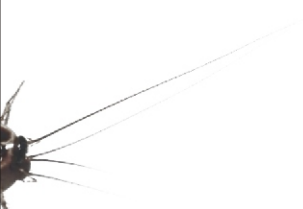





Agência Nacional
de Vigilância Sanitária




MANUAL DE PROTOCOLOS PARA TESTES DE EFICÁCIA EM PRODUTOS DESINFESTANTES





MANUAL DE
PROTOCOLOS PARA
TESTES DE EFICÁCIA
EM PRODUTOS
DESINFESTANTES



Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SEPN 515, Edifício Omega, Bloco B, Brasília (DF), CEP 70770-502
Internet: www.anvisa.gov.br

Gerência-Geral de Saneantes
e-mail: saneantes@anvisa.gov.br
Copyright © Anvisa, 2004

É permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte.

tiragem - 1ª edição – 2004 - 200

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Edição

Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional -
Comin/Anvisa

Design gráfico

Gerência de Comunicação Multimídia

Impresso no Brasil



Sumário

Introdução	5
O que são Desinfestantes, Testes de Eficácia e Pragas mais significativas	7
Testes de Eficácia para Iscas Baraticidas	10
Testes de Eficácia para Volatilizantes	13
Testes de Eficácia para Espirais	16
Testes de Eficácia em Aerossóis frente a Insetos Rasteiros	19
Testes de Eficácia em Aerossóis frente a Insetos Voadores	22
Testes de Eficácia Residual de Inseticidas	25
Testes de Eficácia em Rodenticidas sob a forma de Iscas	28
Testes de Eficácia em Rodenticidas sob a forma de Pó-de-Contato	31



Introdução

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

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

A evolução da regulamentação sanitária voltada para estes produtos culminou com a publicação das Portarias 321 e 322, ambas em 1997, que passaram a ser as principais ferramentas para a concessão do registro, e suas alterações, para produtos categorizados como desinfestantes, sendo estas ações de competência da Gerência-Geral de Saneantes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O que são Desinfestantes?

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

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

O que são testes de eficácia?

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

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

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

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



Quais as pragas mais representativas?

As tabelas abaixo relacionam as espécies mais representativas utilizadas para a comprovação da eficácia dos desinfestantes.

Tabela 1 : Pragas urbanas (intra e peridomiciliares)

Espécie	Nome científico	Nome comum
Ácaro	Dermatophagoides farinae	Ácaro doméstico
	Tyrophagus putrescentiae	Ácaro doméstico
	Chelacaropsis moorei	Ácaro doméstico
Aranha	Nesticoides rufipes	Aranha doméstica
	Loxoscelis spp	Aranha doméstica
Barata	Blattella germanica	Barata francesinha ou alemã
	Periplaneta americana	Barata de esgoto
Broca	Lyctus spp & Anobiun spp	Broca de madeira seca
Barbeiro	Triatoma spp, Rhodnius spp e Panstrongylus megistus	Barbeiro
Borrachudo	Simulium pertinax	Borrachudo
Carrapato	Rhipicephalus sanguineus	Carrapato dos cães
	Boophilus micropulus	Carrapato bovino
Cupim	Coptotermes gestroi	Cupim de solo
	Cryptotermes spp	Cupim de madeira seca
	Nasutitermes spp	Cupim de solo
Escorpião	Tityus serrulatus, T. Bahiensis	Escorpião amarelo e escorpião marrom
Formiga	Monomorium pharaonis & florícola	Formiga faraó
	Solenopsis sevisima & invicta	Formiga lavapé
	Camponotus spp	Formiga carpinteira
	Linepithema humile	Formiga argentina
	Tapinoma melanocephalum	Formiga fantasma
Moscas	Musca domestica	Mosca
Mosquito	Culex quinquefasciatus	Mosquito/pernilongo comum
	Aedes aegypti e A.albopictus	Mosquito da dengue e febre amarela
	Anopheles spp	Mosquito da malária
Pulga	Ctenocephalides felis felis	Pulga dos gatos
	Ctenocephalides canis	Pulga dos cães
Roedores	Mus musculus	Camundongo
	Rattus rattus	Rato de telhado
	Rattus norvegicus	Rato de esgoto (ratazana)
Traça	Tinea pellionella & bisselliella	Traça de parede (casulo)
	Lepisma saccharina	Traça dos livros

Tabela 2 : Pragas de jardim

Espécie	Nome científico	Nome comum
Ácaro	Tetranychus urticae Polyphagotarsonemus latus	Ácaro rajado Ácaro branco
Besouro	Diabrotica spp e Costalimaita spp	
Caracol	Achatina fulica e Biomphalaria spp, Australorbis spp, Helix aspersa, Bradyboena similaris, Bulimulus spp, Stenogyra spp	Caramujo-gigante-africano (espécie exótica) e caracóis(espécies Brasil)
Cochonilha	Planococcus spp e Orthezia	Cochonilha
Formiga cortadeira	Acromyrmex spp Atta spp	Formiga-quenquém Saúva
Gafanhoto	Schistocerca spp e Rhammatocerus spp	Gafanhoto
Lagarta	Brassolis spp	Lagarta das palmeiras
Lesma	Limax spp, Phyllocaulis spp Strophocheilus oblongus, Sarasinula langsdoeffii e Sarasinula linguaeformis, Veronicellidae (família)	Lesmas terrestres
Mosca das Frutas	Anastrepha spp, Ceratitis spp	Mosca-das-frutas
Percevejo	Nezara viridula e Leptoglossus spp	Percevejo verde (maria fedida) Percevejo-do-maracujá
Pulgão	Aphis spp	Pulgão
Tripes	Frankliniella spp	Tripes

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.

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

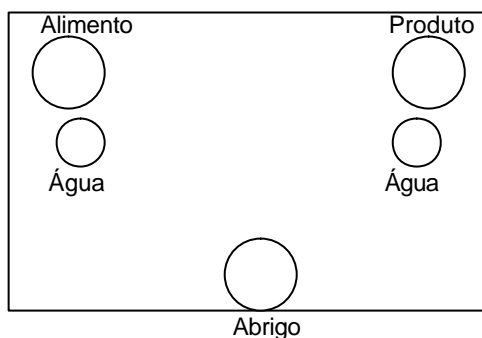
2.3. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

2.4. Termohigrômetro.

3. MATERIAIS E REAGENTES

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

Figura 1



3.2. Sistema-teste

3.2.1. *Blatella germanica*, adultas, 3 a 4 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50 a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas em jejum por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

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

3.3. Ração para cachorros adultos.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e um controle.

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

4.2. ESPECÍFICO

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

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

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

4.2.4. Realizar leituras de mortalidade em 48 horas, ou de acordo com a recomendação do fabricante.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

6. RESULTADOS

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade for de $90 \pm 10\%$ em, no máximo, 48 horas ou no tempo de ação estabelecido pelo fabricante.

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

2.2. KT_{50} : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

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

2.4. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Câmara de teste com volume de 5,8 m³ (Peet-Grady), sem fluxo forçado de ar.

3.2. Sistema –teste:

3.2.1. *Aedes* spp, com idade entre 3 e 5 dias, criados em biotério com temperatura e umidades controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente).

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

3.3. Detergente alcalino.

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

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

3.6. Lâmpada ultravioleta (UV).

3.7. Termohigrômetro.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

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

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

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

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

4.1.4. A câmara deve ser submetida à radiação ultravioleta, por 8 horas, entre cada dia de teste, com o objetivo de auxiliar a degradação de parte dos princípios ativos usados nos produtos testados.

4.2. ESPECÍFICO

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

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

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

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

4.2.5. Manter ligado por 30 minutos para pré-aquecimento (no caso de aparelhos elétricos).

4.2.6. Após este período, transferir o aparelho para o interior da câmara, colocar o produto e manter o conjunto ligado pelo período de 5 minutos

4.2.7. Soltar os insetos na câmara e iniciar a contagem de tempo para o cálculo do knockdown.

4.2.8. Medir e registrar a temperatura do aparelho (quando for o caso).

4.2.9. Limpar a câmara com acetona.

4.2.10. Ventilar.

4.2.11. Medir o knockdown do produto nos tempos de 40 segundos e 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.

4.2.12. Após 15 minutos, acionar o sistema de ventilação no interior da câmara.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

6. RESULTADOS

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

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

2.2. KT_{50} : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

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

2.4. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Câmara de teste com dimensões de 70 x 70 x 70 cm.

3.2. Sistema-teste:

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

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

3.3. Balança analítica.

3.4. Detergente alcalino.

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

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

3.7. Lâmpada ultravioleta (UV).

3.8. Ventilador a pilha.

3.9. Termohigrômetro.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

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

4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:
Mosquitos - 20 (vinte) fêmeas.

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

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

4.1.4. A câmara deve ser submetida à radiação ultravioleta por 2 horas, entre cada dia de teste, com o objetivo de auxiliar a degradação de parte dos princípios ativos contidos nos produtos testados.

4.2. ESPECÍFICO

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

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

4.2.3. Pesar 0,5 g da espiral, introduzÍ-la no suporte no interior da câmara e acender as duas extremidades, simultaneamente.

4.2.4. Ligar o ventilador.

4.2.5. Manter o produto na câmara até sua queima completa.

4.2.6. Abrir a câmara de teste, desligar e retirar o ventilador, e soltar os insetos no interior da mesma.

4.2.7. Registrar o número de insetos em knockdown nos tempos 40 segundos e 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.

4.2.8. Ventilar a câmara após 15 minutos antes de fazer a última leitura do knockdown.

4.2.10. Recolher os mosquitos.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

6. RESULTADOS

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

TESTE DE EFICÁCIA EM AEROSSÓIS FRENTE A INSETOS RASTEIROS

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente de qualquer apêndice após observação por um período mínimo de 3 segundos.

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

2.2. KT_{50} : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

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

2.4. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Cilindro em aço inoxidável com 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura.

3.2. Sistema-teste:

3.2.1. *Blattella germanica*, adultas, entre 3 e 4 meses, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

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

3.2.3. Formigas domésticas, adultas, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e

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

3.2.4. Para testes frente a outros insetos e artrópodes, consultar as tabelas 1 e 2 apresentadas anteriormente.

3.2.5. Dosador automático.

3.3. Balança analítica.

3.4. Detergente alcalino.

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

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

3.7. Lâmpada ultravioleta (UV).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e controle;

4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:

4.1.1.2.1. *Blattella germanica*: 10 (dez);

4.1.1.2.2. *Periplaneta americana*: 06 (seis);

4.1.1.2.3. Formigas: 100 (cem);

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

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

4.1.3.1. 20 % até 10 indivíduos;

4.1.3.2. 10% de 11 a 50 indivíduos;

4.1.3.3. 5% superior a 51 indivíduos.

4.2. ESPECÍFICO

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

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

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

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

Inseto	Aerosol a base de água	Aerosol a base de solvente
B. germânica	900 +- 50 mg	400 +- 50 mg
P. americana	1000 +- 50 mg	1000 +- 50 mg
Formigas	650 +- 50 mg	650 +-50 mg

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

Passados os 30 segundos, retirar o pote e registrar o número de insetos em knockdown nos tempos 0,40 segundos e 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.

Retirar os insetos, levar para o biotério e fornecer água e alimento.

4.2.7. Registrar a mortalidade em 48 horas.

4.2.8. Limpar o cilindro com acetona e ventilar.

6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

7. RESULTADOS:

O teste será considerado satisfatório se a mortalidade for de $90 \pm 10\%$ em até 48 horas.

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

2.1. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente de qualquer apêndice após observação por um período mínimo de 3 segundos.

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

2.2. KT_{50} : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

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

2.4. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Câmara de teste com volume de 5,8 m³ (Câmara Peet-Grady/CSMA).

3.2. Sistema-teste:

3.2.1. *Musca domestica*, com idade entre 2 e 5 dias, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

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

3.2.3. Opcional: *Culex quinquefasciatus*, com idade entre 2

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

- 3.3. Dosador automático.
- 3.4. Balança analítica.
- 3.5. Detergente alcalino.
- 3.6. Solução de acetona a 10 % v/v (volume por volume) em álcool etílico.
- 3.7. Recipiente plástico (diâmetro de 9,5 cm e altura de 4,5 cm)
- 3.8. Lâmpada ultravioleta (UV).
- 3.9. Termohigrômetro.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e um controle.

4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:

4.1.1.2.1. Mosquitos: 50 (cinquenta) fêmeas;

4.1.1.2.2. Moscas: 100 (cem) machos e fêmeas.

4.1.2. A câmara deve ser lavada, entre cada teste, com detergente alcalino, seguido de enxágüe com água. No intervalo de cada aplicação, limpar a câmara com solução de 10% de acetona em álcool etílico, seguido de água em exaustão.

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

4.1.4. A câmara deve ser submetida à radiação ultravioleta por 2 horas, entre cada dia de teste, com o objetivo de auxiliar a degradação de parte dos princípios ativos usados nos produtos testados.

4.2. ESPECÍFICO

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

- 4.2.2. Coletar os insetos num recipiente plástico coberto com tela.
- 4.2.3. Abrir a câmara de teste e soltar os insetos no interior da mesma.
- 4.2.4. Aplicar uma dose da substância teste de 650 ± 50 mg, em 4 disparos em pontos diametralmente opostos, de modo a simular sua aplicação espacial.
- 4.2.5. Registrar o número de insetos em knockdown nos tempos 40 segundos e 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.
- 4.2.6. Ventilar a câmara passados os 15 minutos.
- 4.2.7. Retirar os insetos após fazer a contagem de tempo de 20 minutos.
- 4.2.8. Levar para o biotério e fornecer água e alimento.
- 4.2.9. Registrar a mortalidade em 24 horas.
- 4.2.10. Limpar a câmara com água e sabão.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O KT50 será obtido observando-se a regressão linear por meio do programa Probit.

6. RESULTADOS

O teste será considerado satisfatório se o valor médio da mortalidade for de $90 \pm 10\%$ em até 24 horas.

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

2.2. Mortalidade: situação em que o inseto se encontra sem nenhum movimento evidente, de qualquer apêndice, após observação por um período mínimo de 3 segundos.

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

2.4. KT_{50} : tempo que 50% da população dos insetos testados leva para ser afetada pela substância-teste.

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

2.6. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Placas de azulejo 15 x 15 cm.

3.2. Placa de compensado 15 x 15 cm.

3.3. Placa de cerâmica não-vitrificada 15 x 15 cm.

3.4. Sistema-teste:

3.4.1. *Musca domestica*, com idade entre 2 e 5 dias, criadas em biotério com temperatura e umidade controladas (23°C a 27°C e 50% a 70%, respectivamente), alimentadas com dieta específica e aclimatadas por, no mínimo, 12 horas antes do estudo.

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

3.4.3. *Blattella germânica*, adultas, entre 3 e 4 meses,

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

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

3.4.5. Para outras pragas consultar as tabelas 1 e 2 acima.

3.5. Dosador automático.

3.6. Balança analítica.

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

3.8. Termohigrômetro.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

4.1.1.1. Quatro repetições por tratamento e controle.

4.1.1.2. Número/espécie de indivíduos por repetição:

4.1.1.2.1. Mosquitos: 25 (vinte e cinco) fêmeas;

4.1.1.2.2. *Blattella germanica*: 10 (dez), 50% machos e 50% fêmeas;

4.1.1.2.3. *Periplaneta americana*: 6 (seis), 50% machos e 50% fêmeas;

4.1.1.2.4. *Musca domestica*: 25 (vinte e cinco);

4.1.1.2.5. Formigas domésticas: 100 (cem);

4.2. ESPECÍFICO

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

4.2.2. Aplicar 50ml por metro quadrado da calda na diluição indicada pelo fabricante.

4.2.3. AEROSOL: aplicar, com auxílio de um dosador automático, as dosagens abaixo descritas:

Inseto	Aerossol a base de água	Aerosol a base de solvente
Inseto	Aerossol a base de água	Aerosol a base de solvente
B. germânica	900 +- 50 mg	400 +-50 mg
P. americana	1000 +-50 mg	1000 +-50 mg
Musca domestica	650 +- 50 mg	650 +-50 mg
Formigas domésticas	650 +-50 mg	650 +-50 mg

4.2.4. LÍQUIDOS: Preparar a calda, na concentração indicada pelo fabricante, e aplicar o produto obedecendo a quantidade de ativo/m² por meio de uma tampa de um frasco com gatilho, para o caso de produtos destinados a jardinagem amadora (pronto uso ou diluição), de acordo com as pragas estabelecidas na tabela 2.

4.2.5. SÓLIDOS: Polvilhar o produto de acordo com a quantidade indicada pelo fabricante.

4.2.6. Armazenar as placas em ambiente com temperatura entre 23°C e 27°C e umidade relativa entre 50% e 70%, mantendo ciclos claro/escuro de 12 horas.

4.2.7. Após 2 horas da aplicação da substância teste, retirar as placas para a realização do ensaio para o tempo zero.

4.2.8. Coletar os insetos em recipiente plástico coberto com tela.

4.2.9. Posicionar duas placas, uma com e outra sem a substância-teste, para cada superfície a ser estudada.

4.2.10. Colocar o recipiente plástico contendo os insetos sobre a placa sem a substância-teste, posicionando as placas numa angulação de 45° para moscas e mosquitos, e horizontal para baratas.

4.2.12. Deslocar os insetos, após 5 minutos de aclimação, para a placa contendo a substância-teste.

4.2.13. Registrar o número de insetos em knockdown nos tempos de 40 segundos e 1'; 1'30"; 2'; 3'; 5'; 10'; 15' e 20 minutos.

4.2.14. Retirar os insetos, levar para o biotério e fornecer água e alimento.

4.2.15. Registrar a mortalidade em 72 horas.

4.2.16. Manter um inseto-testemunha, sem tratamento, para comparar a mortalidade.

4.2.17. Repetir o experimento tantas vezes quantas forem necessárias para comprovação do período de ação (efeito residual) indicado pelo fabricante.

4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

5. RESULTADOS

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

TESTE DE EFICÁCIA EM RODENTICIDAS SOB A FORMA DE ISCAS

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

3. MATERIAIS E REAGENTES

- 3.1. Gaiola.
- 3.2. Sistema-teste:
 - 3.2.1. *Mus musculus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 10g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 7 dias em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
 - 3.2.2. *Rattus rattus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
 - 3.2.3. *Rattus norvegicus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 100 g de peso corpóreo, aclimatados por pelo menos 3 semanas em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. Os animais devem ser pré-tratados para eliminar os ectoparasitas antes do período de aclimação. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.
- 3.3. Balança analítica.
- 3.4. Detergente alcalino.

- 3.5. Ração padrão: açúcar cristalizado – 5%, milho triturado - 50%, farelo de trigo - 37%, óleo de milho - 5% e farinha de carne - 3%.
- 3.6. Potes para alimentação e água.
- 3.7. EPI apropriado para captura e manuseio dos animais.
- 3.8. Termohigrômetro.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

- 4.1.1.1. Um controle com 10 indivíduos (5 fêmeas e 5 machos), por espécie.
- 4.1.1.2. Número de indivíduos por repetição: vinte (10 fêmeas e 10 machos), por espécie.

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

4.2. TESTE COM OPÇÃO ALIMENTAR

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

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

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

4.2.4. No 3º dia uma quantidade fresca e pesada da ração, em quantidade superior à fornecida normalmente.

4.2.5. Após 24 horas, a ração restante deverá ser pesada e, a quantidade consumida por cada animal, calculada. Deve ser assegurado que todos os animais estejam se alimentando normalmente da ração contida nos potes.

4.2.6. Colocar o produto num pote limpo, pesar e substituir por um dos potes que guardavam a ração.

4.2.7. Após 24 horas retirar o produto e pesar.

4.2.8. Repetir as etapas 4.2.7. e 4.2.8. por 2 dias para raticidas de dose múltipla.

4.2.9. Recolocar a ração.

4.2.10. Observar os animais durante 14 dias, 2 vezes ao dia, registrando a mortalidade e sintomas toxicológicos observados.

4.3. TESTE SEM OPÇÃO ALIMENTAR

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

5. RESULTADOS

O teste será considerado satisfatório se dentro de 14 dias a mortalidade for de $90 \pm 10\%$ e o consumo do produto for de, no mínimo, 30% em relação ao consumo total da ração padrão.

TESTE DE EFICÁCIA EM RODENTICIDAS SOB A FORMA DE PÓ-DE-CONTATO

1. OBJETIVO

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

2. DEFINIÇÕES

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

2.2. Sistema-teste: qualquer animal, planta, microorganismo, bem como, outro sistema celular, subcelular, químico ou físico, ou combinação destes, incluindo os sistemas ecológicos complexos, que se definam como objeto de estudo.

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1. Gaiola.

3.2. Sistema-teste:

3.2.1. *Mus musculus*, adultos selvagens e saudáveis, com no mínimo 10g de peso corpóreo, capturados no ambiente, e aclimatados por pelo menos 7 dias em biotério. As fêmeas não devem estar grávidas. A alimentação durante o período de aclimação deve ser a ração padrão.

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

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

3.3. Balança analítica.

- 3.4. Detergente alcalino.
- 3.5. Ração padrão: açúcar cristalizado – 5%, milho triturado - 50%, farelo de trigo - 37%, óleo de milho - 5% e farinha de carne - 3%.
- 3.6. Potes para alimentação e água.
- 3.7. 02 (duas) caixas quadradas com 1 m² de área.
- 3.8. Tubo de pvc com 1m de comprimento e diâmetro interno de 75mm.
- 3.9. EPI apropriado para captura e manuseio dos animais.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

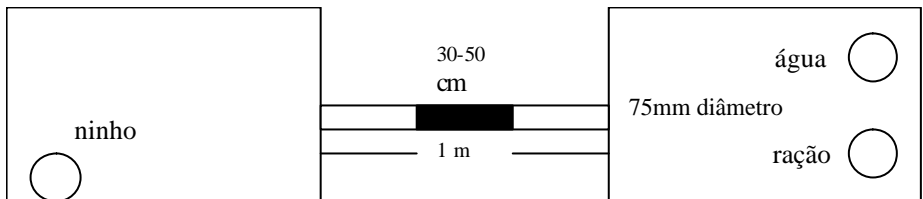
4.1. GERAL

4.1.1. Delineamento experimental:

- 4.1.1.1. Um controle com 10 indivíduos (5 fêmeas e 5 machos), por espécie;
- 4.1.1.2. Número de indivíduos por repetição: vinte (10 fêmeas e 10 machos), por espécie.

4.2. TESTE

- 4.2.1. Regular a temperatura da sala de teste entre 21 ± 2°C e a umidade relativa entre 30% e 70 %.
- 4.2.2. Montar o sistema conforme indicado no desenho abaixo:



- 4.2.3. Manter os animais durante 3 dias para reconhecimento do aparato.
- 4.2.4. Pesar 20g do produto e distribuir uniformemente na parte central, ao longo de 30cm para o *Mus musculus* e, 50cm para demais espécies (vide figura 4.2.2.).
- 4.2.5. Manter os animais por períodos de 1 a 8 dias.
- 4.2.6. Após o período de exposição, recolher os animais em gaiolas individuais e observar até 28 dias registrando a mortalidade.

5. RESULTADOS

O teste será considerado satisfatório se dentro de 28 dias a mortalidade for de 90 ± 10%.



www.anvisa.gov.br



Agência Nacional
de Vigilância Sanitária

Ministério
da Saúde

