose-crescente entre 10 e 95%, e um controle não tratado, por ensaio;

4.1.1.2. Três replicatas por concentração e por controle não tratado, por ensaio;

4.1.1.3. No de larvas por replicata: 20; usar lotes homogêneos de larvas.

4.1.1.4. Três repetições válidas do ensaio, realizadas em datas diferentes, para estabelecer a média dos resultados da CL50 da substância-teste.

4.1.1.5. Realizar o mesmo procedimento com o padrão.

4.1.2. Os ensaios deverão ser realizados em bancada higienizada com solução de álcool etílico a 70 %, em sala individual sob as mesmas condições (temperatura, umidade e fotoperíodo) de manutenção das larvas.

4.1.3. No grupo controle é aceitável uma mortalidade de 0 a 5% da amostra sem correção e de 5% a 10% mediante correção da mortalidade dos grupos tratados com a fórmula de Abbott. Desconsiderar o ensaio quando a mortalidade for maior do que 10%.

4.1.4. Descartar, ao término do ensaio, o conteúdo dos recipientes em balde contendo solução de hipoclorito de sódio diluída 100 vezes (Ex: para 5 L de descarte adicionar 50 mL da solução de hipoclorito).

4.1.5. Após 24 h descartar o material.

## 4.2. Específico

4.2.1. Preparar uma suspensão (A) da substância-teste a 5 g/L ( 50 mg da substância-teste + 10 mL de água destilada) em tubo contendo 15 pérolas de vidro e manter sob agitação no Vórtex por 10 minutos.

4.2.2. Preparar uma suspensão (B) a 50 mg/L (0.1 mL A + 9.9 mL de de água destilada) e manter sob agitação no Vórtex por 3 minutos. Alíquotas desta suspensão adicionadas aos recipientes correspondem às concentrações relacionadas na tabela abaixo:

Alíquotas $\mu\text{L}$ suspensão B (50 mg/L)*	Concentração (mg/L) final no recipiente*
160	0.08
80	0.04
60	0.03
40	0.02
20	0.01
16	0.008
10	0.005

\* Estas concentrações são sugeridas com base na potência do padrão. Outras concentrações poderão ser utilizadas com base na potência da substância teste.

4.2.3. Preparar os recipientes contendo 100 mL de água destilada e 20 larvas e identificá-los com a concentração utilizada ou como controle.

4.2.4. Tratar cada recipiente distribuindo, lenta e uniformemente na superfície da água, a alíquota da suspensão B necessária para atingir a concentração final desejada.

4.2.5. Se a alíquota utilizada for superior a 1,0 mL é necessário retirar, antes, o mesmo volume da água do recipiente.

- 4.2.6. Quando a substância-teste for a base *Bacillus sphaericus*, adicionar uma pequena quantidade de ração.
- 4.2.7. A determinação da mortalidade das larvas nos recipientes é feita 24 ou 48 horas após a aplicação da substância-teste à base de *Bacillus thuringiensis* ou *B. sphaericus*, respectivamente, com base no nº de larvas sobreviventes.
- 4.2.8. O número de larvas mortas em cada replicata é igual a 20 menos o nº de larvas vivas. Ocorrendo a presença de pupas nos recipientes deve ser registrada e seu número excluído do total de indivíduos expostos.

## 5. Tratamento Estatístico

O cálculo da CL50 da substância-teste em cada ensaio é feito por regressão linear Log-Probit a partir da curva de concentração (mg/L)- mortalidade (%) obtida no ensaio.

## 6. Resultados

O teste será considerado satisfatório quando a variação da potência declarada e obtida no ensaio for de  $\pm 10\%$ .

## Teste de Eficácia em Produtos Larvicidas Biológicos

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de larvicidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* e/ou *B. sphaericus* para culicídeos, sob condições de laboratório.

### 2. Definições

- 2.1. Larva morta: aquela que não realiza deslocamento na coluna de água do recipiente teste quando recebe estímulo tátil.
- 2.2. Sistema – teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos que se definam como objeto de estudo.

- 2.3. Substância-teste: é qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Recipientes-teste em plástico resistente, opaco, de cor escura, com dimensões aproximadas de 44 cm de diâmetro e 58 cm de altura, volume para 60 L, tampa com tela de nylon de malha fina.
- 3.2. Água de torneira desclorada (48 h).
- 3.3. Balança analítica.
- 3.4. Marcador de recipientes.
- 3.5. Etiquetas autocolantes.
- 3.6. Borrifador (tipo jardinagem).
- 3.7. Pipetas sorológicas (10 mL).
- 3.8. Pipetador automático ou “pêra”.
- 3.9. Cubas em plástico de cor branca, dimensões (cm) aproximadas de 10 (largura) X 20 (comprimento) X 4 (altura).
- 3.10. Ração para gatos macerada.
- 3.11. Solução de hipoclorito de sódio a 2%.
- 3.12. Sistema –teste:
  - 3.12.1. *Aedes aegypti*, larvas no início do 4º instar (cápsula cefálica de cor clara), mantidas em insetário com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (24 a 28°C, 60 a 80% e 10:14 h claro/escuro, respectivamente), alimentados com dieta específica.
  - 3.12.2. *Culex quinquefasciatus*, larvas no início do 4º instar (cápsula cefálica de cor clara), mantidas em insetário temperatura, umidade e fotoperíodo controlados (24 a 28°C, 60 a 80% e 10:14 h claro/escuro, respectivamente), alimentados com dieta específica.

### 4. Procedimento Experimental

#### 4.1. Geral

- 4.1.1. Delineamento experimental:
  - 4.1.1.1. Utilizar a concentração da substância-teste recomendada pelo fabricante para ser submetida à verificação da eficácia.

- 4.1.1.2. Três replicatas da concentração e do controle não tratado, por teste;
- 4.1.1.3. No de larvas por replicata: 200 larvas de lotes homogêneos.
- 4.1.1.4. Três repetições válidas do teste, realizadas em datas diferentes, para estabelecer a média dos resultados de mortalidade da substância-teste.
  - 4.1.2. Os ensaios deverão ser realizados em sala sob as mesmas condições (temperatura, umidade e fotoperíodo) de manutenção das larvas.
  - 4.1.3. No grupo controle é aceitável a mortalidade de até 10%, desconsiderar o ensaio quando a mortalidade for maior do que 10%.
  - 4.1.4. Adicionar aos recipientes, ao término do ensaio, solução de hipoclorito de sódio diluída 100 vezes (Ex: para 50 L adicionar 0,5 L da solução de hipoclorito de sódio).
  - 4.1.5. Após 24 h descartar conteúdo dos recipientes.

## 4.2. Específico

- 4.2.1. Preparar a amostra da substância-teste segundo a “menor dose” recomendada pelo fabricante no rótulo (adaptar ao volume ou superfície do recipiente-teste).
- 4.2.2. Preparar os recipientes contendo 50 L de água declorada, colocar as larvas, adicionar 200 mg de ração e identificá-los com a concentração utilizada, ou como controle.
- 4.2.3. Para formulações líquidas diluir a dose necessária em 30 ml de água de torneira, aplicar sobre a superfície da água do tanque com o borrifador. Utilizar uma barreira durante a aplicação para evitar contaminação dos recipientes próximos. Para formulações em grânulo pesar a dose necessária e distribuir manualmente os grânulos sobre a superfície da água. Para comprimidos depositar delicadamente o comprimido sobre a superfície da água no centro do recipiente; no caso de 2 ou mais comprimidos, distribuir uniformemente, nunca depositá-los juntos.
- 4.2.4. A determinação da mortalidade das larvas nos recipientes é feita 24 ou 48 horas após a aplicação da substância-teste à base de *Bacillus thuringiensis* ou *B. sphaericus*, respectivamente,

com base no nº de larvas sobreviventes coletadas com pipeta e transferidas para contagem em cubas.

- 4.2.5. O número de larvas mortas em cada replicata é igual ao nº total de larvas introduzidas menos o nº de larvas vivas. Ocorrendo a presença de pupas nos recipientes deve ser registrada e seu número excluído do total de indivíduos expostos.

## 5. Resultados

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade for de  $90 \pm 10\%$  nos recipientes-teste no período da avaliação.

## **Teste de Eficácia Curativo para Cupins de Madeira Seca**

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de cupinicidas para uso em madeira seca como tratamento curativo.

### 2. Definições

- 2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.2. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.3. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Corpo de prova (madeira previamente infestada pela praga)

medindo 50x10x 1cm de comprimento, largura e espessura, respectivamente.

- 3.2. Pulverizador manual em aço inoxidável com vazão constante, pressão de 40 lb / pol<sup>2</sup> e bico leque 8002.
- 3.3. Dosador automático para aplicações de aerossol.
- 3.4. Termohigrômetro.
- 3.5. Pincel.
- 3.6. Seringas.
- 3.7. Tanques para imersão.
- 3.8. EPI's.
- 3.9. Sistema-teste:
  - 3.9.1. Criptotermes brevis

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Geral

- 4.1.1. Separar 24 corpos de prova em ambiente controlado com temperatura entre 23 e 27°C e umidade relativa do ar entre 50 e 70% e ciclos claro/escuro de 12 horas.
- 4.1.2. Momentos antes do início do ensaio selecionar doze corpos de prova para tratamento com a substância teste e doze com o controle.
- 4.1.3. Realizar a aplicação de acordo com a recomendação do fabricante, utilizando pulverização, doseamento automático, pincelamento, injeção ou imersão.
- 4.1.4. Realizar avaliações semanais de mortalidade até no máximo 60 (sessenta) dias.

OBS: As avaliações devem ser realizadas através de aberturas parciais em cada um dos corpos de prova.

### 4.2. Específico

- 4.2.1. Líquidos: preparar a calda na concentração e indicações de uso informadas pelo fabricante. Poderá ser utilizado um pulverizador manual de vazão e pressão constantes de 40 lb/pol<sup>2</sup>, com bico de leque 8200. Realizar as aplicações a 30 cm da superfície a ser tratada.
- 4.2.2. Sólidos: polvilhar a substância-teste de com a quantidade in-

dicada pelo fabricante, utilizando um polvilhador manual ou a própria embalagem do produto. Aplicar a uma distância de 30 cm.

- 4.2.3. Aerossol: utilizar um dosador automático ou aplicar manualmente, com auxílio de um tubo de PVC de 30 cm de altura por 20 cm de diâmetro.
- 4.2.4. Pronto-uso: utilizar a própria embalagem, por exemplo, bomba de Fritz ou pulverizador similar.
- 4.2.5. Pincelamento: pincelar uniformemente a madeira, utilizando a dose e volume indicados pelo fabricante.
- 4.2.6. Imersão: imergir a madeira, utilizando a dose e volume de calda indicados pelo fabricante.

## 5. Resultados

A substância teste será considerada satisfatória se o valor médio da mortalidade for de  $90 \pm 10\%$ , sendo calculada de acordo com Abbott (1925).

## Teste de Eficácia Preventivo / Residual para Cupins de Madeira Seca

### 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia de cupinicidas para uso em madeira seca como tratamento preventivo/residual para cupins.

### 2. Definições

- 2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.2. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.3. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotec-

nológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

### 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Corpo de prova 15 x 15 cm (madeira não infestada, “pinus”, ou seguir a indicação do fabricante).previamente infestada pela praga) medindo 50x10x 1cm de comprimento, largura e espessura, respectivamente.
- 3.2. Pulverizador manual em aço inoxidável com vazão constante, pressão de 40 lb / pol<sup>2</sup> e bico leque 8002.
- 3.3. Dosador automático para aplicações de aerossol.
- 3.4. Termohigrômetro.
- 3.5. Pincel.
- 3.6. Seringas.
- 3.7. Tanques para imersão.
- 3.8. EPI's.
- 3.9. Sistema-teste:
  - 3.9.1. Criptotermes brevis

### 4. Procedimento Experimental

#### 4.1. Geral

- 4.1.1. Separar uma quantidade de corpos de prova de acordo com o tempo de efeito residual desejado, onde cada tempo deve conter quatro corpos de prova para o tratamento controle e quatro para o tratamento com a substância teste.
- 4.1.2. Aplicar o produto (vide 4.2.).
- 4.1.3. Após a secagem dos corpos de prova, introduzir os mesmos em ambiente controlado com temperatura entre 23 e 27°C e umidade relativa do ar entre 50 e 70%.
- 4.1.4. Separar 200 cupins previamente climatizados e realizar infestação de 25 insetos sobre as superfícies de cada uma das repetições.
- 4.1.5. Manter em exposição durante 20 minutos, sendo retirados e introduzidos em madeiras isentas de tratamento para posteriores avaliações de mortalidade em 24, 48 e 72 horas.

4.1.6. Avaliar semanalmente a mortalidade, dentro do tempo recomendado pelo fabricante, mantendo os corpos de prova tratados inicialmente em prateleiras, em ambiente com umidade e temperaturas controlados ( 23 a 27° C e 50 a 70 % de umidade relativa) e ciclos de claro-escuro de 12 horas.

## 4.2. Específico

4.2.1. Líquidos: preparar a calda na concentração e indicações de uso informadas pelo fabricante. Poderá ser utilizado um pulverizador manual de vazão constante e pressão de 40 lb/pol<sup>2</sup>, com bico de leque 8200. Realizar as aplicações a 30 cm da superfície a ser tratada.

4.2.2. Sólidos: polvilhar a substância-teste de com a quantidade indicada pelo fabricante, utilizando um polvilhador manual ou a própria embalagem do produto. Aplicar a uma distância de 30 cm.

4.2.3. Aerossol: utilizar um dosador automático ou aplicar manualmente, com auxílio de um tubo de PVC de 30 cm de altura por 20 cm de diâmetro.

4.2.4. Pronto-uso: utilizar a própria embalagem, por exemplo, bomba de Fritz ou pulverizador similar.

4.2.5. Pincelamento: pincelar uniformemente a madeira, utilizando a dose e volume indicados pelo fabricante.

4.2.6. Imersão: imergir a madeira, utilizando a dose e volume de calda indicados pelo fabricante.

## 5. Resultados

A substância teste será considerada satisfatória se o valor médio da mortalidade for de 90±10%, sendo calculada de acordo com Abbott (1925).

# Teste de Eficácia em Laboratório Frente a Cupim Subterrâneo

## 1. Objetivo

Estabelecer a metodologia a ser adotada para avaliação da eficácia, em laboratório, frente a cupins subterrâneos.

## 2. Definições

- 2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.
- 2.2. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.
- 2.3. Substância-teste: qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

## 3. Materiais e Reagentes

- 3.1. Corpo de prova 1 x 1 x 5 de largura, espessura e comprimento, respectivamente (madeira “ pinus” não infestada pela praga e isenta de tratamento).
- 3.2. Tubo de vidro de 2 cm de diâmetro interno por 6 cm de altura.
- 3.3. Funil plástico.
- 3.4. Placa de Petri.
- 3.5. Balde plástico.
- 3.6. Trado.
- 3.7. EPI's.
- 3.8. Sistema-teste:
  - 3.8.1. Nasutitermes sp.
  - 3.8.2. Coptotermes gestroi.

## 4. Procedimento Experimental

### 4.1. Aplicação da Substância-teste

- 4.1.1. Diluir a substância teste de acordo com a recomendação do fabricante, com o auxílio de um funil aplicar a calda em 1 metro linear sobre o solo, distribuindo este volume a cada 20cm dentro de orifícios, medindo 10mm de diâmetro por 20cm de profundidade.
- 4.1.2. Vinte e quatro horas após a aplicação, com o auxílio de um trado, coletar porções de solo entre os orifícios que receberam a aplicação, sendo todo o conteúdo amostrado transferido para um balde plástico, sendo este solo homogeneizado e acondicionado em ambiente controlado com temperatura entre 23 e 27°C e umidade relativa do ar entre 50 e 70%.

### 4.2. Preparo de Ensaio

- 4.2.1. Introduzir 20 g de solo previamente homogeneizado em tubos de vidro e posicionar verticalmente sobre uma placa de Petri.
- 4.2.2. Introduzir os corpos de prova no interior dos tubos na parte superior do solo.
- 4.2.3. Infestar sobre estes corpos de prova, 48 operários e 2 soldados em cada repetição.
- 4.2.4. Os insetos deverão ser incubados em ambiente controlado (temperatura entre 23 e 27°C e umidade relativa do ar entre 50 e 70%) e ciclos claro-escuro de 12 horas.
- 4.2.5. Realizar avaliações do número de insetos vivos, mortos e sinais de ataque nos corpos de prova durante 15 dias.

## 5. Resultados

A substância teste será considerada satisfatória se o valor médio da mortalidade for de  $90 \pm 10\%$ , sendo calculada de acordo com Abbott (1925). O ensaio será considerado válido se no tratamento controle ocorrer sinais de ataque dos cupins e tendo como tolerância uma mortalidade máxima de 20% no período de 15 dias.





**ANVISA**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ministério  
da Saúde

