
Impugnação PE 0046/2025

De : PES COM IMP EXP LTDA <pes.gerencial@gmail.com>

qua., 07 de mai. de 2025 11:07

Assunto : Impugnação PE 0046/2025 1 anexo**Para :** licitacao@imbe.rs.gov.br**Cc :** Felipe Pes <pescomercio@gmail.com>

Bom dia,

PES Comércio, Importação e Exportação LTDA., pessoa jurídica de direito privado estabelecida na Rua Mariante, 794/Fundos, Bairro Rio Branco, em Porto Alegre/RS, CEP.: 90.430-180, inscrita no CNPJ sob n.º 68.833.227/0001-51, neste ato representada por seu Sócio Administrador, Sr. Felipe Antônio Pes, inscrito no CPF sob n.º 183.878.610-49, com Contrato Social em anexo (Doc. 01), vem respeitosamente, perante Vossa Senhoria e Vossa Excelência para apresentar IMPUGNAÇÃO, ao Edital de Pregão em epígrafe, nos termos do disposto no Edital no seu subitem 9.1, c/c o artigo 164 da Lei 14.133/21, pelos fundamentos de fato e de direito expostos nas Razões que seguem em anexo.

Solicito confirmar o recebimento deste, por favor.

Atenciosamente,

Felipe Pes

Pes Com Imp Exp Ltda

 **Impugnação Edital PE 46-25 Imbé-Ass-.pdf**5 MB



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

ILUSTRÍSSIMO(A) SENHOR(A) PREGOEIRO(A) E EXCELENTÍSSIMO SENHOR PREFEITO MUNICIPAL DO MUNICÍPIO DE IMBÉ/RS.

Pregão Eletrônico 046/2025.

PES Comércio, Importação e Exportação LTDA., pessoa jurídica de direito privado estabelecida na Rua Mariante, 794/Fundos, Bairro Rio Branco, em Porto Alegre/RS, CEP.: 90.430-180, inscrita no CNPJ sob n.º 68.833.227/0001-51, neste ato representada por seu Sócio Administrador, Sr. Felipe Antônio Pes, inscrito no CPF sob n.º 183.878.610-49, com Contrato Social em anexo (Doc. 01), vem respeitosamente, perante Vossa Senhoria e Vossa Excelência para apresentar

IMPUGNAÇÃO,

ao Edital de Pregão em epígrafe, nos termos do disposto no Edital no seu subitem 9.1, c/c o artigo 164 da Lei 14.133/21, pelos fundamentos de fato e de direito expostos nas Razões que seguem.

Requer o recebimento da presente Impugnação para determinar a ANULAÇÃO do certame com a RETIFICAÇÃO do Edital para republicá-lo com correção às questões apontadas nesta e, acaso assim não entenda Vossa Senhoria, a remessa dos autos ao Exmo. Sr. Prefeito Municipal do Município para julgamento por superior instância.

Nestes termos,
Pede deferimento.

Porto Alegre, 06 de maio de 2025.

PES COMERCIO
IMPORTACAO E
EXPORTACAO
LTDA:68833227000151

Assinado de forma digital por PES
COMERCIO IMPORTACAO E
EXPORTACAO
LTDA:68833227000151
Dados: 2025.05.07 10:49:21 -03'00'

**Felipe Antônio Pes,
CPF 183.878.610-49,
Sócio-administrador.**

Com Assessoria Jurídica, nos termos do §2º-A, do art. 2º, da Lei Federal 8.906/94, de:

**Armenio de Oliveira dos Santos,
Mestre em Direito e Advogado.
OAB/RS 48.458**



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

ILUSTRÍSSIMO(A) SENHOR(A) PREGOEIRO(A) E EXCELENTÍSSIMO SENHOR PREFEITO MUNICIPAL DO MUNICÍPIO DE IMBÉ/RS.

Pregão Eletrônico 046/2025.

IMPUGNANTE: PES Comércio, Importação e Exportação LTDA

IMPUGNADO: Edital do Pregão Eletrônico 046/2025.

RAZÕES DE IMPUGNAÇÃO Eméritos Julgadores

I- DA TEMPESTIVIDADE DA IMPUGNAÇÃO.

O Edital prevê em seu subitem 9.1 como prazo para Impugnação "*Até três (03) dias antes da data fixada, para recebimento das propostas*", sendo que a data de recebimento das propostas é 22/05/2025.

Por sua vez, o art. 164 da Lei 14.133/21 é expresso que "*qualquer pessoa é parte legítima para impugnar edital de licitação por irregularidade na aplicação desta Lei ou para solicitar esclarecimento sobre os seus termos, devendo protocolar o pedido até 3 (três) dias úteis antes da data de abertura do certame.*"

Desta forma, considerando a data de recebimento de propostas, é tempestiva a presente Impugnação, conforme o subitem 9.1 do Edital e o art. 164 da Lei 14.133/21, devendo a mesma ser recebida, processada e provida pelas razões próprias que nesta se aduz.

II - PRELIMINAR DE INCOMPETÊNCIA DO PREGOEIRO PARA DECIDIR SOBRE A IMPUGNAÇÃO.

A Lei 14.133/21 traz no § 5º do art. 8º que:

§ 5º Em licitação na modalidade pregão, o agente responsável pela condução do certame será designado pregoeiro.

Tal previsão, contudo, não define quem da Administração será competente para decidir sobre Impugnações interpostas, o que, neste caso, deverá ser a Exma. Sra. Prefeita Municipal, a qual é a Autoridade máxima, ouvidos os respectivos setores técnicos.

No entanto, o certo é que a competência para tanto não poderá ser somente do Pregoeiro, pois que isto está em desacordo com a própria Lei do Pregão e com o sistema Recursal em licitações, na medida em que a Impugnação se caracteriza como um Recurso e, assim, ela DEVERÁ ser remetida à Autoridade Superior, o Excelentíssimo Senhor Prefeito Municipal, para decisão fundamentada.

Sobre esta incompetência para admissibilidade temos a doutrina de Niebuhr¹, ainda quando da Lei 10.520/02, a qual analogicamente ainda persiste à luz da nova Lei 14.133/21, como se vê:

¹ NIEBUHR, Joel de Menezes. *Pregão Presencial e Eletrônico*. 6ª ed., Belo Horizonte/MG: Editora Fórum, 2011. p. 221, 222 e 361.



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

Como dito, a **Lei nº 10.520/02 não prescreve a quem o Recurso Administrativo deve ser dirigido e quem é o agente competente para apreciá-lo. Diante da omissão da Lei nº 10.520/02, deve-se aplicar o §4º do art. 109 da Lei nº 8.666/93**, cujo teor determina que o recurso deve ser dirigido à autoridade superior, por intermédio do pregoeiro, que pode rever sua posição. Aliás, **no mesmo sentido, o inciso III do artigo 7º do Decreto Federal nº 3.555/00 prescreve à autoridade competente a atribuição de decidir os recursos contra atos do pregoeiro.**

Aliás, **é fora de dúvida que o pregoeiro não tem competência para decidir sobre o recurso.** Ora, o ato contra o qual é interposto o recurso é de autoria do próprio pregoeiro. Se o pregoeiro fosse competente para decidir o recurso, em vez de recurso, dever-se-ia falar em *pedido de reconsideração*. **É sabido que o recurso implica em reanálise de dada questão por autoridade hierarquicamente superior a quem produziu o ato objeto do recurso.** Quando quem produziu o ato é quem decide, não se trata de recurso, mas de *pedido de reconsideração*.

Em vista de tais considerações, parte-se da premissa de que é a autoridade competente, e não o pregoeiro, quem deve decidir, em definitivo, o recurso. **Ao pregoeiro, na forma do §4º do art. 109 da Lei nº 8.666/93, é dada oportunidade para rever a sua posição. Mantida, o recurso deve ser encaminhado à autoridade competente, para decisão final e definitiva no âmbito administrativo.**

...

O recurso contra decisão do pregoeiro é dirigido à autoridade competente. Se o recurso fosse da alçada do pregoeiro ele não se chamaria *recurso*, mas *pedido de reconsideração*. **A reconsideração é dirigida ao sujeito que praticou o ato. O recurso é dirigido à outra pessoa que não aquele que praticou o ato recorrido, à autoridade superior ao pregoeiro. Pois bem, como o pregoeiro não tem competência para decidir o recurso, apenas, se for o caso, rever a sua posição, ele não exerce qualquer juízo de admissibilidade. O pregoeiro não pode recusar recurso de pronto, sem encaminhá-lo à autoridade competente.** Nada obstante isso, os sistemas eletrônicos do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, o *comprasnet*, e o do Banco do Brasil outorgam ao pregoeiro tal prerrogativa, que, **no final das contas, não encontra amparo na Lei nem do decreto e vulnera ostensivamente o princípio constitucional do devido processo legal.** (Grifamos)

Além disso, **as questões que serão postas no decorrer desta Impugnação serão eminentemente técnicas e especializadas** e que por se tratarem do âmbito do Direito Ambiental e de Saúde Pública, podem ensejar, acaso ocorra alguma ilegalidade nestes aspectos ou problema no uso do produto adquirido, responsabilidade Administrativa e, até mesmo, Penal para os Gestores das respectivas áreas envolvidas, o Sr. Secretário de Saúde, além de Agentes de Vigilância Sanitária e do Sr. Prefeito do Município, sendo necessário, para decidir este **Recurso de Impugnação**, os respectivos Pareceres Técnico-Jurídicos que a embasem.

Deste modo, acaso não ocorra o provimento da Impugnação de plano, ela **DEVERÁ** ser remetida à Autoridade Superior, o Excelentíssimo Senhor Prefeito Municipal para decisão fundamentada e baseada em Pareceres Técnicos, o que desde já **SE REQUER**.



PES • COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

III- DOS FATOS E DO DIREITO

O Edital traz no seu objeto previsto no subitem 1.1 que:

1.1 - Constitui objeto da presente licitação para Registro de Preço, visando eventual e futura aquisição de larvicidas, raticidas e inseticidas para a Vigilância em Saúde, produtos usados no combate e controle de pragas **tais como o mosquito da dengue (Aedes Aegypti)**. (G.n)

Neste aspecto o Termo de Referência traz no seu subitem 1.1 a descrição dos produtos, sendo que, quanto ao item 4, prevê:

LARVICIDA: BACILLUS THURINGIENSIS, SOROTIPO ISRAELENSES, CEPA AVALIADA E APROVADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, (COMBATE AO AEDES AEGYPTI), PARA APLICAÇÃO EM LOCAIS COM ÁGUA PARA CONSUMO, CAIXAS, CALHAS, FERRO VELHO, DEPÓSITOS E TAMBÉM EM LOCAIS DE DIFÍCIL ACESSO COM ATOMIZADOR, APRESENTAÇÃO EM POTES DE 1/2KG, COM REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE.

E para este produto, **cuja formulação é de grânulos dispersíveis em água, popularmente conhecida, para o BTI CEPA AM 6552, que é a avaliada e recomendada pela OMS, como formulação WG**, o Município procedeu ao levantamento de preços com pesquisa pelo Setor de Compras, para atendimento do art. 23, §1º, II da Lei 14.133/21, cópia anexa (Doc. 02), na página 8, **onde fixou o valor médio como R\$ 320,67**, conforme a Tabela Consolidada – Levantamento de Orçamento no item 4 constante no Edital, com as seguintes referências:

| PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, inciso II, Lei nº 14.133/2021 | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------|---------------------------|----------------------|
| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO - IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (DD/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
| Larvicida Biológico B.T.I. (Bacillus Thuringiensis) | R\$ 183,00 | R\$ 189,27 | LATA | LicitaCon | 10/9/2024 | PM DE COXILHA | 34/2024 | 09-24 | Processo de Dispensa |
| Larvicida: bacillus thuringiensis, sorotipo israelense, cepa avaliada e aprovada pela Organização Mundial de Saúde, em grânulos dispersíveis em água, (combate ao aedes aegypti), para aplicação em locais com água para consumo, calhas, cisternas, ferro velho, depósitos e também em locais de difícil acesso com atomizador, apresentação em potes de 1/2kg, com Registro no Ministério da Saúde. | R\$ 530,00 | R\$ 553,81 | UNIDADE | LicitaCon | 15/5/2024 | PM DE IMBÉ | 49/2024 | 05-24 | Pregão Eletrônico |
| Larvicida Biológico B.T.I. (Bacillus Thuringiensis variedade israelense). Formulação do tipo Suspensão Aquosa concentrada, contendo no mínimo 1,2% de Bacillus Thuringiensis variedade israelense, 1,2 | R\$ 188,00 | R\$ 194,4 | LATA | LicitaCon | 19/8/2024 | PM DE RODEIO BONITO | 20/2024 | 08-24 | Pregão Eletrônico |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI, 3.000UTI, EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, CEPA AVALIADA E APROVADA PELA OMS, PARA USO INCLUSIVE EM ÁGUA POTÁVEL, NO CONTROLE DE LARVAS DE MOSQUITOS - POTE 500G. | R\$ 520,00 | R\$ 540,87 | POTE | LicitaCon | 4/6/2024 | PM DE HORIZONTINA | 55/2024 | 06-24 | Processo de Dispensa |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI, EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA 500G | R\$ 420,00 | R\$ 440,54 | POTE | LicitaCon | 8/4/2024 | PM DE AJURICABA | 22/2024 | 04-24 | Processo de Dispensa |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI (BACILUS THURINGIENSIS ISRAELENSES) CEPA AM 65-52, GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, POTÊNCIA DE 3.000 UTI UNIDADES TOXICOLÓGICAS INTERACIONAISIMS, EMBALAGEM 500GR CEPA AVALIADA E APROVADA NA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) PARA USO INCLUSIVE EM ÁGUA POTÁVEL. | R\$ 194,20 | R\$ 200,81 | FRASCO | LicitaCon | 7/8/2024 | PM DE BOM PRINCÍPIO | 1383/2024 | 08-24 | Processo de Dispensa |

No entanto, **o preço médio aferido para este produto está equivocado, pois que o levantamento feito apresenta erros quanto às formulações apontadas e outro produto que não possui CEPA avaliada e recomendada pela OMS, como demonstraremos a seguir.**

a) A referência à Licitação 34/24 do Município de Coxilha/RS NÃO É APLICÁVEL ao produto objeto deste Edital no subitem 1.1, item 4 do TR pois ela NÃO SE REFERE À FORMULAÇÃO EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA (WG), mas sim à formulação do mesmo produto EM SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA (AS).

E assim é que está a descrição do produto no TR daquela licitação de Coxilha/RS, cópia anexa (Doc. 03), citada na Pesquisa de Preços desse Município:



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

| Item | Descrição | Qtde. | Un. | R\$ Referência |
|------|--|-------|--------|-------------------|
| 1 | Larvicida Biológico B.T.I. (BacillusThuringiensis variedade Israelensis) Formulação do tipo Suspensão Aquosa Concentrada, contendo no mínimo 1,2% de BacillusThuringiensis var. Israelensis; 1.200 UTI/mg (Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama). Sorotipo H-14, CEPA avaliada e aprovada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para uso em água potável. Com | 200 | Litros | R\$ 183,00 |

Deste modo esta referência de preço é INADEQUADA ao produto cotado de BTI CEPA AM 6552, AVALIADA E APROVADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE COM FORMULAÇÃO EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA (WG).

b) A mesma situação é aplicável à referência na pesquisa de preços da licitação 20/2024 do Município de Rodeio Bonito/RS, pois na própria descrição do produto citada na pesquisa vemos que se trata de "*Suspensão Aquosa Concentrada*", a qual, como dissemos, não é a mesma do produto objeto deste Edital no subitem 1.1, item 4 do seu TR, que pede FORMULAÇÃO EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA (WG).

Assim, esta referência de preços também não pode ser utilizada neste edital por diferir da formulação requerida neste Certame.

c) O mesmo caso é com relação à citação da licitação 1383/24 do Município de Bom Princípio/RS na pesquisa, na qual, em que pese na descrição da pesquisa constar com formulação em Grânulos, de fato esta descrição da formulação naquela licitação é de SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA (AS), como se vê no Documento de Formalização de Demanda e no TR daquele Município, cópia anexa (Doc. 04).

Portanto, esta referência de preços também não pode ser utilizada neste edital por diferir da formulação requerida neste Certame.

d) E com relação a licitação por dispensa 22/24 do Município de Ajuricaba/RS, a mesma também não pode ser utilizada como referência de preços neste certame porque, em que pese o produto ali citado seja na formulação de grânulos dispersíveis em água, o fato é que O PRODUTO NELA ADQUIRIDO FOI O CRYSTAR 3000WDG, como se vê na cotação da empresa fornecedora, cópia anexa (Doc. 05), sendo que **este produto tem como Princípio Ativo a CEPA BMP 144**, como consta em seu rótulo, cópia anexa (Doc. 06).

Ocorre que **esta CEPA BMP 144 NÃO POSSUI AVALIAÇÃO E RECOMENDAÇÃO DA OMS** e, assim, não atende ao que exige o Edital deste certame, sendo que A CEPA E O PRODUTO HOMOLOGADOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS E QUE TEM INDICAÇÃO PARA USO EM ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO É O VECTOBAC com BTI - *BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSES*, **CEPA AM 65-52**, conforme se pode verificar no link <https://encurtador.com.br/4MMh3> do WHO - *Prequalification of Medical Products (IVDs, Medicines, Vaccines and Immunization Devices, Vector Control*, página 4, bem como que na Tradução Juramentada do Registro na OMS (Doc. 07) e na Monografia da ANVISA (Doc. 08).

Ademais, o objeto do Edital deste certame menciona expressamente no seu subitem 1.1 o controle de *Aedes Aegypti* e, nesta linha, o próprio Ministério da Saúde do Brasil já emitiu a Nota Técnica Nº 39/2022-



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

CGARB/DEIDT/SVS/MS (Doc. 09) onde traz orientações para o controle de *Aedes Aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo expressa, inclusive, a recomendação de uso do BTI CEPA AM 65-52, como segue:

1. ASSUNTO

Orientação técnica para a utilização de grânulos dispersíveis em água do larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* – B, Cepa AM 65-52, 37,4% p/p e potência aproximada 3.000 Bt UTI/mg para o controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. (G.n.)

Além disso, a Nota Técnica do MS traz EXPRESSA MENÇÃO AO PRODUTO VECTOBAC e a sua recomendação para água de consumo humano, como se vê:

2.1 Característica do Produto

O larvicida VectoBac®WG – Sumitomo Chemical, à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* B, é composto de 3.000 UTI (Unidades Tóxicas Internacionais) por miligrama, cepa AM65-52, na formulação de grânulos dispersíveis em água, na concentração 37,4%, altamente eficiente para controle das formas imaturas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Figura 1).

...

2.3 Recomendações de uso

O produto possui recomendação para tratamento larvário em água de consumo humano, como por exemplo caixas d'água, tonéis, cisternas e outras formas de armazenamento), conforme descrito no WHO Guidelines for Drinking-water Quality. (G.n.)

Por fim, no seu subitem 2.7 a NT traz como "*Documentos complementares e informações adicionais*" as referências à Organização Mundial da Saúde, ao Registro na ANVISA e ao WHOPES, como segue:

- **Programa de Pré-qualificação em Controle de Vetores da Organização Mundial de Saúde (OMS – PQ-List):**
[hps://extranet.who.int/pqweb/vector-control-product/vectobac-wg](https://extranet.who.int/pqweb/vector-control-product/vectobac-wg)
- **Cepa AM 65-52:** [hps://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVCSP_B_strain_AM65-52_2012.pdf](https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVCSP_B_strain_AM65-52_2012.pdf)
- **Registro ANVISA** (número 3.2586.0013):
[hps://consultas.anvisa.gov.br/#/saneantes/produtos/q/?nomeProduto=vectobac%20wg](https://consultas.anvisa.gov.br/#/saneantes/produtos/q/?nomeProduto=vectobac%20wg)
- **WHO Guidelines for Drinking-water Quality:**
[hps://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVC-SP_B_strain_AM65-52_2012.pdf](https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVC-SP_B_strain_AM65-52_2012.pdf) (G.n.)

Logo, a referência de preços quanto a este produto adquirido em Ajuricaba/RS também não pode ser utilizada neste edital por se tratar de produto com CEPA que não possui avaliação e recomendação da OMS e que não possui recomendação do Ministério da Saúde para controle de *Aedes Aegypti*, aspectos estes previstos e exigidos no Edital deste certame.

Assim, por fim, se conclui que estas referências de preços NÃO SERVEM para a formulação WG de produto BTI CEPA AM 6552, AVALIADA E APROVADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, eis que este apresenta valores diferenciados entre as diversas formulações comercializadas, o que pode ser visto no comparativo destas pesquisas referidas como, por exemplo a referida na mesma pesquisa realizada referente à licitação 45/24 desse mesmo Município de Imbé, onde vemos o valor unitário homologado de R\$ 530,00.



PES ▪ COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA.

Rua Mariante, 794 / Fundos ▪ Bairro Rio Branco
CEP 90430.180 ▪ Porto Alegre/RS ▪ Fone: 51 3332.8433
Fax: 51 3029.8433 ▪ Cel.: 51 9964.8834
E-mail: pes.pes@terra.com.br
CNPJ: 68.833.227/0001-51 ▪ I.E.: 096/2429503

Desta maneira é que **a pesquisa de preços deve ser refeita com o estabelecimento do valor médio real de mercado para o produto efetivamente requerido no subitem 1.1, item 4 do TR**, qual seja o **LARVICIDA BACILLUS THURINGIENSIS, SOROTIPO ISRAELENSES, CEPA AVALIADA E APROVADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, (COMBATE AO AEDES AEGYPTI)**, PARA APLICAÇÃO EM LOCAIS COM ÁGUA PARA CONSUMO, CAIXAS, CALHAS, FERRO VELHO, DEPÓSITOS E TAMBÉM EM LOCAIS DE DIFÍCIL ACESSO COM ATOMIZADOR, **APRESENTAÇÃO EM POTES DE 1/2KG**, COM REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE.

IV. DO PEDIDO

Ante o exposto, se REQUER:

a) O recebimento da presente Impugnação, sua autuação e seu julgamento na forma da lei com a emissão de Pareceres Técnicos e Jurídicos para tanto e o efeito hierárquico requerido de julgamento fundamentado pela Autoridade superior; e

b) A ANULAÇÃO do certame para a REPUBLICAÇÃO do Edital em epígrafe **com a retificação do valor médio de mercado previsto na Tabela Consolidada – Levantamento de Orçamento no item 4 constante no Edital** para o produto e a formulação efetivamente requeridos no subitem 1.1, item 4 do TR, qual seja o **LARVICIDA BACILLUS THURINGIENSIS, SOROTIPO ISRAELENSES, CEPA AVALIADA E APROVADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, EM GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, (COMBATE AO AEDES AEGYPTI)**, PARA APLICAÇÃO EM LOCAIS COM ÁGUA PARA CONSUMO, CAIXAS, CALHAS, FERRO VELHO, DEPÓSITOS E TAMBÉM EM LOCAIS DE DIFÍCIL ACESSO COM ATOMIZADOR, **APRESENTAÇÃO EM POTES DE 1/2KG**, COM REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE.

Nestes termos,
Pede deferimento.

Porto Alegre, 06 de maio de 2025.

PES COMERCIO
IMPORTACAO E
EXPORTACAO
LTDA:68833227000151

Assinado de forma digital por PES
COMERCIO IMPORTACAO E
EXPORTACAO
LTDA:68833227000151
Dados: 2025.05.07 10:49:42 -03'00'

**Felipe Antônio Pes,
CPF 183.878.610-49,
Sócio-administrador.**

Com Assessoria Jurídica, nos termos do §2º-A, do art. 2º, da Lei Federal 8.906/94, de:

**Armenio de Oliveira dos Santos,
Mestre em Direito e Advogado.
OAB/RS 48.458**

Pelo presente instrumento particular, **FELIPE ANTONIO PES** brasileiro, casado com separação obrigatória de bens, comerciante, Carteira de Identidade sob n.º 5011373461 – SSP-RS, CPF sob n.º 183.878.610-49, residente e domiciliado a Rua Mariante n.º 784 Apto. 204, Porto Alegre - RS, Rio Branco, CEP 90.430-180; e **THIAGO SIMON PES**, brasileiro, solteiro, médico veterinário CRMV/RS sob n.º 12329, CPF sob n.º 012.230.840-94, residente e domiciliado Rua Mariante n.º 784 apto 204, Rio Branco, CEP 90.430-180, representado por **VERA PATRICIA MACHADO LEITE**, brasileira, solteira, contadora, data de nascimento 16/08/1959, documento de identidade n.º 7003751414, SJS/RS, CPF sob n.º 291.948.650-00, residente e domiciliado em Porto Alegre - RS, Avenida Teresópolis, 2120, Bairro Teresópolis, CEP 90.870-000; na qualidade de únicos sócios da sociedade de responsabilidade limitada, sob a denominação social de **PES - COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA - EPP** com sede a rua Mariante n.º 794-Fundos, Porto Alegre, RS, inscrita no CNPJ sob N.º 68.833.227/0001-51, constituída conforme instrumento arquivado na MM. Junta Comercial do estado sob N.º 43.202.556.668 em sessão do dia 11.03.93 e alterações sob os n.ºs 94/1365907, 95/1393670, 95/1426376, 97/1602240, 02/2121908, 2229112, 03/2594038, 3262442, 3812501 e 3907696 de 28.12.94, 27.03.95, 26.07.95, 29.04.97, 04.03.02, 13.03.03, 15.12.03, 09.02.10, 27.06.13 E 05.02.14 e resolvem de comum acordo e na melhor forma de direito o que segue:

DA RETIRADA E INGRESSO DE NOVO SÓCIO

1 – Retira-se da sociedade o sócio **THIAGO SIMON PES**, que é detentor de 2.500 quotas no valor de R\$ 2.500,00 (Dois mil e quinhentos reais) que as possui livre e desembaraçadas de qualquer ônus, vende e transfere neste ato a **ISABEL CRISTINA GIEHL**, brasileira, bióloga, solteira, nascida em 29.09.1985 natural de Porto Alegre – RS, inscrita no CPF sob o n.º 006.480.650-22, CI 1079425466 SJS-RS, residente e domiciliada em São Leopoldo a Rua São Paulo 927/102, Centro, CEP 93.010-170, representada por **VERA PATRICIA MACHADO LEITE**, brasileira, solteira, contadora, data de nascimento 16/08/1959, documento de identidade n.º 7003751414, SJS/RS, CPF sob n.º 291.948.650-00, residente e domiciliado em Porto Alegre - RS, Avenida Teresópolis, 2120, Bairro Teresópolis, CEP 90.870-000; dando pela presente, plena, geral, rasa e irrevogável quitação, nada mais tendo a reclamar presente ou futuramente.

2 – Em virtude de ingresso da nova sócia e da cessão e transferência de quotas conforme item precedente o capital social no valor de R\$ 25.000,00 (vinte e cinco mil reais) dividido em 25.000 quotas no valor nominal de R\$ 1,00 (um real) cada uma totalmente integralizado em moeda corrente do País permanece inalterado assim distribuídas:

- a) **FELIPE ANTONIO PES**, com 22.500 quotas no valor deR\$ 22.500,00
- b) **ISABEL CRISTINA GIEHL** com 2.500 quotas no valor de R\$ 2.500,00

Parágrafo Primeiro - A responsabilidade de cada um dos sócios é restrita ao valor de suas quotas, mas todos respondem solidariamente pela integralização do capital social.

3 – A sociedade limitada tem por objeto: - O Comércio varejista, atacadista, importações e exportações de produtos agropecuários, sementes, adubos, defensivos agrícolas, produtos de uso veterinários, produtos agrícolas, domissanitários, saneantes (saúde ambiental), distribuição de saneantes, implementação e máquinas agrícolas e equipamentos.

4 – O nome fantasia será “**P&G PRODUTOS DOMISSANITARIOS**”

5 - A administração da sociedade e a responsabilidade técnica perante as repartições e órgãos fiscalizadores caberá ao sócio **FELIPE ANTÔNIO PES**, com poderes e atribuições de administrar os negócios sociais, representando ativo e passivamente a sociedade, para qual usará a firma, vedada, no entanto, o uso da denominação social em atividades estranhas ao interesse social ou assumir obrigações seja em favor de qualquer dos quotistas ou de terceiros, bem como onerar ou alienar bens imóveis da sociedade, sem autorização do outro sócio.

A vista das modificações ora ajustada consolida-se o contrato social, com a seguinte redação.



CONSOLIDAÇÃO DO CONTRATO SOCIAL

I - DA DENOMINAÇÃO, SEDE, FORO, OBJETO, DURAÇÃO E NATUREZA JURIDICA

Cláusula I - A sociedade gira sob a denominação social **PES - COMÉRCIO IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA - EPP** e terá como nome fantasia "**P&G PRODUTOS DOMISSANITARIOS**"

Cláusula II - A sociedade tem sua sede e foro em Porto Alegre - RS, a Rua Mariante nº 794 Fundos, Rio Branco, CEP 90.430-180, podendo, por deliberação dos sócios instalar ou suprimir filiais e/ou escritório em qualquer parte do território nacional.

Cláusula III - A sociedade limitada tem por objeto:

O Comércio varejista, atacadista, importações e exportações de produtos agropecuários, sementes, adubos, defensivos agrícolas, produtos de uso veterinários, produtos agrícolas, domissanitários, saneantes (saúde ambiental), distribuição de saneantes, implementação e máquinas agrícolas e equipamentos.

Cláusula IV - A sociedade iniciou suas atividades no dia 11 de março de 1993 e seu prazo é indeterminado.

II - DO CAPITAL SOCIAL, DA CESSÃO E TRANSFERÊNCIAS DAS QUOTAS

Cláusula V - O Capital Social é de R\$ 25.000,00 (vinte e cinco mil reais), divididos em 25.000 (vinte e cinco mil) quotas de R\$ 1,00 (um real) cada uma, subscritas e integralizadas em moeda corrente do País, assim distribuídas:

- c) **FELIPE ANTONIO PES**, com 22.500 quotas no valor deR\$ 22.500,00
- d) **ISABEL CRISTINA GIEHL** com 2.500 quotas no valor deR\$ 2.500,00

Parágrafo Primeiro - A responsabilidade de cada um dos sócios é restrita ao valor de suas quotas, mas todos respondem solidariamente pela integralização do capital social.

Parágrafo Segundo - Em caso de aumento de capital os sócios terão o direito de preferência para subscrição e integralização da proporção de suas quotas.

Parágrafo Terceiro - O sócio que, notificado deixar de exercer o direito de preferência até a data estabelecida para a subscrição, presumir-se-á que tenha renunciado ao seu direito.

Parágrafo Quarto - As quotas são indivisíveis e não poderão ser cedidas ou transferidas a terceiros sem o consentimento do outro sócio, a quem fica assegurado, em igualdade de condições e preço, os direitos de preferência para a sua aquisição se postam à venda, cuja formalização da cessão proceder-se-á através da competente alteração contratual.

Parágrafo Quinto: O sócio que pretender alienar suas quotas de capital, deverá notificar aos demais sócios e a sociedade, com antecedência mínima de 30 (trinta) dias, destacando as condições da negociação, para que o eventual pretendente exerça o seu direito de preferência nos termos da lei e deste contrato.

Parágrafo Sexto: O sócio dissidente das deliberações sociais, nos termos da lei e deste contrato, assegurar-se-á o direito de retirada, tendo sua quota de capital e demais haveres reembolsados nos termos e moldes das cláusulas XIV e XVI.

III - DA ADMINISTRAÇÃO

Cláusula VI - A administração da sociedade e a responsabilidade técnica perante as repartições e órgãos fiscalizadores caberá ao sócio **FELIPE ANTÔNIO PES**, com poderes e atribuições de administrar os negócios sociais, representando ativo e passivamente a sociedade, para qual usará a firma, vedada, no entanto, o uso da denominação social em atividades estranhas ao interesse social ou assumir obrigações seja em favor de qualquer dos quotistas ou de terceiros, bem como onerar ou alienar bens imóveis da sociedade, sem autorização do outro sócio.



Cláusula VII – A sociedade, por deliberação de todos os sócios, poderá ser administrada por administrador não sócio, nos termos do artigo 1061 da Lei 10.406/2002.

Cláusula VIII – Aos sócios, indistintamente, é vedada a aposição da firma em avais, endossos, fianças ou quaisquer outros favores quando alheios aos interesses e objetivos sociais, bem como a prática de atos abusivos que redundem em prejuízo da sociedade e dos demais sócios, sob pena de responder o contraventor, diretamente, pelos danos e/ou prejuízos emergentes de seus atos.

Cláusula IX – A título de “Pró-Labore”, os sócios que prestem efetivo serviço à sociedade, perceberão a remuneração que for acordada e fixada, de comum acordo, entre eles, cujo “quantum” será escriturado em conta específica.

IV - DO BALANÇO E DESTINAÇÃO DOS RESULTADOS

Cláusula X – Ao término de cada exercício social, em 31 de dezembro, o administrador prestará contas justificadas de sua administração, procedendo à elaboração do inventário, do balanço patrimonial e do balanço de resultado econômico, cabendo aos sócios, na proporção de suas quotas, os lucros ou perdas apuradas.

Parágrafo único – Os sócios poderão estabelecer a distribuição antecipada de lucros sejam eles mensal, bimensal ou trimestral desde que demonstrados.

Cláusula XI – Nos quatro meses seguintes ao término do exercício social, os sócios deliberarão sobre as contas e designarão outro administrador quando for o caso.

V - DAS DELIBERAÇÕES

Cláusula XII - As deliberações dos sócios serão tomadas em reunião observadas as seguintes formalidades:

- a) As reuniões serão convocadas, pelos administradores ou pelos sócios em igualdade de condições;
- b) Os sócios deverão ser convocados pessoalmente, por escrito, mediante recibo com antecedência de 05 (Cinco) dias em primeira convocação e de 03 (Três) dias em segunda convocação;
- c) A primeira via do documento ficará na posse do sócio e a segunda via devidamente assinada, será arquivada na sede da sociedade;
- d) A convocação deverá conter hora, dia, mês, ano e ordem do dia. Salvo motivo de força maior as reuniões ocorrerão sempre na sede da sociedade;
- e) Independentemente das formalidades previstas neste artigo será considerado regular a reunião a que comparecerem todos os sócios, ou se declarem, por escrito, ciente do local, data, hora e ordem do dia;
- f) Dos trabalhos e deliberações será lavrada a Ata em forma sumária, que será assinada pelos presentes, as quais deliberarão conforme a matéria tratada se será ou não levada o registro na Junta Comercial;
- g) Em caso de dissidência ou recusa em perceber a convocação a mesma será feita por notificação extrajudicial.

VI - DA RETIRADA OU EXCLUSÃO DE SÓCIO

Cláusula XIII - Falecendo ou interditado qualquer sócio, a sociedade continuará suas atividades com os herdeiros, sucessores e o incapaz os quais deverão no entanto, nomear de comum acordo um representante perante a sociedade.

Cláusula XIV – A apuração do sócio retirante, excluído, interdito ou falecido serão levantados com base em balanço especialmente levantado no último dia do mês ao evento, cuja formalização não poderá ultrapassar o prazo de 60 (sessenta) dias, salvo se decorridos ou faltarem apenas 90 (noventa) dias do balanço anual, ocasião em que este servirá de base, compreendendo participações no capital, nos fundos de reservas, nos lucros, créditos em conta corrente.

Cláusula XV – Encerrado o balanço especial, poderão os herdeiros, ou ainda o sócio retirante, se desejarem até o vencimento da primeira prestação de que trata a cláusula seguinte, efetuarem retiradas mensais, por conta do pagamento de seus haveres, cujo montante não excederá ao Pró-Labore que percebia o sócio quando do efetivo exercício.

Cláusula XVI – Os haveres do sócio falecido, interdito ou retirante, serão calculados em função da proporcionalidade de suas quotas de capital efetivamente integralizada, com o ativo líquido apurado na forma da Cláusula XIV, sendo feito o pagamento em até 10 (dez) parcelas mensais e consecutivas, vencendo-se a primeira 120 (cento e vinte) dias do evento. Os haveres do sócio, neste caso, serão corrigidos de acordo com as variações e correções praticadas atualmente no mercado.

Cláusula XVII – Ressalvando o disposto no art. 1030 da Lei 10406/2002, quando a maioria dos sócios, representativa de mais da metade do capital, entender que o sócio está pondo em risco a continuidade da empresa, em virtude de atos de inegável gravidade, poderá excluí-los da sociedade, mediante alteração do contrato social, desde que prevista neste a exclusão por justa causa.

Parágrafo único – Será aplicado supletivamente às regras da S.A

VII - DA LIQUIDAÇÃO DA SOCIEDADE

Cláusula XVIII – Ocorrerá à dissolução da sociedade nas hipóteses previstas nos arts. 1033 e 1087 da Lei 10406/2002 ou quando assim deliberarem os sócios, procedendo-se, nesta ocasião, a sua liquidação e, uma vez saldado todo o passivo, o ativo restante será partilhado entre os quotistas na proporção de suas cotas de capital social integralizadas.

VIII – DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Cláusula XIX - O administrador declara, sob as penas da lei, de que não está impedido 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 normas de defesa da concorrência, contra as relações de consumo, fé pública, ou a propriedade, enquanto perdurarem os efeitos da condenação.

Cláusula XX – Fica eleito o Foro de Porto Alegre para o exercício e o cumprimento dos direitos e obrigações resultantes deste contrato.

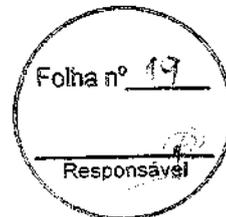
E assim por estarem justos e contratados, obrigam-se fielmente a cumprirem seus termos, assinando a presente Alteração e Consolidação Contratual em 01 (uma) via de igual teor e forma, na presença de testemunhas para que produza todos os efeitos jurídicos.

Porto Alegre, 01 de fevereiro de 2019.

FELIPE ANTONIO PES

THIAGO SIMON PES
(Representado por Vera Patricia Machado Leite)

ISABEL CRISTINA GIEHL
(Representada por Vera Patricia Machado Leite)



Demonstrativo da Pesquisa de Preços realizada Pelo Setor de Compras



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
 SECRETARIA MUNICIPAL DE ADMINISTRAÇÃO



Pesquisa de Preços – Setor de Compras

| | |
|---------------------------|---|
| ITEM SOLICITADO: | Bromadiolone 0,005% para controle de ratos, isca em blocos extrusados embalados individualmente, blocos de no máximo 25g e entregue em embalagem original de 1kg. Produto deve possuir Registro no Ministério da Saúde. |
| UNIDADE DE MEDIDA: | KG |
| QUANTIDADE: | 200 |

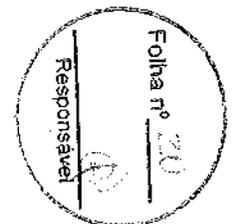
| | | | | | |
|-----------------|------------------|--------------|----------|---------------------|---|
| MEDIANA: | R\$ 60,11 | DATA: | 1/4/2025 | ITEM PEDIDO: | 1 |
|-----------------|------------------|--------------|----------|---------------------|---|

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, Inciso II, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO – IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (01/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
|---|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|--|--------------|---------------------------|----------------------|
| RATICIDA GRANULADO A BASE DE BROMADIOLONE - KG | R\$ 30,00 | R\$ 30,89 | QUILOGRAMA | LicitaCon | 2/10/2024 | PM DE SAPIRANGA | 68/2024 | 10-24 | Pregão Eletrônico |
| Raticida granulado (isca) a base de bromadiolone na concentração de 0,005%. Satche de 25 a 30g. Com prazo de validade mínimo de um ano após a data de entrega no CPPSul. - R\$ 0,48 cada sachê X 40 | R\$ 19,20 | R\$ 19,97 | QUILOGRAMA | PNCP | 14/6/2024 | 135035 - EMBRAPA PECUARIA SUL/BAGE/RS | 90002/2024 | 06-24 | Pregão Eletrônico |
| RATICIDA TIPO DOSE ÚNICA, BLOCO EXTRUSADO, COM ORIFÍCIO PARA FIXAÇÃO, PESO APROXIMADAMENTE 15 A 20 GRAMAS, PRINCÍPIO ATIVO BROMADIOLONE, PACOTE COM 01 KG | R\$ 66,00 | R\$ 66,86 | QUILOGRAMA | PNCP | 28/3/2025 | 984123 - PREF.MUN.DE BELO HORIZONTE/MG | 94192/2024 | 03-25 | Pregão Eletrônico |
| Raticida isca bloco 20g extrusado dose única, ingrediente ativo bromadiolone 0,005%/m/m. Pacote de 1kg. | R\$ 57,94 | R\$ 59,33 | Unidade | PNCP | 21/11/2024 | 1 - FUNDO MUNICIPAL SAÚDE ITATIÁI/UCU/MG | 185/2024 | 11-24 | Pregão Eletrônico |
| RATICIDA ISCA EM BLOCO EXTRUSADO PARA PRONTO USO COR VERDE. GRUPO QUÍMICO DERIVADO DA CUMARINA. PRINCÍPIO ATIVO BROMADIOLONE A 0.005. 417341 | R\$ 60,00 | R\$ 60,88 | QUILO | PNCP | 30/1/2025 | PM DE MONTES CLAROS/MG | 199/2024 | 01-25 | Pregão Eletrônico |
| RATICIDA EM BLOCO EXTRUSADO 20g | R\$ 41,43 | R\$ 42,84 | QUILOGRAMA | TCE/SC | 19/8/2024 | Fundo Municipal de Saúde de Florianópolis/SC | 161/2024 | 08-24 | Pregão Eletrônico |

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM SITES DE AMPLO DOMÍNIO - Art. 23, § 1º, inciso III, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO | DATA E HORA DA PESQUISA | NOME LOJA | ENDEREÇO DA PESQUISA |
|--|----------------|-------------------------|------------------------------|---|
| RÓDILON BLOCO EXTRUSADO 1 kg - Rodilon Bloco Extrusado Enyu é ideal para controle de ratas, ratos e camundongos. | R\$ 127,88 | 31/3/25 13:45 | TDP DISTRIBUIDOR DE PRODUTOS | https://dpprags.com.br/produto/veneno-mata-rato-roedores-rodilon-bloco-extrusado-bayer-1kg/#:~:text=R%24%20127%2C88,de%20ratas%2C%20ratos%20e%20camundongos. |
| Raticida Maki Mini Bloco 1Kg | R\$ 86,99 | 31/3/25 13:53 | MINAS RURAL | https://www.minasrural.com.br/pesquisa/371907page=1 |



TIPO DE PRODUTO
Filtrar por
MARCA CRESCENTE
Orçamento
DICAMENTOS
Itens por página
produtos



RATICIDA MAXI MIX BLOCO 1KG

R\$ 86,99

Comprar

Folha nº 21
Responsável

INSTITUCIONAL **ATENDIMENTO** **NOSSOS CANAIS** **FORMAS DE PAGAMENTO**

Conta: atendimento@minasrural.com.br | WhatsApp | Instagram

Minas Rural | (31) 99688-1677 | MINAS RURAL AGRO NEGÓCIOS LTDA

Privacidade e Cookies | Nós usamos cookies neste site para melhorar a sua experiência de usuário. Confira uma visão geral da política de privacidade. Entendi



RODILON BLOCO EXTRUSADO | 1 KG

R\$ 105,20 **R\$ 127,88**

Rodilon Bloco Extrusado Envu é ideal para controle de ratazanas, ratos e camundongos.

ADICIONAR AO CARRINHO



Situação de frete
Informe seu cep

Categorias: LINHA PROFISSIONAL, EXFIDIAS, ROEDIDAS
Tags: camundongo, rato, ratazana

Para fornecer melhor experiência ao usuário. Clique em "Aceitar" para concordar com a utilização. [Leia Política de Privacidade](#)





ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
SECRETARIA MUNICIPAL DE ADMINISTRAÇÃO



Pesquisa de Preços – Setor de Compras

| | |
|---------------------------|--|
| ITEM SOLICITADO: | Bromadiolons 0,005% para controle de ratos, em pellets parafinados embalado em pacotes/sachês individualizados de no mínimo 25g e entregue em embalagem original de 1kg. Produto deve possuir Registro no Ministério da Saúde. |
| UNIDADE DE MEDIDA: | KG |
| QUANTIDADE: | 700 |

| | | | | | | |
|-----------------|-----|--------------|-------------|----------|--------------------|---|
| MEDIANA: | R\$ | 32,74 | DATA | 1/4/2025 | ITEM PEDIDO | 2 |
|-----------------|-----|--------------|-------------|----------|--------------------|---|

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, inciso II, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO – IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (01/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
|--|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------|---------------------------|----------------------|
| RATICIDA A BASE DE BROMADIOLONE EM BLOCO PARAFINADO - KG | R\$ 31,80 | R\$ 32,74 | Quilograma | LicitaCon | 2/10/2024 | PM DE SAPIRANGA | 68/2024 | 10-24 | Pregão Eletrônico |
| RATICIDA GRANULADO 25 G – Ratomax Pellets / Brazil Química – R\$ 1,89 cada X 40 unid. | R\$ 75,60 | R\$ 77,41 | Quilograma | LicitaCon | 29/11/2024 | PM DE ENCANTADO | 21/2024 | 11-24 | Pregão Eletrônico |
| RATICIDA EM BLOCO PARAFINADO, INDICADO PARA ÁREAS EXTERNAS COM ALTO TEOR DE UMIDADE E CALOR. COMPOSIÇÃO: BROMADIOLONE 0,005% (P/P). (BLOCOS DE 20g) - CAIXA COM 12KG – r\$ 597,50 / 12kg | R\$ 49,80 | R\$ 50,45 | Quilograma | PNCP | 14/2/2025 | PM DE ARUJÁ/SP | 10/2025 | 02-25 | Processo de Dispensa |

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM SITES DE AMPLO DOMÍNIO - Art. 23, § 1º, inciso III, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO | DATA E HORA DA PESQUISA | NOME LOJA | ENDEREÇO DA PESQUISA |
|--|----------------|-------------------------|------------------|---|
| Raticida Granu.Kellmat Sc 25g 40 Unidades | R\$ 41,25 | 31/3/25 11:38 | AMAZON – ON LEVE | https://www.amazon.com.br/Raticida-Granu-Kellmat-Sc-25g-Unidades/dp/B098PN6Q7S/?ref=asc_df_B098PN6Q7S?mcid=df497857484d3efdbe932e25a3b1784c&tag=googleshopp00-20&linkCode=df0&hvadid=709908341026&hvpos=&hwnetw=g&hvrand=16423654494463375310&hvo=one=&hvptwo=&hvqmi=&hvdev=c&hvdvcmdl=&hviocini=&hvlcofhy=9220915&hvtargid=pla-2281800637848&psc=1&language=pl_BR&gad_source=4 |
| Kellmat Raticida Isca Granulado Rato e Camundongo 40 Pacotes de 25g Kelldrin | R\$ 23,90 | 31/3/25 13:55 | DASAMAX | https://www.dasamax.com.br/iscas-amadilhas/kellmat-raticida-isca-granulado-rato-e-camundongo-40-pacotes-de-25g-kelldrin?srsltid=AfmBOoqWD4cd56xvWfZ0XhYggWX53DNFvWJ8VYgSTdyN8yQU89mP8qI-Hs |
| Kellmat Raticida Granulado Sabor Queijo Mata Rato E Camundongo 1kg Kelldrin | R\$ 31,90 | 31/3/25 13:59 | STAR FERRAMENTAS | https://www.starferramentas.com.br/agropecuaria/defensivos-agricolas/raticida-kellmat-sabor-queijo-1kg-40x25g-kelldrin?parceiro=9030&srsltid=AfmBOorZqX7KrytviQZ5LaQQIGKQ31skPdnz-PJz7qorqLBJHITtoXMj16c |
| Raticida Granulado Kellmat 1kg Kelldrin | R\$ 32,50 | 31/3/25 14:06 | HAZIEL PET | https://www.hazielpet.com.br/produlos/raticida-granulado-kellmat-1kg-kelldrin?srsltid=AfmBOorZLW-P3-G_OIG6rZP8yAcXGM6zTRDSU2M48UQByOWb6ZXX5qYvw |

Folha nº 2/2
Responsável

Folha nº 23
Responsável

Caro(a) cliente(a), seja bem-vindo(a)!

7% OFF



Inicio > Casa e Jardim > Jardim > Cuidado > Manutenção > Inseticida > Raticida Granulado Kellmat 1kg Keldrin

Raticida Granulado Kellmat 1kg Keldrin

0 Perguntas

R\$35,00 ~~R\$32,50~~

- 3x de R\$10,83 sem juros
- 2% de desconto pagando com A combinar

Ver mais detalhes

- | +

Preço de envio

Ver mais opções



TELEFONE (10) 99741-532 - (10) 09828-9872

RÁSTREA INDICADA VELO PEDIDO



O que procura hoje?

Ferramentas Elétricas e Combustíveis | Ferramentas Manuais | Camping, Esporte e Lazer | Agricultura e Jardinagem | Materiais de Construção | Equipamentos de Segurança | Utilidades e Eletrodomésticos | Medicamentos Veterinários | Cortadores

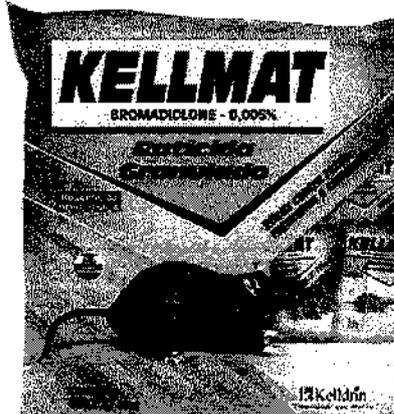
ENVIÓ PARA TODO BRASIL Com comodidade e segurança

PARCELE SUAS COMPRAS Em até 10x

DESCONTO NO BOLETO! 5%

Você está em: Home > Utilidades e Eletrodomésticos > Inseticidas e Desinfecção > Raticida > Kellmat Raticida Granulado Sabor Queijo Mata Rato E Camundongo 1kg Keldrin

VIDEO



-1%

Kellmat Raticida Granulado Sabor Queijo Mata Rato E Camundongo 1kg Keldrin

★★★★★ 0,0 avaliações

Marca: Keldrin
Referência: 032887

De R\$ 35,00 **R\$ 31,90**

R\$ 30,21 à vista com desconto
Ver informações

1 / 10

SIMULADOR DE FRETE: 00000-000 OK

Ajuda > melhor a navegação.

Fechar





ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
 SECRETARIA MUNICIPAL DE ADMINISTRAÇÃO



Pesquisa de Preços – Setor de Compras

| | |
|--------------------------|--|
| ITEM SOLICITADO: | Inseticida piretróide com ingredientes ativos, com concentração de Alfa-cipermetrina 3% m/v + Flufenoxuron 3% m/v, para combater as seguintes pragas: aranhas marrom, baratas, barbeiros, carrapatos, cascudinhos, escorpiões, formigas, moscas, mosquitos, percevejos, pulgas e traças. Produto deve possuir Registro no Ministério da Saúde. Apresentação líquida em embalagem de 1 Litro. |
| UNIDADE DE MEDIDA | UNIDADE |
| QUANTIDADE | 500 |

Adicionar linha Remover linha Atualiza preço Atualiz...

| | | |
|-----------------|------------|---------------|
| MEDIANA: | R\$ | 230,57 |
|-----------------|------------|---------------|

| | | | |
|-------------|----------|--------------------|---|
| DATA | 1/4/2025 | ITEM PEDIDO | 3 |
|-------------|----------|--------------------|---|

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, inciso II, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO - IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (01/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
|--|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|---|--------------|---------------------------|----------------------|
| Inseticida líquido ingrediente ativo Alata-cipermetrina 3%+ flufenoxuron 3% SC. Embalagem de 1 litro. | R\$ 253,33 | R\$ 259,4 | FRASCO | PNCP | 21/11/2024 | 1 - FUNDO MUNICIPAL SAÚDE ITATIAIUÇU/MG | 185/2024 | 11-24 | Pregão Eletrônico |
| INSETICIDA SUSPENSÃO CONCENTRADA ALFACIPIPERMETRINA 200 SC CLASSE PIRETROIDE. COMPOSICAO S A CIANO 3 FRASCO 1 LT 446390 | R\$ 222,98 | R\$ 226,26 | FRASCO | PNCP | 30/1/2025 | PM DE MONTES CLAROS/MG | 199/2024 | 01-25 | Pregão Eletrônico |
| Inseticida - alfa cipermetrina e flufenoxuron - Inseticida - Embalagem de 1.000 ml cada. - Inseticida associação de 30 g/L de alfa cipermetrina, um inseticida piretróide de amplo espectro de ação rápida com 30 g/L de flufenoxuron, um avançado inseticida regulador de crescimento. - Grupo químico: piretróide e benziluráa. - Nome comum: alfa cipermetrina e flufenoxuron. - Ingrediente ativo: alfa cipermetrina 3% e flufenoxuron 3% (m/v). - As empresas fornecedoras deverão se responsabilizar pelo recolhimento das embalagens e destinação correta das mesmas apresentando Certificado de destinação final, manifesto de transporte de resíduos, e nota fiscal deverá apresentar a AFE.Outros ingredientes: qsp 94% (m/v). - O produto deve possuir Registro no Ministério da Saúde. - Os produtos devem ter data de fabricação recente, e validade de no mínimo doze meses, na data de entrega do produto. - Os produtos deverão ser entregues acompanhados da Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ). - As empresas fornecedoras deverão se responsabilizar pelo recolhimento das embalagens e destinação correta das mesmas apresentando: Certificado de destinação final, manifesto de transporte de resíduos, e nota fiscal deverá apresentar a AFE. | R\$ 185,00 | R\$ 194,05 | LITRO | LicitaCon | 30/4/2024 | PM DE ERECHIM | 31/2024 | 04-24 | Pregão Eletrônico |
| ALFACIPIPERMETRINA, COMPOSIÇÃO:ASSOCIADA AO FLUFENOXUROM, CONCENTRAÇÃO:3% + 3% P/V, APRESENTAÇÃO:SUSPENSÃO CONCENTRADA | R\$ 221,67 | R\$ 230,57 | LITRO | LicitaCon | 25/6/2024 | PM DE RIO GRANDE | 56/2024 | 06-24 | Pregão Eletrônico |
| INSETICIDA ALFACIPIPERMETRINA 3%+FLUFENOXURON 3% - LITRO | R\$ 195,00 | R\$ 200,79 | LITRO | LicitaCon | 2/10/2024 | PM DE SAPIRANGA | 68/2024 | 10-24 | Pregão Eletrônico |

Folha nº 2
 Responsável

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM SITES DE AMPLO DOMÍNIO - Art. 23, § 1º, inciso III, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO | DATA E HORA DA PESQUISA | NOME LOJA | ENDEREÇO DA PESQUISA |
|--|----------------|-------------------------|-----------|---|
| Inseticida Tenopa SC Basf 1 Litro | R\$ 308,42 | 31/3/25 14:36 | AGRICAMPO | https://www.agricampo.com.br/inseticida-tenopa-sc-basf-1-litro?srsltid=AfmBOooEyq6HRfkDGIVqP_tuuMPt4KzrTw5UCoG9IsLJUZPWC9EMY_WW |
| Tenopa 1L Controle de Barbeiro Pulga Traça Mosquito Mosca Percevejo Aranha | R\$ 296,90 | 31/3/25 14:41 | AGRO SENS | https://www.sensagropet.com.br/tenopa-1l-control-de-baratas-formigas-e-mosquitos?srsltid=AfmBOoo2NoWk07_kyuMkKP5UIZ6V8jnhQzkuRA9GyzezpyEYUzXzZc |

Busca



Da cidade ao campo, a mais completa.

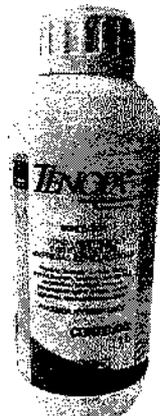


R\$ 0.00



Página inicial / AGROPECUÁRIA / IRRIGAÇÃO / FERRAMENTAS / JARDINAGEM

INSETICIDA TENOPA SC BASF 1 LITRO



100% BASF
CONTROLE DE BARBEIRO, FORMIGAS, MOSQUITO, MOSCA, PERCEVEJO, ARANHA

Preço Original

R\$ 308,42

Preço com desconto

1 **COMPRAR**

CALCULAR



ENVIAMOS PARA TODO BRASIL SAIBA MAIS



Ola, o que está procurando hoje?



Central de atendimento

Ola, undefined
Acessar Conta



Desinfetantes Jardinação Pet Shop Piscina Dedetização Pulverizadores Ferramentas e Variados

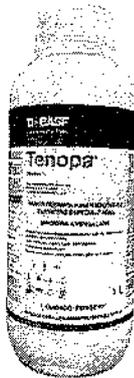
ATÉ 3X SEM JUROS
Todos os cartões de crédito

ATÉ 4% DE DESCONTO
No Pix



SITE SEGURO
Protegemos seus dados

INÍCIO DEDETIZAÇÃO BARBEIRO/MOSQUITO DA DENGUE



Tenopa 1L Controle de Barbeiro Pulga Traça Mosquito Mosca Percevejo Aranha

Código: tenopa

3x de R\$ 98,96

R\$ 296,90

R\$ 296,90

R\$ 285,02 via Pix

1

COMPRAR

Estoque Disponível

Trabalhe conosco via WhatsApp



VISA

Parcelas

1x de R\$ 296,90 sem juros
2x de R\$ 148,45 com juros

7x de R\$ 48,66
8x de R\$ 42,11





ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
 SECRETARIA MUNICIPAL DE ADMINISTRAÇÃO



Pesquisa de Preços – Setor de Compras

| | |
|-------------------|--|
| ITEM SOLICITADO: | <u>larvicida: bacillus thuringiensis, sorotipo israelenses, cepa avaliada e aprovada pela Organização Mundial de saúde, em grânulos dispersíveis em água, (combate ao aedes aegypti), para aplicação em locais com água para consumo, caixas, calhas, ferro velho, depósitos e também em locais de difícil acesso com atomizador, apresentação em potes de 1/2kg, com Registro no Ministério da Saúde.</u> |
| UNIDADE DE MEDIDA | POTE |
| QUANTIDADE | 520 |

Adicionar linha Remover linha

Atualiza preço Atualiz.

| | | |
|----------|-----|--------|
| MEDIANA: | R\$ | 320,67 |
|----------|-----|--------|

| | | | |
|------|----------|-------------|---|
| DATA | 1/4/2025 | ITEM PEDIDO | 4 |
|------|----------|-------------|---|

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, Inciso II, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO – IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (01/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
|---|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------|---------------------------|----------------------|
| Larvicida Biológico B.T.I. (Bacillus Thuringiensis) | R\$ 183,00 | R\$ 189,27 | LATA | LicitaCon | 10/9/2024 | PM DE COXILHA | 34/2024 | 09-24 | Processo de Dispensa |
| larvicida: bacillus thuringiensis, sorotipo israelenses, cepa avaliada e aprovada pela Organização Mundial de saúde, em grânulos dispersíveis em água, (combate ao aedes aegypti), para aplicação em locais com água para consumo, caixas, calhas, ferro velho, depósitos e também em locais de difícil acesso com atomizador, apresentação em potes de 1/2kg, com Registro no Ministério da Saúde. | R\$ 530,00 | R\$ 553,81 | UNIDADE | LicitaCon | 15/5/2024 | PM DE IMBÉ | 45/2024 | 05-24 | Pregão Eletrônico |
| Larvicida Biológico B.T.I. (Bacillus Thuringiensis variedade israelensis). Formulação do tipo Suspensão Aquosa concentrada, contendo no mínimo 1,2% de Bacillus Thuringiensis variedade israelensis, 1.2 | R\$ 188,00 | R\$ 194,4 | LATA | LicitaCon | 19/6/2024 | PM DE RODEIO BONITO | 20/2024 | 08-24 | Pregão Eletrônico |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI, 3.000UTI, EM GRANULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, CEPA AVALIADA E APROVADA PELA OMS, PARA USO INCLUSIVE EM ÁGUA POTÁVEL, NO CONTROLE DE LARVAS DE MOSQUITOS - POTE 500G. | R\$ 520,00 | R\$ 540,87 | POTE | LicitaCon | 4/6/2024 | PM DE HORIZONTINA | 55/2024 | 06-24 | Processo de Dispensa |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI, EM GRANULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA 500G | R\$ 420,00 | R\$ 440,54 | POTE | LicitaCon | 8/4/2024 | PM DE AJURICABA | 22/2024 | 04-24 | Processo de Dispensa |
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI (BACILUS THURINGIENSES ISRAELENSIS) CEPA AM 65-82, GRÂNULOS DISPERSÍVEIS EM ÁGUA, POTENCIA DE 3.000 UTI (UNIDADES TOXICOLÓGICAS INTERNACIONAIS)/MG, EMBALAGEM 500GR CEPA AVALIADA E APROVADA NA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OBS) PARA USO INCLUSIVE EM ÁGUA POTÁVEL. | R\$ 194,20 | R\$ 200,81 | FRASCO | LicitaCon | 7/8/2024 | PM DE BOM PRINCÍPIO | 1383/2024 | 08-24 | Processo de Dispensa |





ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
 SECRETARIA MUNICIPAL DE ADMINISTRAÇÃO



Pesquisa de Preços – Setor de Compras

| | |
|---------------------------|--|
| ITEM SOLICITADO: | larvicida: bacillus thuringiensis, sorotipo israelenses, cepa avaliada e aprovada pela Organização Mundial de saúde, em grânulos de sabugo de milho, (combate ao aedes aegypti), para aplicação em locais de difícil acesso, água com vegetação e fossa, apresentação em sacos entre 18kg a 20kg, com Registro no Ministério da Saúde. |
| UNIDADE DE MEDIDA: | SACO |
| QUANTIDADE: | 80 |

Adicionar linha Remover linha

Atualiza preço Atualiz.

| | |
|-----------------|--------------|
| MEDIANA: | R\$ 1.928,62 |
|-----------------|--------------|

| | | | |
|--------------|----------|---------------------|---|
| DATA: | 1/4/2025 | ITEM PEDIDO: | 5 |
|--------------|----------|---------------------|---|

PESQUISA DE PREÇOS BASEADA EM COMPRAS SEMELHANTES DE OUTROS ÓRGÃOS PÚBLICOS - Art. 23, § 1º, inciso II, Lei nº 14.133/2021

| ITENS SEMELHANTES | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO | VALOR UNITÁRIO HOMOLOGADO CORRIGIDO – IPCA do Período | UNIDADE DE MEDIDA | FONTE DE PESQUISA | DATA DA LICITAÇÃO | ÓRGÃO COMPRADOR | Nº LICITAÇÃO | DATA INICIAL (DD/MM/AAAA) | MODALIDADE LICITAÇÃO |
|--|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------|---------------------------|----------------------|
| LARVICIDA BIOLÓGICO BTI Bacillus thuringiensis, var israelensis; Saco de 18,14kg | R\$ 1.814,00 | R\$ 1886,82 | SACO | LicitaCon | 11/6/2024 | PM DE ALECRIM | 10/2024 | 06-24 | Pregão Eletrônico |
| LARVICIDA BIOLÓGICO - B.T.I INGREDIENTES ATIVO: BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAESENSIS CEPA AM65-52. FORMULAÇÃO: GRANULOS DE SABUGO DE MILHO-CONCENTRAÇÃO 200 UTI (UNIDADES TOXICAS INTERNACIONAIS)/MG. CEPA AVALIADA E APROVADA PELO OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE) PARA USO EM ÁGUAS, EMBALAGEM DE APROXIMADAMENTE 18 KG | R\$ 1.954,60 | R\$ 2028,8 | SACO | LicitaCon | 17/7/2024 | PM DE CHARRUA | 14/2024 | 07-24 | Pregão Eletrônico |
| larvicida: bacillus thuringiensis, sorotipo israelenses, cepa avaliada e aprovada pela Organização Mundial de saúde, em grânulos de sabugo de milho, (combate ao aedes aegypti), para aplicação em locais de difícil acesso, água com vegetação e fossa, apresentação em sacos entre 18kg a 20kg, com Registro no Ministério da Saúde. | R\$ 1.814,00 | R\$ 1895,5 | SACO | LicitaCon | 15/5/2024 | PM DE IMBÉ | 45/2024 | 05-24 | Pregão Eletrônico |
| LARVICIDA BIOLÓGICO - B.T.I. Ingrediente Ativo (Bacillus Thuringiensis variedade israelensis), CEPA AM 65-52. ormulação: Grânulos de sabugo milho 2 Concentração 200 UTI (Unidades Tóxicas Internacionais)/mg EPA avaliada e aprovada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para uso em águas. mbalagem de 18.1 kg. | R\$ 1.890,00 | R\$ 1961,75 | UNIDADE | LicitaCon | 2/7/2024 | PM DE NOVA ALVORADA | 20/2024 | 07-24 | Pregão Eletrônico |





TERMO DE REFERÊNCIA

1- OBJETO

1.1 A presente contratação tem como objeto aquisição de 200 (duzentos) litros de Larvicida Biológico, BTI (BacillusThuringiensis Variedade Israelensis), para uso no combate ao simulideo (mosquito borrachudo) na zona rural do município de Coxilha/RS.

2. JUSTIFICATIVA

2.1- A aquisição do produto é para atendimento de demanda da Secretaria de Agricultura e do Meio Ambiente, e justifica-se a aquisição devido à grande infestação do inseto nos meses mais quentes do ano e também visto a dar continuidade do processo de combate/controlado de infestação que ocorre todos os anos. Também buscamos evitar que nossos agricultores tenham maiores prejuízos seja relacionados à saúde e bem estar e socioeconômicos, como a diminuição da produção da bacia leiteira, produção de carne, saúde e bem estar animal o que afeta diretamente os animais, bem como traz prejuízos para aqueles empreendimentos que vivem da exploração da atividade do turismo (balneários/trilhas/etc.).

3. PRAZO DE ENTREGA E VIGÊNCIA DO CONTRATO

3.1- O prazo para a entrega do produto é de **10 (dez) dias** a contar do recebimento da nota de empenho, conforme a necessidade da Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente.

3.2- O contrato fica vigente por um prazo de **90 dias** a contar da data da assinatura do mesmo.

4. VALOR ESTIMADO POR ITEM

4.1- Estima-se o valor UNITÁRIO sendo:

| Item | Descrição | Qtde. | Un. | R\$ Referência |
|------|---|-------|--------|-------------------|
| 1 | Larvicida Biológico B.T.I. (BacillusThuringiensis variedade Israelensis) Formulação do tipo Suspensão Aquosa Concentrada, contendo no mínimo 1,2% de BacillusThuringiensis var. Israelensis; 1.200 UTI/mg (Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama). Sorotipo H-14, CEPA avaliada e aprovada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para uso em água potável. Com | 200 | Litros | R\$ 183,00 |



| | | | |
|---|--|--|--|
| <p>prazo de validade mínima de 24 meses a partir da data de fabricação e registro na Anvisa, para controle do simulídeo (borrachudo) contados da data de entrega. Embalagem: Caixa contendo 02 baldes de 10 litros. Os produtos deverão ser entregues acompanhados da Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ). As empresas fornecedoras deverão se responsabilizar pelo recolhimento das embalagens e destinação correta das mesmas apresentando certificado de destinação final, manifesto de transporte de resíduos, e nota fiscal deverá apresentar a AFE</p> | | | |
|---|--|--|--|

4.2- O produto deverá ser entregue em embalagem devidamente acondicionado em (baldes plásticos), hermeticamente fechados, assegurando a completa segurança durante o transporte e armazenagem do produto.

4.3- O produto deverá possuir certificação de que sua aplicação em água potável de consumo humano e animal não apresente riscos, o mesmo não poderá apresentar sinais de violação ou de utilização.

4.4- Será de responsabilidade da empresa vencedora, o recolhimento e destinação correta das embalagens vazias.

4.5- Os produtos deverão ser entregues acompanhados da Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ).

4.6- Os pedidos deverão ser entregues num prazo de 10 (dez) dias após a solicitação.

5. DAS OBRIGAÇÕES DA CONTRATADA

5.1- As partes devem cumprir fielmente as cláusulas avançadas neste contrato, respondendo pelas consequências de sua inexecução total ou parcial.

5.2- A CONTRATADA, além das obrigações estabelecidas no Edital e Anexos deve:

5.2.1- Responsabilizar-se pelo fornecimento dos produtos dentro dos padrões de qualidade, segurança, resistência, durabilidade e funcionalidade;



- 5.2.2- Fornecer e dispor de todo e qualquer material necessário à consecução do objeto;
- 5.2.3- Responsabilizar-se pelo controle de qualidade dos produtos fornecidos;
- 5.2.4- Responsabilizar-se pelos produtos a serem empregados e todos os custos de sua aquisição, transporte, armazenamento e utilização.
- 5.2.5- Manter, durante a vigência do contrato, as condições de habilitação exigidas na licitação, devendo comunicar a CONTRATANTE a superveniência de fato impeditivo da manutenção dessas condições;
- 5.2.6- Reparar, corrigir, remover, refazer ou substituir às suas expensas, no total ou em parte, o fornecimento dos produtos em que se verificar vícios, defeitos ou incorreções resultantes da sua execução.
- 5.2.7- Respeitar as normas e procedimentos de controle interno, inclusive de acesso às dependências da CONTRATANTE;
- 5.2.8- Responder pelos danos causados diretamente à Administração ou aos bens da CONTRATANTE, ou ainda a terceiros, decorrentes de sua culpa ou dolo, durante a execução deste contrato;
- 5.2.9- Em caso de irregularidades, a contratada deverá substituir, mediante notificação, num prazo máximo de 24 (vinte e quatro) horas após a notificação, no total ou em parte, o objeto da licitação quando não obedecer às condições de qualidade ou estiver em desacordo com o exigido.
- 5.2.10- Coordenar e controlar a entrega dos produtos contratados;
- 5.2.11- Responsabilizar-se por todos os encargos trabalhistas, sociais, previdenciários, fiscais ou comerciais, resultantes desta contratação;
- 5.2.12- Aceitar os acréscimos e supressões de até 25% (vinte e cinco por cento) propostos pela Administração, conforme previsto no art. 65, § 1º, da Lei Federal nº 8.666/93; quando for necessária.
- 5.2.13- Entregar o produto no Almojarifado Central situado na Avenida Ilso José Webber, 420, na cidade de Coxilha/RS.

6. DAS OBRIGAÇÕES DA CONTRATANTE

- 6.1- A CONTRATANTE, além das obrigações estabelecidas no Edital.



Estado do Rio Grande do Sul
PREFEITURA MUNICIPAL DE COXILHA

- 6.1.1- Prestar as informações e os esclarecimentos pertinentes que venham a ser solicitados pelo representante ou preposto da CONTRATADA;
- 6.1.2- Efetuar o pagamento mensal devido pela entrega do produto, desde que cumpridas todas as formalidades e exigências do contrato;
- 6.1.3- Exercer a fiscalização dos serviços prestados, por servidores designados para esse fim.
- 6.1.4- Comunicar oficialmente à CONTRATADA quaisquer falhas verificadas no cumprimento do contrato.

7. DA DOTAÇÃO ORÇAMENTÁRIA

7.1. - As despesas decorrentes da presente licitação correrão por conta das dotações:

Secretaria Municipal da Agricultura

2916-5 08.01.20.122.0004.2096 – 3.3.90.30.11.00.00;

Secretaria Municipal de Meio Ambiente

9723-3 10.01.04.541.0004.2131 - 3.3.90.30.11.00.00.

COXILHA, setembro de 2024.

JOAO EDUARDO
OLIVEIRA

MANICA:00752137026

Assinado de forma digital por

JOAO EDUARDO OLIVEIRA

MANICA:00752137026

Dados: 2024.09.09 16:36:01 -03'00'

JOÃO EDUARDO OLIVEIRA MANICA
Prefeito Municipal



Doc. 04

MUNICÍPIO DE BOM PRINCÍPIO
Estado do Rio Grande do Sul

DOCUMENTO DE FORMALIZAÇÃO DA DEMANDA
LEI FEDERAL Nº 14.133/2021
DECRETO MUNICIPAL 021/2023

Unidade Requisitante Setor/Depto/Secretaria:

Secretaria de Saúde e Assistência Social

Servidor responsável pela Requisição:

Lilian Juchem

1- Objeto:

O objeto do presente Termo de Referência é a aquisição de material para vigilância epidemiológica, inseticida para controle de pragas.

2- Quantitativos:

| Item | Descrição | Quant. | Valor unitário | Valor Total |
|------|---|--------------|----------------|--------------|
| 01 | LARVICIDA BIOLÓGICO B.T.I. (Bacillus Thuringiensis variedade Israelensis) Formulação do tipo suspensão aquosa concentrada, contendo no mínimo 1,2% de Bacillus Thuringiensis var. Israelensis; 1.200 UTI/mg (unidades tóxicas internacionais por miligrama). Sorotipo H-14, CEPA avaliada e aprovada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para uso em água potável. Para controle de larvas de mosquitos sumilídios. | 80 litros | R\$194,20' | R\$15.536,00 |

3- Justificativa:

De acordo com as Diretrizes Nacionais de Prevenção e Controle da Dengue, publicada pelo Ministério da Saúde em 2009, vários métodos de controle do Aedes podem ser utilizados rotineiramente. Alguns deles são executados no domicílio pelo morador e, complementarmente, pelo Agente de Controle de Endemias (ACE) ou pelo Agente Comunitário de Saúde (ACS). Os métodos consistem em:

- Controle mecânico: as principais atividades são a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros.
- Controle biológico: alternativa disponível para controle larvário frente ao aumento da resistência do mosquito a vários inseticidas químicos e aos danos causados por estes ao meio ambiente.
- Controle legal: consiste na aplicação de normas de conduta regulamentadas por instrumentos legais de apoio às ações de controle da dengue.
- Controle químico: consiste no uso de substâncias químicas – inseticidas – para o controle do vetor nas fases larvária e adulta.

Este mesmo documento informa ainda que o uso de Bacillus Thuringiensis israelensis (Bti) é uma alternativa disponível para o controle larvário do Aedes aegypti, baseado na existência de estudos, ensaios de laboratório e aplicação em campo, que revelou sua eficácia no controle do Aedes. Considerando as recomendações das diretrizes nacional e também a variabilidade no perfil dos depósitos tratáveis e demandas de larvicidas, faz-se necessária a aquisição de biolarvicida Bti para o tratamento de água, para serem utilizados nas atividades de controle larvário do Aedes aegypti no programa de controle das arboviroses.

4- Prazos (inicial e final):

O prazo de vigência dos contratos será de 10 dias a contar da data de emissão do empenho.



MUNICÍPIO DE BOM PRINCÍPIO
Estado do Rio Grande do Sul

5- Responsável pelo recebimento:

Lilian Juchem

6- Responsável pela fiscalização:

Lilian Juchem



MUNICÍPIO DE BOM PRINCÍPIO
Estado do Rio Grande do Sul

TERMO DE REFERÊNCIA
LEI FEDERAL Nº 14.133/2021
DECRETO MUNICIPAL 021/2023

1 - Objeto:

O objeto do presente Termo de Referência é a aquisição de material para vigilância epidemiológica, inseticida para controle de pragas.

2 - Quantidade:

| Item | Descrição | Quant. | Valor unitário | Valor Total |
|------|---|--------------|----------------|--------------|
| 01 | LARVICIDA BIOLÓGICO B.T.I. (Bacillus Thuringiensis variedade Israelensis) Formulação do tipo suspensão aquosa concentrada, contendo no mínimo 1,2% de Bacillus Thuringiensis var. Israelensis; 1.200 UTI/mg (unidades tóxicas internacionais por miligrama). Sorotipo H-14, CEPA avaliada e aprovada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para uso em água potável. Para controle de larvas de mosquitos sumifídeos. | 80 litros | R\$194,20' | R\$15.536,00 |

3- Vigência do contrato:

O prazo de vigência dos contratos será de 10 dias a contar da data de emissão do empenho.

4- Justificativa da necessidade da contratação:

De acordo com as Diretrizes Nacionais de Prevenção e Controle da Dengue, publicada pelo Ministério da Saúde em 2009, vários métodos de controle do Aedes podem ser utilizados rotineiramente. Alguns deles são executados no domicílio pelo morador e, complementarmente, pelo Agente de Controle de Endemias (ACE) ou pelo Agente Comunitário de Saúde (ACS). Os métodos consistem em:

- Controle mecânico: as principais atividades são a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros.
- Controle biológico: alternativa disponível para controle larvário frente ao aumento da resistência do mosquito a vários inseticidas químicos e aos danos causados por estes ao meio ambiente.
- Controle legal: consiste na aplicação de normas de conduta regulamentadas por instrumentos legais de apoio às ações de controle da dengue.
- Controle químico: consiste no uso de substâncias químicas – inseticidas – para o controle do vetor nas fases larvária e adulta.

Este mesmo documento informa ainda que o uso de *Bacillus Thuringiensis israelensis* (Bti) é uma alternativa disponível para o controle larvário do *Aedes aegypti*, baseado na existência de estudos, ensaios de laboratório e aplicação em campo, que revelou sua eficácia no controle do Aedes. Considerando as recomendações das diretrizes nacional e também a variabilidade no perfil dos depósitos tratáveis e demandas de larvicidas, faz-se necessária a aquisição de biolarvicida Bti para o tratamento de água, para serem utilizados nas atividades de controle larvário do *Aedes aegypti* no programa de controle das arboviroses.

5- Solução pretendida:

A solução pretendida é a aquisição de material para vigilância epidemiológica, inseticida para controle de pragas.



MUNICÍPIO DE BOM PRINCÍPIO
Estado do Rio Grande do Sul

6- Requisitos:

6.1 - Habilitação Jurídica:

- a) Registro comercial no caso de empresa individual;
- b) Ato constitutivo, estatuto ou contrato social em vigor, devidamente registrado, no caso de sociedade comercial, acompanhado de documentos de eleição de seus diretores, no caso de sociedade por ações;
- c) Decreto de autorização, em se tratando de empresa ou sociedade estrangeira em funcionamento no País, e ato de registro ou autorização para funcionamento expedido pelo órgão competente, quando a atividade assim o exigir.

6.2 - Regularidade Fiscal:

- a) Prova de inscrição no Cadastro Nacional de Pessoas Jurídicas (CNPJ/MF);
- b) Prova de inscrição no Cadastro de Contribuintes do Estado ou do Município, se houver, relativo ao domicílio ou sede do licitante pertinente ao seu ramo de atividade;
- c) Certidão Conjunta Negativa de Dívida Ativa com a União expedida pela Procuradoria da Fazenda Nacional e prova de regularidade relativa à Seguridade Social, demonstrando situação regular no cumprimento dos encargos sociais instituídos por Lei;
- d) Certidão Negativa de débitos Estadual e Municipal, sendo a última do domicílio ou sede do licitante;
- e) Prova de regularidade junto ao Fundo de Garantia por Tempo de Serviço (FGTS).
- f) Certidão Negativa de Débitos Trabalhistas, expedida pela Justiça do Trabalho.
- g) Certidão Negativa de Falência, expedida pelo distribuidor da sede da pessoa jurídica, com prazo não superior a sessenta (60) dias, contados da data do cadastro.

6.3 - Qualificação Técnica:

- a) Apresentação de comprovação de CEPA aprovada pela OMS para uso em água potável;
- b) Apresentação de AFE do Contratado e do Fabricante;
- c) Documento que comprove a certificação para uso em água potável e Registro no Ministério da Saúde da CEPA que compõe o produto ofertado.

7- Execução do objeto:

7.1 PRAZO PARA ENTREGA: até 10 dias após a emissão da nota de empenho. A empresa deverá realizar as entregas junto a Secretaria de Saúde e Assistência Social aos cuidados da servidora Lilian Juchem, fiscal do contrato.

7.2 O produto deverá apresentar formação de espuma durante o seu carreamento auxiliando na aplicação. Deverá ainda ser entregue acondicionado adequadamente, de forma a permitir completa segurança durante o transporte, em baldes plásticos de 10 litros cada, hermeticamente fechados com lacre interno e tampa.

8- Gestão do contrato:

A execução do objeto será acompanhada e fiscalizada pela Secretaria de Saúde e Assistência Social, por meio da servidora Lilian Juchem.

9- Medição e pagamento:

9.1 - O pagamento será em até 10 (dez) dias da entrega e conferência do mesmo nas condições estabelecidas neste Termo de Referência, mediante apresentação de nota fiscal onde deverá constar o número do empenho, que será conferida pela fiscal do contrato.

9.2 - O CNPJ da contratada constante na Nota Fiscal deverá ser o mesmo da documentação apresentada no processo licitatório.



MUNICÍPIO DE BOM PRINCÍPIO
Estado do Rio Grande do Sul

9.3 - A Nota Fiscal emitida pelo fornecedor deverá conter, em local de fácil visualização, a indicação do número do empenho, e a indicação da alíquota e o valor do recolhimento do imposto de renda, conforme disposto na Instrução Normativa da Receita Federal 1.234/2012 e Decreto Municipal nº 057/2022, a fim de acelerar o trâmite do documento fiscal para pagamento.

9.4 - O pagamento se dará exclusivamente mediante transferência eletrônica na conta da empresa contratada.

10- Forma e critérios de seleção:

Deverá ser realizado processo de dispensa de licitação, conforme disposto no art. 75, inciso II.

11 - Valor referência:

Valores conforme disposto no item 2 do presente Termo de Referência. Os valores estão baseados no disposto no art. 23, inciso IV da lei 14.133/2021, tendo sido obtidos por meio de pesquisa direta com no mínimo 3 (três) fornecedores, mediante solicitação formal de cotação, sendo os fornecedores escolhidos os que são de conhecimento da Secretaria de Saúde e Assistência Social, bem como que possuem cadastro junto ao departamento de compras do Município de Bom Princípio para tal objeto. Assim, deverá ser contratada a empresa **COMERCIO E REPRESENTACOES MATTIELO LTDA**, inscrita no CNPJ sob o nº **88.245.485/0001-24**, pelo valor unitário de R\$194,20 por litro, e valor total de R\$15.536,00 para a aquisição de 80 litros.

12 - Previsão orçamentária:

7 - SEC. MUN. DA SAÚDE E ASSISTÊNCIA SOCIAL

2 - FUNDO MUNICIPAL DA SAÚDE

10 Saúde

305 - Vigilância Epidemiológica

3339030000000000 material de consumo (4799)

13 - Locais e datas de entrega dos produtos e/ou prestação dos serviços:

13.1 PRAZO PARA ENTREGA: até 10 dias após a emissão da nota de empenho. A empresa deverá realizar as entregas junto a Secretaria de Saúde e Assistência Social, aos cuidados da servidora Lilian Juchem.

14 - Servidor responsável (fiscal):

Lilian Juchem.

15 - Disposições gerais:

15.1 Todos os insumos que compõem o preço, tais como materiais, aparelhos, equipamentos, veículos, assim como as despesas com impostos, taxas, frete, seguros e quaisquer outros que incidam direta ou indiretamente na execução do objeto desta licitação, correrão por conta da proponente.

Bom Princípio, 31 de julho de 2024.

Lilian Juchem
Secretária de Saúde e
Assistência Social

Lilian Juchem
Secretária de Saúde e Assistência Social



Sanigran Ltda.

Doc. 05

CNPJ 15.153.524/0001-90 | I. E. 90.588.257-08
Rua Jacob Gubaua, 250 - CEP 83507-500
Almirante Tamandaré - Paraná | Fone (41) 3151-0688
www.sanigran.com.br | alexandre@sanigran.com.br

PROPOSTA DE PREÇOS

À PREFEITURA DE AJURICABA - RS,

SANIGRAN LTDA, inscrita sob CNPJ 15.153.524/0001-90, com endereço na Rua Jacob Gubaua, 250 – Almirante Tamandaré/PR - CEP 83507-500, representada por seu sócio administrador Alexandre Stresser, CPF 046.878.919-77 e RG 8.625.888-9, apresenta sua proposta de preços relativa aos itens solicitados:

| ITEM | DESCRIÇÃO | QTDD | VALOR | TOTAL |
|------|--|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | Nebulizador costal motorizado ubv a combustão com as seguintes descrições: a) motor: 02 tempos; b) cilindrada: 64,7 cc; c) potência máxima: 4,6 hp (3,4kw); d) rotação mínima: 2.600; e) rotação máxima: 7.300; f) velocidade do ar (máxima): 90 m/s; g) volume do ar (máximo): 20 m ³ /min; h) ignição (sistema): eletrônica; i) consumo de combustível: 261 g/hp. hora; j) capacidade do tanque químico: 06 litros; k) capacidade do tanque de combustível: 02 litros; l) alcance horizontal: 18 m; m) alcance vertical: 12 m; n) vazão do líquido: entre 30 e 250 ml/min; o) peso (vazio): 11,5 kg; p) peso (cheio): 19,0 kg formulação/combustível); Marca: Guarany. | 01 Unidade | R\$ 4.000,00 | R\$ 4.000,00 |
| 2 | Larvicida biológico BTI de 500g, diluição em água Marca: Crystar 3000WDG. Fabricante: Neogen Rogama. | 10 Pacotes 500g | R\$ 420,00 | R\$ 4.200,00 |

Valor total da proposta de preços: R\$ 8.200,00 (oito mil e duzentos reais)

- **Validade da proposta:** 30 (trinta) dias
- **Prazo de entrega:** Conforme termo de referência.
- **Dados bancários da empresa:** 748 - Banco Cooperativo Sicredi
Agência: 0730
Conta-Corrente: 97480-9

Nos preços unitários e totais relativos aos itens cotados já estão inclusos todos os tributos, seguro, e quaisquer outras despesas que incidam direta ou indiretamente na realização dos serviços.

Almirante Tamandaré, 04 de abril de 2024.

Atenciosamente,


SANIGRAN LTDA.
Alexandre Stresser
Sócio Administrador

15.153.524/0001-90
SANIGRAN LTDA.
RUA JACOB GUBAUA, 250
LAMENHA GRANDE - CEP 83507-500
ALMIRANTE TAMANDARÉ - PR

INDICAÇÕES DE USO:

CRYSTAR 3000 WDG é um inseticida altamente seletivo para uso contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

CRYSTAR 3000 WDG é um inseticida estomacal que oferece uma dupla segurança, porque controla as larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* de maneira específica.

Dosagem

Larvas de *Aedes aegypti*:

Diluir 5 g do produto em 1 L de água ou aplicar a dose de 0,2 g do produto puro em 100 L de água.

Larvas de *Culex quinquefasciatus*:

Diluir 5 g do produto em 1 L de água ou aplicar a dose de 400 g do produto puro em 1 ha.

Aplicação Terrestre para Mosquito:

CRYSTAR 3000 WDG pode ser aplicado tanto diretamente como diluído em água. A aplicação direta pode ser feita manualmente (utilizando-se luvas descartáveis e máscara) com um dosador, com pulverizador costal manual ou motorizado. Colocar primeiramente a quantidade desejada de água e agitando lentamente, adicionar a quantidade requerida do produto.

COMPOSIÇÃO:

Ingrediente ativo:

Bacillus thuringiensis.....43% (p/p)
(Potência 3000 UTI/mg)

Excipientes:

Dispersante, inertes e carga.

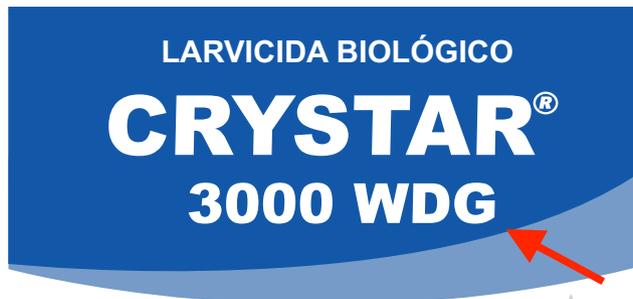
TIPO DE FORMULAÇÃO: Grânulo dispersível.

Validade:

24 meses após a data de fabricação.

Lote e data de fabricação:

Vide embalagem.



Água: pode faltar.
Não desperdice.

***Bacillus thuringiensis*,**
Cepa BMP 144

**VENDA RESTRITA A INSTITUIÇÕES
OU EMPRESAS ESPECIALIZADAS.
PROIBIDA A VENDA LIVRE**

**EFICAZ CONTRA LARVAS DE
Aedes aegypti E *Culex quinquefasciatus***



Peso Líquido: 500 g 10 kg

CUIDADO! PERIGOSO!



ANTES DE USAR LEIA COM ATENÇÃO AS INSTRUÇÕES DO RÓTULO

PRECAUÇÕES GERAIS:

CONSERVE FORA DO ALCANCE DA CRIANÇA E DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS. CUIDADO! PERIGOSA SUA INGESTÃO, INALAÇÃO OU ABSORÇÃO PELA PELE. Não aplicar sobre alimentos e utensílios de cozinha, plantas e aquários. Não fumar ou comer durante a aplicação. Durante a aplicação não devem permanecer no local pessoas ou animais domésticos. Usar equipamento de proteção individual (EPI) como roupa protetora, luvas, protetor ocular e respiratório. Advertir os usuários sobre as medidas de segurança e precauções a tomar para evitar acidentes. Manter o produto na embalagem original. Não reutilizar as embalagens vazias.

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.

PRIMEIROS SOCORROS.

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 o produto, lavar parte atingida com água em abundância 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 arejado. Em caso de ingestão acidental não provoque o vômito.

INSTRUÇÕES PARA USO MÉDICO

Grupo químico: Inseticida microbiológico

Nome Comum: *Bacillus thuringiensis*

Tratamento/Antídoto: Não há antídoto específico.

Telefone de emergência: 0800 0141149

Registro no MS N° 3.4025.0176

FABRICADO POR:

CERTIS USA L. L. C.
9145 GUILFORD ROAD, SUITE
175-21046
COLUMBIA, MD USA

IMPORTADO E DISTRIBUÍDO POR:

NEOGEN
Av. Alexandrina das Chagas Moreira, 964
Distrito Industrial - Pindamonhangaba / SP
Cep: 12412-800
CNPJ: 90.821.554/0001-42
Indústria Brasileira

SAC: (12) 3644-3030

Email: sac@neogendobrasil.com.br

Site: www.rogama.com.br



Doc. No. I-4153

Doc. 07

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 N° 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 |
| PRIMEIRA PARTE | |
| 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 |
| SEGUNDA PARTE | |
| 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 |
| ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE¹ | |

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.

¹ 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 subspécie israelensis cepa AM65-52

Bacillus thuringiensis subspécie israelensis cepa AM65-52

PÁGINA

INFORMAÇÕES

6

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

7

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

20

ESPECIFICAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA

Bacillus thuringiensis subspécie israelensis cepa AM65-52

INFORMAÇÕES

Nome científico

Bacillus thuringiensis subspécie israelensis cepa AM65-52

Abreviações

Bt: todas as subspécies de *Bacillus thuringiensis*.

Bti: todas as cepas de *acillus thuringiensis subspécie 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^{1,2}, 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.*³, conforme modificado por toxinas Bt por Brussock & Carrier⁴.

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).

¹ 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.

² 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.

³ 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.

⁴ 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. Ditiotreitól (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 ≥ 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 ± 2°C.

Refrigerador, -18 ± 2°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 3H₂O 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”), SaranTM 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, inócupe 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 ≥ 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 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:

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

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 ± 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 instar (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 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.

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 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.

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 tríplice 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 tetrionato, (Difco 0104, BBL 11705, ou equivalente comercialmente preparado), 20 ml em tubos de ensaio tampados. Para cada tubo de 10 ml de caldo tetrionato, 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 tetrionato 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 tetrionato 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 tríplice 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 H₂S (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 H₂S. 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 cetrimide 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 cetrimide. 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- β -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 carços, 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 μm .

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^{1,2}, 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.*³, conforme modificado por toxinas Bt por Brussock & Carrier⁴.

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.

¹ 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.

² 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.

³ 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.

⁴ 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 poli(acrilamida 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.

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%, β -mercaptoetanol 0,2%, glicerina 50%, azul de bromofenol (marcador de rastreamento) em água. Ditiotretitol (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 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 μ 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 μ 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 μ 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 ≥ 8000 g para remover materiais insolúveis. Colete o sobrenadante e descarte o sedimento.
- ix. Carregue um pequeno volume (aproximadamente 10-20 μ 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, descare 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 ± 2°C.

Refrigerador, -18 ± 2°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 3H₂O 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™ 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 ± 0,1 mg)

Balança analítica de prato único (precisão de ± 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 borossilicato 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 CL₅₀ 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 ±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

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 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 tríplice 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 tetracionato , (Difco 0104, BBL 11705, ou equivalente comercialmente preparado), 10 ml em tubos de ensaio tampados. Para cada tubo de 10 ml de caldo tetracionato, 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 tetracionato 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 tetracionato 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 tríplice 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 H₂S (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 H₂S. 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 cetrimide 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 cetrimide. 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- β -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 subspécie israelensis cepa AM65-52

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

ESPECIFICAÇÕES E AVALIAÇÕES DA OMS PARA PESTICIDAS USADOS NA SAÚDE PÚBLICA

Bacillus thuringiensis subspécie israelensis cepa AM65-52

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FAO/OMS 770/2012

Recomendação

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

Laudo

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* subspécie *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. Tolera-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 μm , 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.

Laudo

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 aditada 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 larvicida 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 do 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 & Whiteley¹.

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* (citólítica). 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)².

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.

¹ 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.

² 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 ≥ 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 ínstar 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 ₅₀ > 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 ₅₀ > 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 ₅₀ > 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 por concentração e controle). Soluções de teste renovadas a cada 48 horas. U.T.I./mg não registrado*. | CE ₅₀ > 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*. | ≥ 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 ¹¹ 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 ¹¹ UFC/g. | Sem patogenicidade, toxicidade ou efeito sobre a sobrevivência de aves jovens. DL ₅₀ > 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 http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/ e http://www.who.int/whopes/quality/ . |
| 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 | Critérios 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 fé,
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 05/01/2018 é(são) :

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

Tipo: Certificado Digital



| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| ÍNDICE MONOGRAFICO | NOME |
| B01 | BACILLUS THURINGIENSIS |

Doc. 08

B01 - Bacillus thuringiensis

a) Ingrediente ativo ou nome comum: BACILLUS THURINGIENSIS

b) Sinonímia: Bt

c) N° CAS: 68038-71-1

d) Classificação Taxonômica:

- d1. Domínio - Eubactéria
- d2. Reino - Procariotae
- d3. Filo - Firmicutes
- d4. Classe - Firmibacteria
- d5. Ordem - Eubacteriales
- d6. Família - Bacillaceae
- d7. Gênero - Bacillus
- d8. Espécie - thuringiensis
- d9. Variedade - kurstaki, israelensis e aizawai

e) Classe: Inseticida microbiológico

f) Classificação toxicológica: Classe IV

g) Uso agrícola: Autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: Conforme Ato nº 06/2014 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA) e indicação na bula dos produtos.

h) Emprego domissanitário: autorizado conforme indicado.

1. Identificação: Bacillus thuringiensis, Var. israelensis

2. Modalidade de Emprego, tipo de formulação e potência máxima autorizada:

2.1. Venda Livre.

| Tipo de formulação | Potência |
|--------------------|-------------------|
| Granulado | 4.000 (U.T.I.)/mg |
| Tablete | 2.000 (U.T.I.)/mg |

2.2. Entidades especializadas e campanhas de saúde pública.

| Tipo de formulação | Potência |
|----------------------------|-------------------|
| Granulado | 4.000 (U.T.I.)/mg |
| Suspensão concentrada | 1.200 (U.T.I.)/mg |
| Solução aquosa concentrada | 1.200 (U.T.I.)/mg |
| Tablete | 2.000 (U.T.I.)/mg |

2.3. Jardinagem Amadora

| Tipo de formulação | Potência |
|--------------------|-------------------|
| Granulado | 4.000 (U.T.I.)/mg |

| | |
|-----------------------|-------------------|
| Pó | 1.200 (U.T.I.)/mg |
| Suspensão concentrada | 1.200 (U.T.I.)/mg |
| Tablete | 2.000 (U.T.I.)/mg |

2.4. Uso em água para consumo humano

Aprovado conforme indicação em rótulo.

Nota 1: Unidades Tóxicas Internacionais (U.T.I.)

Nota 2: A linhagem de *Bacillus thuringiensis* utilizada na formulação deve ser caracterizada e comprovar ausência de produção de enterotoxinas e β -exotoxinas e contaminação por outros microrganismos.

Resolução RE nº 3.864 de 19/08/10 (DOU de 23/08/10)

Resolução RE nº 5.102 de 10/11/10 (DOU de 12/11/10)

Resolução RE nº 5.011 de 27/12/13 (DOU de 30/12/13)

Resolução RE nº 3.761 de 24/09/14 (DOU de 25/09/14)

Resolução RE nº 2.114 de 30/07/15 (DOU de 31/07/15)

**Doc. 09**

Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis
Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses

NOTA TÉCNICA Nº 39/2022-CGARB/DEIDT/SVS/MS

1. ASSUNTO

Orientação técnica para a utilização de grânulos dispersíveis em água do larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* – Bti, Cepa AM 65-52, 37,4% p/p e potência aproximada 3.000 Bt UTI/mg para o controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

2. ANÁLISE

O controle vetorial de larvas de *Aedes* é uma estratégia preconizada para depósitos de água, para uso por humanos e animais domésticos. Restringe-se o tratamento larvário como última opção para depósitos dos tipos A1 e A2, quando as atividades mecânicas e medidas de proteção dos depósitos não se mostram suficientes para o controle de vetores.

A utilização de larvicidas biológicos tem sido recomendada devido a menor toxicidade que estes compostos apresentam, quando comparados com outras formulações de natureza “químicas” (larvicidas químicos) e menor risco para indução de seleção de populações de mosquitos resistentes a inseticidas, devido sua formulação e mecanismo de ação – NOTA INFORMATIVA Nº 186/2019 – CGARB/DEIDT/SVS/MS.

Visando atender a demanda de larvicidas, com base nas solicitações anuais das Unidades Federativas, e com o intuito de evitar possíveis desabastecimentos, em decorrência do cenário internacional, o Ministério da Saúde antecipa a inclusão de um novo inseticida com ação sobre larvas de *Aedes*.

2.1 Característica do Produto

O larvicida VectoBac®WG – Sumitomo Chemical, à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* Bti, é composto de 3.000 UTI (Unidades Tóxicas Internacionais) por miligrama, cepa AM65-52, na formulação de grânulos dispersíveis em água, na concentração 37,4%, altamente eficiente para controle das formas imaturas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Figura 1).

Quanto à apresentação, o VectoBac®WG está disponível em embalagens com peso líquido de 500 mg de produto.



Figura 1- VectoBac®WG

2.2 Modo de ação

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

2.3 Recomendações de uso

O produto possui recomendação para tratamento larvário em água de consumo humano, como por exemplo caixas d'água, tonéis, cisternas e outras formas de armazenamento), conforme descrito no WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

A quantidade recomendada do VectoBac®WG para recipientes com 100 litros de água é de 1 (uma) medida da colher dosadora (equivalente a aproximadamente 1g do produto). Para volumes menores, deve-se realizar o fracionamento conforme a colher dosadora fornecida pelo fabricante.

2.4 Dosagem recomendada de acordo com o volume de água

| Capacidade do depósito | Dose recomendada (1 colher) |
|------------------------|------------------------------|
| Até 50 L | Aproximadamente ½ colher |
| Até 100 L | Aproximadamente 1 colher |
| Até 200 L | Aproximadamente 1,5 colher |
| Até 250 L | Aproximadamente 2 colheres |
| Até 300 L | Aproximadamente 2,5 colheres |
| Até 500 L | Aproximadamente 4 colheres |
| Até 1000 L | Aproximadamente 8 colheres |



* Memória de cálculo: 0,8 g de VectoBac WG (Bti) para cada 100 litros de água potável.

Ressalta-se que o tratamento deve ser realizado de acordo com a capacidade do depósito e não com a quantidade de água existente no momento da aplicação. Ainda, é extremamente importante o cálculo do volume do depósito (cubagem) antes de fazer a aplicação do produto.

2.5 Periodicidade de aplicação

Recomenda-se a aplicação do VectoBac®WG a cada 60 dias.

2.6 Informações de segurança

Segurança do trabalhador: Utilizar os equipamentos de proteção individual (EPI) conforme as orientações. Recomenda-se que seja evitado o contato direto prolongado do larvicida VectoBac®WG com a pele. Não comer, beber ou fumar durante o manuseio do produto. Ao abrir a embalagem, fazê-lo de modo a evitar vazamento. Não manipular e/ou carregar embalagens danificadas.

Os servidores envolvidos na aplicação do produto não necessitam realizar exames regulares para dosagem da enzima colinesterase sanguínea, uma vez que o produto não tem ação sobre a colinesterase humana. Mais informações estão contidas na Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) (0030375846).

Segurança do ambiental: não são conhecidos efeitos do produto aos organismos aquáticos.

2.7 Informações adicionais

Armazenamento: mantenha o produto em sua embalagem original, sempre fechada. O local de armazenamento deve ser exclusivo para produtos tóxicos, devendo ser isolado de alimentos, bebidas, rações, materiais alcalinos e materiais combustíveis. O local deve ser seco, ventilado, ao abrigo da luz, com piso impermeável e devidamente identificado. Deve-se manter acesso restrito à sala de armazenamento dos produtos. Em caso de armazéns, deverão ser seguidas as instruções constantes da NBR 9843 da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Observe as disposições constantes da legislação estadual e municipal.

Destinação de embalagens: As embalagens após o uso e as colheres dosadoras em desuso deverão ser recolhidas em um local centralizado para posterior encaminhamento para destinação adequada.

Documentos complementares e informações adicionais:

- Programa de Pré-qualificação em Controle de Vetores da Organização Mundial de Saúde (OMS – PQ-List): <https://extranet.who.int/pqweb/vector-control-product/vectobac-wg>
- Cepa AM65-52: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVCSP_Bti_strain_AM65-52_2012.pdf
- Registro ANVISA (número 3.2586.0013): <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saneantes/produtos/q/?nomeProduto=vectobac%20wg>
- WHO Guidelines for Drinking-water Quality: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVC-SP_Bti_strain_AM65-52_2012.pdf

3. CONCLUSÃO

O controle vetorial é uma importante medida para a prevenção e diminuição da circulação de arbovírus em áreas urbanas do país, tendo em vista a indisponibilidade de vacinas ou medicamentos específicos para o tratamento das doenças relacionadas a estes patógenos.

Contudo, é fundamental que a utilização dos inseticidas, tais como o larvicida apresentado nesta nota, seja feita de forma racional, seguindo as orientações das Diretrizes Nacionais, notas técnicas e demais normativas do Ministério da Saúde. Ainda, reforça-se a importância das atividades de monitoramento entomológico para o norteamo de ações, bem como as visitas domiciliares, como instrumentos fundamentais de comunicação e educação em Saúde.

Por fim, destaca-se que todas as atividades de controle com uso de inseticidas devem estar integradas ao controle mecânico e demais estratégias que otimizem a efetividade das ações sobre as populações de mosquitos.

Atenciosamente,

CÁSSIO ROBERTO LEONEL PETERKA
Diretor do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – Substituto



Documento assinado eletronicamente por **Cássio Roberto Leonel Peterka, Diretor(a) do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis substituto(a)**, em 23/11/2022, às 19:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0030373125** e o código CRC **D68D0C46**.

Referência: Processo nº 25000.160056/2022-67

SEI nº 0030373125

Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses - CGARB
SRTV 702, Via W5 Norte - Bairro Asa Norte, Brasília/DF, CEP 70723-040
Site - saude.gov.br



FOLHA DE INFORMAÇÃO

Folha de Informação nº 074/2025

Pedido de Compra: 166/2025
Processo originário: 2979/2025

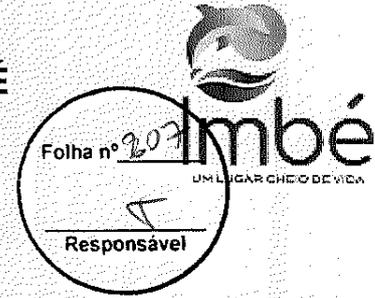
Aos cuidados da Procuradoria-Geral do Município (PGM)

Conforme solicitado em despacho presente na página anterior (pg. 205), analisamos a impugnação realizada pela empresa PES Comércio, Importação e Exportação LTDA, iniciado na página 113 com folha de informação 078, proveniente de nosso Setor de Licitações.

- A empresa apresentou questionamentos somente devido aos preços informados pelo Setor de Compras, que foi fechado com um valor de R\$ 320,67 para o produto 4 deste processo (Larvicida...em grânulos dispersíveis em água).
- Esse questionamento ocorre devido ao fato de que em 4 dos 6 valores apresentados pelo Setor de Compras na obtenção dos valores médios são de larvicidas que tem sua apresentação não em grânulos, e sim de forma líquida, ou que são diferentes em sua fórmula exata e não estariam de acordo com o que pedimos de fato (situação exposta pela empresa nas páginas 118, 119, 120, 121, com demais embasamentos e argumentações até a página 203).
- A partir das argumentações apresentadas, apenas dois valores de pesquisa seriam levados em consideração: o valor do pregão 45/2024 de nosso próprio município e do pregão 55/2024 de Horizontina. Com isso, o valor de mediana do produto em questão sobe de R\$ 320,67 para R\$ 547,39. Se olharmos para licitações mais recentes em uma pesquisa rápida no LicitaCon, também encontramos o produto com valor próximo disso, vide exemplo abaixo:



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE



Órgão : PM DE DOM PEDRITO, Modalidade : Pregão Lei 14.133/21 Eletrônico, Nr. : 111, Ano : 2024, Objeto : Compras, Abertura : 28/11/2024

| Item | Qtd. | Un. | Vi. Un. Homolg. | Vi. Total Homolg. | Vencedor |
|--|-------|--------|-----------------|-------------------|------------------------------------|
| Larvicida biológico BTI (bacillus Thuringiensis israelensis) Cepa AM 65-52, aderido a grânulos suporte de diferentes densidades, potência de 200UTI (unidades toxicológicas internacionais)/mg. Embalagem de 18,14 Kg. CEPA avaliada e aprovada na Organização Mundial da Saúde (OMS), para uso inclusive em água potável. | 20,00 | saco | 1.855,00 | 37.100,00 | PES COMERCIO IMP E EXPORTAÇÃO LTDA |
| Larvicida biológico BTI (bacillus Thuringiensis israelensis) Cepa AM 65-52, grânulos dispersíveis em água, potência de 3000 UTI (unidades toxicológicas internacionais)/mg. Embalagem de 500 gr. CEPA avaliada e aprovada na Organização Mundial da Saúde (OMS), para uso inclusive em água potável. | 30,00 | frasco | 550,00 | 16.500,00 | PES COMERCIO IMP E EXPORTAÇÃO LTDA |

- Tendo em visto que a empresa apresenta argumentos concretos perante a situação exposta (do valor médio abaixo do valor de mercado), e que nossos responsáveis técnicos concordam com a informação apresentada, pois o produto desejado é em gramas/kg e não em litros, indicamos que a pesquisa de preço do referido produto seja refeita com base no produto correto.

Sendo assim, encaminhamos o presente processo para avaliação do Setor Jurídico para devidas diligências.

Imbé, 17 de Junho de 2025

Redigido por:

Thales José Paz
Agente Administrativo
Matrícula 18.586

Ciente e de Acordo (Responsáveis Técnicos):

Maria Elisa Menezes Silva
Vigilância Ambiental
Mat. 14610



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMBÉ
PROCURADORIA-GERAL DO MUNICÍPIO - PGM



PROCESSO ADMINISTRATIVO Nº 2979/2025
PARECER Nº 995/2025
REQUERENTE: SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
OBJETO: PREGÃO ELETRÔNICO 046/2025 - IMPUGNAÇÃO

Vistos,

Trata-se de Impugnação ao Pregão Eletrônico nº 046/2024 que tem por objeto o Registro de Preços para aquisição eventual e futura de Larvicidas, Raticidas, Inseticidas para a vigilância em Saúde, produto usados no combate e controle de pragas tais como o mosquito da dengue (*Aedes Aegypti*).

A Impugnação oposta pela empresa PES COMÉRCIO E EXPORTAÇÃO LTDA, em que aduz que o Preço Orçado pela administração fixou valor “muito abaixo dos preços praticados no mercado” deixou dúvidas quanto a metodologia adotada para definir o preço de aquisição dos produtos. Aduz o impugnante que a manutenção dos preços-base em valores descolados da realidade do mercado poderá promover a apresentação de proposta inexequível, gerando prejuízo à Administração.

É o relato.

Em suas razões o IMPUGNANTE aduz que os preços orçados pela administração são inexequíveis, no entanto não demonstra sequer por amostragem em comparação com outros preços praticados no mercado.

A mera alegação de inexequibilidade não induz em revisão do ato, até porque a pesquisa realizada pelo Setor de Compras obedece ao disposto no artigo 23 da Lei de Licitações, de outra banda, não pode se permitir que a pesquisa seja realizada com situações análogas, sem que se verifique que o item pesquisado condiz com a solução apresentada pela Administração.

Foram os autos encaminhados para o Setor de Compras para nova pesquisa de preços, onde se verificou o equívoco do preço levantado, assim de pronto já foi providenciada a correção.

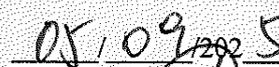
Diante do exposto, *s.m.j.* opino pela **PROCEDÊNCIA DA IMPUGNAÇÃO** apresentada pela empresa PES COMÉRCIO E EXPORTAÇÃO LTDA, com base na fundamentação *supra*.

Everton Costa dos Santos Melo
Procurador Geral do Município
OAB/RS nº 112.888
Portaria 003/2025


Everton Costa dos Santos Melo

Procurador Geral do Município - OAB/RS nº 112.888
Matrícula nº 16.448 – Portaria nº 003/2025

Imbé, 04 de setembro de 2025.
ACOLHO O PARECER


05/09/2025

Luis Henrique Vedovato
Prefeito Municipal de Imbé

Av. Paraguassú, nº 1.144 - Centro - Imbé/RS - CEP: 95625-000
Telefone: (51) 3627-8200 - E-mail: juridico@imbe.rs.gov.br

ACOMPANHE AS ATIVIDADES DA ADMINISTRAÇÃO MUNICIPAL: