



**Isopyrazam/Cyproconazole**  
**Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) –**  
**Teste de Mutação Gênica Reversa**  
**(Teste de Ames)**  
**Relatório Final**

**MÉTODO(S) DE REFERÊNCIA(S):** OECD 471, 2020.

**AUTOR(ES):** Stephanie Canine Tameirão (BSc)

**DATA DE FINALIZAÇÃO:** 20 de Maio de 2021

**LABORATÓRIO CONTRATADO:** ALS Laboratórios LS Ltda.  
Rua Cláudio, 182  
CEP: 05043-000  
São Paulo/ SP - Brasil

**IDENTIFICAÇÃO:** Número do Relatório: **RL25224/2021AM**  
Número do Estudo: **25224/2021AM**  
Task Number: **TK0601821**

**PATROCINADOR(ES):** SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA  
Rua Doutor Rubens Gomes Bueno, 691, 11º andar,  
Torre Sigma - Várzea de Baixo  
CEP: 04730-000  
São Paulo/SP - Brasil

**RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS**

Estas informações, resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da Lei 9.279/96.

Right Solutions é Right Partner autorizados.

Número do relatório: RL25224/2021AM

Página 1 de 38

Right Solutions é Right Partner

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

**Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente**

## DECLARAÇÃO DE CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

A seguinte declaração se aplica aos Estados Unidos da América:

### DECLARAÇÃO DE NÃO REIVINDICAÇÕES DE CONFIDENCIALIDADE DE DADOS SOB AS DISPOSIÇÕES ESPECIFICADAS DA FIFRA

Nenhuma reivindicação de confidencialidade, de qualquer forma, é feita para qualquer informação contida neste documento. Reconheço que as informações não designadas como dentro do escopo da FIFRA sec. 10 (d) (1) (A), (B) ou (C) e que se refere a um pesticida registrado ou previamente registrado não tem direito a tratamento confidencial e pode ser liberado ao público, sujeito às disposições relativas à divulgação a entidades multinacionais sob a FIFRA 10 (g).

Empresa: Syngenta Crop Protection, LLC  
410 Swing Road  
Post Office Box 18300  
Greensboro, NC 27419-8300 USA

Remetente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

A Syngenta é a proprietária dessas informações e dados. A Syngenta submeteu este material à Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos especificamente de acordo com as disposições contidas na FIFRA conforme alterado e, por meio deste, consente com o uso e divulgação deste material pela EPA de acordo com a FIFRA. Ao enviar este material à EPA de acordo com os requisitos de método e formato contidos no Aviso de RP 2011-3, não renunciamos a qualquer proteção ou direito envolvendo este material que teria sido reivindicado pela empresa se este material não tivesse sido enviado à EPA, nem renunciamos a qualquer proteção ou direito previsto na Seção 3 da FIFRA (referente à exclusividade de dados e compensação de dados) ou na Seção 10 (g) da FIFRA (que proíbe a divulgação para empresas de pesticidas estrangeiras e multinacionais ou seus agentes).

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RL25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner

autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes dados e resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGENTA DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Página 2 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

# DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO ÀS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO


**Título do Estudo:** Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) – Teste de Mutação Gênica Reversa (Teste de Ames)

**Número do Estudo:** 25224/2021AM

O presente estudo foi conduzido sob minha responsabilidade de acordo com a NIT-DICLA-035 (INMETRO, Out/19, Rev. 04) e seus documentos complementares, que atendem aos princípios das “Boas Práticas de Laboratório (BPL)” preconizados na OECD (Nº 1 [ENV/MC/CHEM (98) 17]) e USEPA [40 CFR Part 160].

O presente estudo foi conduzido de acordo com o respectivo plano de estudo, aprovado pelo Patrocinador e Gerente da Instalação de Teste e com os procedimentos operacionais padrão da ALS Laboratórios LS Ltda. Este relatório representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos. Não foram detectados quaisquer fatos que possam ter comprometido a integridade e qualidade do estudo.

Todos os dados brutos originais, incluindo registros eletrônicos dos resultados, documentação, plano de estudo assinado, eventuais complementações ao plano de estudo, relatório final e alíquota do item de teste serão retidos nos arquivos BPL da ALS Laboratórios LS Ltda.

  
Stephanie Canine Tameirão (BSc)  
Diretor de Estudo  
Laboratório Contratado: ALS Laboratórios LS Ltda  
Rua Cláudio, 182  
CEP: 05043-000  
São Paulo/SP – Brasil

20 de Maio de 2021  
Data

Será preenchido apenas para envio da EPA dos EUA:  
Representante do Remetente/Patrocinador:

\_\_\_\_\_  
Data  
Remetente/Patrocinador: Syngenta Crop Protection, LLC  
410 Swing Road  
Post Office Box 18300  
Greensboro, NC 27419-8300 USA

“Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL)”  
Número do relatório: RI/25224/2021AM

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

As informações, resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da Syngenta Crop Protection, LLC e Cultivos Ltda., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da Lei 9.279/96.

Página 3 de 38

Right Solutions - Right Partner

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente



## DECLARAÇÃO DE SINALIZAÇÃO

Esta página é intencionalmente deixada em branco. A mesma será substituída por uma declaração de sinalização apropriada do patrocinador.

CONFIDENTIAL  
Property of Syngenta  
syngenta®

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL"  
Número do relatório: RI25224/2021AM

### RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNGENTA DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da  
Lei 9.279/96

Right Solutions - Right Partner  
É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não  
autorizados.

Página 4 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

## DECLARAÇÃO DA GARANTIA DA QUALIDADE

**Título do Estudo:** Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) – Teste de Mutação Gênica Reversa (Teste de Ames)

**Número do Estudo:** 25224/2021AM


Baseado na revisão da Garantia da Qualidade, o respectivo relatório final foi considerado um registro preciso e verdadeiro dos dados gerados durante o estudo.

O presente relatório final foi inspecionado quanto ao respectivo plano de estudo, procedimento operacional padrão e dados brutos. Os procedimentos do estudo foram monitorados através de inspeção de processo.

As inspeções foram conduzidas de acordo com os procedimentos operacionais padrão da Garantia da Qualidade da ALS Laboratórios LS Ltda.

As datas de inspeção e as respectivas datas do relato para o Diretor de Estudo (DE) e Gerente da Instalação de Teste (GIT) estão apresentadas abaixo. Estes relatórios de inspeção são mantidos nos arquivos BPL da ALS Laboratórios LS Ltda.

Inspeção	Data da Inspeção	Datas do Relato	
		DE	GIT
Plano de Estudo	17 de Fevereiro de 2021	17 de Fevereiro de 2021	17 de Fevereiro de 2021
Parte Experimental	19 de Janeiro de 2021	08 de Fevereiro de 2021	08 de Fevereiro de 2021
Dados Brutos	04 de Maio de 2021	04 de Maio de 2021	04 de Maio de 2021
Relatório Final	04 de Maio de 2021	04 de Maio de 2021	04 de Maio de 2021

  
Lilian Mion  
Garantia da Qualidade  
ALS Laboratórios LS Ltda.

20 - maio - 2021  
Data

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL" e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
Número do relatório: RL25224/2021AM E CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da  
Lei 9.279/06

Right Solutions Right Partner

E proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

www.alsglobal.com

## INFORMAÇÕES GERAIS

### Colaboradores

As seguintes pessoas participaram do estudo nas funções indicadas:

Stephanie Canine Tameirão (BSc)  
Luciane Lopes Morandi (Dra.)  
Lilian Mion (BSc)  
Lucas Tetsuya Watanabe (BSc)  
Merielen Nascimento e Pontes (PhD)

Diretor de Estudo.  
Gerente de Instalação de Teste.  
Garantia da Qualidade  
Suporte Técnico  
Gerente de Estudos da Syngenta.

### Datas do Estudo

Data de início do estudo: 19 de Fevereiro de 2021.  
Início da fase experimental: 15 de Abril de 2021.  
Término da fase experimental: 26 de Abril de 2021.  
Data de finalização do estudo: 20 de Maio de 2021.

### Laboratório Contratado

O presente estudo foi conduzido na ALS Laboratórios LS Ltda., localizado na Rua Cláudio, 182 - CEP: 05043-000 - São Paulo/SP, Brasil.

### Aderência ao plano de estudo

Não foram registrados desvios ou emendas ao plano de estudo.

### Arquivos

Todos os dados brutos e registros originais do estudo são de propriedade do Patrocinador. Os dados serão registrados corretamente, assinados e mantidos arquivados na ALS por cinco anos. O item de teste será adequadamente estocado durante a execução do teste e após o término será devolvido ao Patrocinador. Quando pertinente, alíquotas de segurança serão estocadas por dois anos ou até a data de seu vencimento.



# ÍNDICE

	PÁGINA <sup>®</sup>
DECLARAÇÃO DE CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS.....	2
DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO ÀS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO.....	3
DECLARAÇÃO DE SINALIZAÇÃO.....	4
DECLARAÇÃO DA GARANTIA DA QUALIDADE.....	5
INFORMAÇÕES GERAIS.....	6
ÍNDICE.....	7
1.0 SUMÁRIO EXECUTIVO.....	10
1.1 Design do Estudo.....	10
1.2 Resultados.....	10
1.3 Conclusão.....	10
2.0 INTRODUÇÃO.....	11
2.1 Objetivo do Estudo.....	11
2.2 Norma Utilizada.....	11
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Item de Teste.....	11
3.2 Princípio do teste.....	12
3.3 Sistema-Teste.....	13
3.4 Confirmação das Características Genéticas.....	13
3.4.1 Dependência de histidina e biotina (his <sup>-</sup> ) (bio <sup>-</sup> ).....	13
3.4.2 Mutação <i>rfa</i> .....	14
3.4.3 Sensibilidade à radiação UV ( <i>uvrB</i> ).....	14
3.4.4 Resistência à ampicilina (Fator R).....	14
3.4.5 Resistência à tetraciclina (pAQ1).....	14
3.5 Controles positivos.....	14
3.6 Teste de solubilidade.....	15
3.7 Controle de viabilidade das culturas.....	15
3.8 Controle de esterilidade do sistema operacional.....	15
3.9 Ativação metabólica (Fração S9 e Mistura S9).....	15
3.10 Composição do ágar mínimo glicosado e top ágar.....	16
3.11 Método de incorporação direta (Experimento I).....	16
3.12 Método de pré-incubação (Experimento II).....	16
3.13 Avaliação do Ensaio.....	16
3.14 Análise dos Resultados.....	17
3.15 Critérios de avaliação do ensaio.....	18
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Controles Negativo e Positivo.....	18
4.2 Teste de mutagenicidade.....	18
5.0 CONCLUSÕES.....	19
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
TABELAS.....	20
TABELA 1 Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA98 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).....	21
TABELA 2 Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) SC testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA98 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).....	21

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

Número do relatório: RI25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner

autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes dados e resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

SYNGENTA DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da

Lei 9.279/96

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não

autorizados.

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Página 7 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

TABELA 3	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA100 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).....	22
TABELA 4	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA100 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).....	22
TABELA 5	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA102 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).....	23
TABELA 6	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA102 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).....	23
TABELA 7	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1535 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).....	24
TABELA 8	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1535 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).....	24
TABELA 9	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1537 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).....	25
TABELA 10	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1537 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).....	25
TABELA 11	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA98 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).....	26
TABELA 12	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA98 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).....	26
TABELA 13	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA100 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).....	27
TABELA 14	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA100 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).....	27
TABELA 15	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA102 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).....	28
TABELA 16	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA102 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).....	28
TABELA 17	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1535 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).....	29
TABELA 18	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1535 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).....	29
TABELA 19	Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa TA1537 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).....	30

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

Número do relatório: RL25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner  
autorizados.

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente



TABELA 20 Resultados de Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com Salmonella Typhimurium cepa TA1537 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).....30

**ANEXOS.....31**

ANEXO 1 Histórico de Dados dos Controles Negativo e Positivo para o Método de Incorporação Direta (Experimento I).....32

ANEXO 2 Histórico de Dados dos Controles Negativo e Positivo para o Método de Pré-Incubação (Experimento II). .....33

ANEXO 3 Resultados do Controle com Benzo(A)Pireno.....33

ANEXO 4 Viabilidade das cepas.....34

ANEXO 5 CERTIFICADO DO ATIVADOR METABÓLICO .....35

ANEXO 6 CERTIFICADO DE ANÁLISE PARA isopyrazam/cyproconazole SC (A19022A) .....36

ANEXO 7 CERTIFICADO DE RECONHECIMENTO DA CONFORMIDADE AOS PRINCÍPIOS DAS BPL – INMETRO .....38

## 1.0 SUMÁRIO EXECUTIVO

### 1.1 Design do Estudo

O estudo foi realizado com o item de teste **isopyrazam/cyproconazole SC (A19022A)** (fornecido por SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA) com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico do agente, utilizando cinco linhagens mutantes de *Salmonella Typhimurium* auxotróficas para histidina (his<sup>-</sup>): TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537, segundo o método de referência OECD 471, 2020.

Experimento I foi realizado pelo método de incorporação direta em placa com todas as linhagens nas concentrações de 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa.

Foi observada inibição total do “background” bacteriano nas concentrações de: 1500 e 5000 µg/placa para a cepa TA1535 (±S9).

Com base nos resultados obtidos no Experimento I, Experimento II foi realizado, utilizando-se do método de pré-incubação, nas seguintes concentrações: 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa para todas as cepas, exceto para a cepa TA1535 (±S9) que foram utilizadas as concentrações de 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa.

Ambos os experimentos foram realizados na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica (mistura S9). A mistura S9 consiste em 5% v/v da fração microsomal de fígado de ratos induzido com Aroclor 1254, suplementada com cofatores.

As soluções do item de teste foram preparadas utilizando-se água deionizada. Todas as concentrações foram testadas em triplicata na ausência e presença de ativação metabólica, assim como os controles negativos. Os controles positivos foram testados em duplicata na ausência e presença de ativação metabólica.

### 1.2 Resultados

Não se observou um aumento significativo do número de revertentes nas cepas testadas após o tratamento com **isopyrazam/cyproconazole SC (A19022A)** em qualquer uma das concentrações testadas tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Uma tendência de efeito concentração-resposta (aumento do número de revertentes com o aumento da concentração testada) também não foi observada dentro dos critérios considerados de significância biológica. As taxas de mutação foram menores que 2 para todas as cepas na ausência e presença de ativação metabólica.

A análise de variância foi realizada, a significância estatística encontrada não é indicativa de efeito mutagênico, é devido às oscilações no número de revertentes, sinais de toxicidade e aumento do número de revertentes nas maiores concentrações analisadas.

Os controles positivos claramente induziram aumentos no número de revertentes para todas as cepas bacterianas, confirmando a sensibilidade da cultura e da atividade da mistura S9. A atividade da mistura S9 também foi confirmada independentemente com benzo (a) pireno.

### 1.3 Conclusão

O resultado obtido em ambos os experimentos foi considerado negativo para as cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 na presença e na ausência de ativação metabólica. Portanto, o item de teste **isopyrazam/cyproconazole SC (A19022A)**, nas condições descritas, não apresentou efeito mutagênico.

“Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RI25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner  
autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da

Página 10 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

## 2.0 INTRODUÇÃO

### 2.1 Objetivo do Estudo

O Teste de Mutação Gênica Reversa (Teste de Ames) foi realizado com o objetivo de estudar o possível efeito mutagênico do item de teste em cepas de *Salmonella Typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina na presença e ausência de ativação metabólica, pelos métodos de incorporação direta e de pré-incubação.

### 2.2 Norma Utilizada

O presente estudo foi conduzido de acordo com:

“OECD Guideline for Testing of Chemicals” (Bacterial Reverse Mutation Test. 471, 2020).”

## 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Item de Teste

Identificação:	Isopyrazam/Cyproconazole SC (A19022A)
Sinonímia:	A19022; A19022A
Número do item de teste:	2105088
Número RET:	130419 Válido até: 26/12/2022
Recebida em:	07 de Julho de 2020
Número de lote:	JCB001-020-002
Número do estudo:	25224/2021AM
Ingrediente ativo (AI):	Isopyrazam; Cyproconazol
Concentração declarada de AI:	125 g/L (Isopyrazam); 80 g/L (Cyproconazol)
Concentração analisada de AI:	117,70 g/L (Isopyrazam); 74,37 g/L (Cyproconazol) ** (Anexo 6)
Nome químico (IUPAC) do AI:	mistura de syn-isômeros 3-(difluoromethyl)-1-methyl-N-[(1RS,4SR,9RS)-1,2,3,4-tetrahydro-9-isopropyl-1,4-methanonaphthalen-5-yl]pyrazole-4-carboxamide e anti-isômeros 3-(difluoromethyl)-1-methyl-N-[(1RS,4SR,9SR)-1,2,3,4-tetrahydro-9-isopropyl-1,4-methanonaphthalen-5-yl]pyrazole-4-carboxamide (Isopyrazam); (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol (Cyproconazol) ***
Número CAS do AI:	881685-58-1 (Isopyrazam); 94361-06-5 (Cyproconazol) ***
Fórmula estrutural:	

“Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RI25224/2021AM

Right Solutions e Right Partner  
autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNCHRONOUS TESTES DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da  
Lei 9.279/96

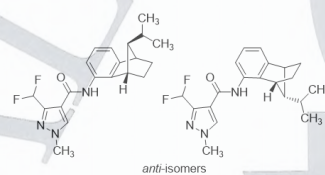
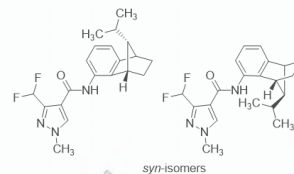
É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

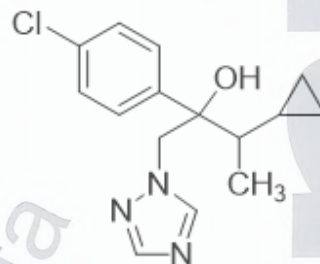
Página 11 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)





Isopyrazam \*\*\*



Cyproconazol \*\*\*

Fórmula molecular:

$C_{20}H_{23}F_2N_3O$  (Isopyrazam);  
 $C_{15}H_{18}ClN_3O$  (Cyproconazol) \*\*\*

Peso molecular:

359.4 g/mol (Isopyrazam);  
 291.8 g/mol (Cyproconazol) \*\*\*

Classe:

Fungicida \*\*\*

Data de Fabricação:

Novembro de 2019

Data de Validade:

Novembro de 2022

Formulação:

Suspensão concentrada (SC)

Estado físico:

Líquido

Homogeneidade:

Homogêneo (Inspeção Visual). \*

Estabilidade:

Hidrólise DT50 > 5 d (pH 4, 5, 7, 9) (50 °C).  
 Fotólise aquosa DT50 54,3 d. (Isopyrazam);  
 Estável à hidrólise 5 d (pH 4, 5, 7, 9) (50 °C).  
 Oxidação (c. 115 °C). Decompõe-se (c. 300 °C). (Cyproconazol) \*\*\*

Item de teste enviada por:

SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA

\* Análise realizada por ALS Laboratórios LS Ltda

\*\* Informação fornecida pelo patrocinador

\*\*\* The Online Pesticide Manual (18th ed., 2018).

### 3.2 Princípio do teste

O teste de mutação reversa com bactéria utiliza linhagens de *Salmonella* Typhimurium auxotróficas para o aminoácido histidina na detecção de mutações pontuais, que envolvem substituição, adição ou deleção de um ou alguns pares de base no DNA. O teste detecta mutações que revertem aquelas já existentes e restauram a capacidade de síntese do aminoácido essencial na bactéria. Os revertentes são detectados por sua habilidade de crescer na ausência do aminoácido do qual a linhagem parental era dependente. O sistema de reversão da histidina em *Salmonella* Typhimurium mede a taxa de reversão  $his^- \rightarrow his^+$  induzida por uma substância química capaz de causar mudanças de base ou deslocamento de quadro de leitura no genoma de tal organismo.

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RI25224/2021AM

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV, da Lei 9.279/96

Página 12 de 38

Right Solutions e Right Partner

autorizados.

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Suspensões de células bacterianas são expostas ao item de teste na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno em dois experimentos independentes: método de incorporação direta em placas e método de pré-incubação. Após três dias de incubação, as colônias revertentes são contadas e comparadas com o número de colônias revertentes espontâneas obtidas nas placas de controle negativo (controle do solvente).

### 3.3 Sistema-Teste

Cinco cepas de *Salmonella* Typhimurium adquiridas da Molttox® (Boone, NC, EUA) foram utilizadas:

Genótipos das cinco cepas de *Salmonella* Typhimurium.

Cepa	Genótipo	Tipo de Mutação	RE
TA98	<i>his<sup>-</sup></i> , <i>bio<sup>-</sup></i> , <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , pKM101, Ap <sup>R</sup>	Deslocamento no quadro de leitura	15-75
TA100	<i>his<sup>-</sup></i> , <i>bio<sup>-</sup></i> , <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , pKM101, Ap <sup>R</sup>	Substituição de pares de base	60-220
TA102	<i>his<sup>-</sup></i> , <i>bio<sup>-</sup></i> , <i>rfa</i> , <i>uvrB</i> , pKM101, Ap <sup>R</sup> , pAQ1, Tt <sup>R</sup>	Substituição de pares de base	240-320
TA1535	<i>his<sup>-</sup></i> , <i>bio<sup>-</sup></i> , <i>rfa</i> , <i>uvrB</i>	Substituição de pares de base	5-50
TA1537	<i>his<sup>-</sup></i> , <i>bio<sup>-</sup></i> , <i>rfa</i> , <i>uvrB</i>	Deslocamento no quadro de leitura	3-25

RE = número de revertentes espontâneos.

As linhagens auxotróficas para histidina são derivadas da linhagem parental LT2 de *Salmonella* Typhimurium apresentando diferentes mutações no operon da histidina. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos que envolve a superfície da bactéria e aumenta a permeabilidade da parede celular a moléculas maiores. A mutação *uvrB* é causada pela deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisão, levando a uma maior sensibilidade a agentes mutagênicos. A deleção do gene *uvrB* se estendeu até o gene *bio* e as cepas se tornaram auxotróficas para biotina. A cepa TA102 não possui a mutação *uvrB*, pois foi construída para detectar agentes mutagênicos aos quais o sistema de reparo de excisão é necessário. As cepas padrões TA98, TA100 e TA102 apresentam o plasmídeo fator R (pKM101), que aumenta a mutagênese química e espontânea por aprimorar o sistema de reparo do DNA presente nas cepas. A cepa TA102 também possui o plasmídeo em multicópia pAQ1 que apresenta a mutação *hisG428*.

### 3.4 Confirmação das Características Genéticas

Os genótipos das cepas foram verificados com o objetivo de assegurar as características genéticas originais das bactérias. Através do crescimento em meios seletivos, analisou-se a sensibilidade à radiação UV e ao cristal violeta, resistência à ampicilina e à tetraciclina. Os números de colônias de revertentes espontâneos por placa para cada cepa estiveram dentro da faixa aceitável descrita na literatura por Maron & Ames (1983) and De Serres & Shelby (1979). Os genótipos das cepas são confirmadas regularmente.

#### 3.4.1 Dependência de histidina e biotina (*his<sup>-</sup>*) (*bio<sup>-</sup>*)

Cada uma das cinco cepas foi estriada em uma placa de ágar mínimo com L-histidina 0,5% e biotina 0,5 mM e uma placa de ágar mínimo com biotina 0,5 mM. Após o período de incubação de  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  todas as cepas apresentaram crescimento de colônias na



placa com L-histidina 0,5% e biotina 0,5 mM. Nenhuma cepa apresentou crescimento na placa com biotina 0,5 mM.

### 3.4.2 Mutação *rfa*

Com o auxílio de swab estéril, culturas das cinco cepas foram semeadas em placas com ágar nutriente e discos de papel filtro contendo 10 µL da solução de cristal violeta a 0,1% foram colocados nas placas inoculadas. Após período de incubação de  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , houve a formação de halo de inibição de crescimento ao redor de cada círculo indicando a presença da mutação *rfa*.

### 3.4.3 Sensibilidade à radiação UV (*uvrB*)

Com o auxílio de swab estéril, culturas das cinco cepas foram semeadas em placas com ágar nutriente e metade da placa foi exposta à irradiação germicida UV. Após o período de incubação de  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , somente a cepa TA102 apresentou crescimento em ambos os lados da placa enquanto que as demais apresentaram crescimento apenas na metade não irradiada da placa.

### 3.4.4 Resistência à ampicilina (Fator R)

Com auxílio de uma alça de inoculação estéril, placas com ágar nutriente foram estriadas com solução de ampicilina (8 mg/mL) em uma linha reta e, após a secagem, cada cepa foi estriada perpendicularmente à linha de ampicilina. Após o período de incubação de  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , as cepas TA98, TA100 e TA102 cresceram normalmente e as cepas TA1535 e TA1537 apresentaram crescimento interrompido na zona da estria de ampicilina.

### 3.4.5 Resistência à tetraciclina (pAQ1)

Com auxílio de uma alça de inoculação estéril, placas com ágar nutriente foram estriadas com solução de tetraciclina (8 mg/mL) em uma linha reta e, após a secagem, cada cepa foi estriada perpendicularmente à linha de tetraciclina. Após o período de incubação de  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , apenas a cepa TA102 cresceu normalmente enquanto que as demais apresentaram crescimento interrompido na zona da estria de tetraciclina.

## 3.5 Controles positivos

As seguintes substâncias químicas foram utilizadas como controles positivos:

#### Controles Positivos

Ativação Metabólica	Cepa	Composto	Veículo	Concentração
Ausente	TA98	2-Nitrofluoreno	DMSO	2,0 µg/placa
	TA100	Azida sódica	DMSO	5,0 µg/placa
	TA102	Mitomicina C	Água deionizada	0,5 µg/placa
	TA1535	Azida sódica	DMSO	5,0 µg/placa
	TA1537	ICR191-Acridina	Água deionizada	1,0 µg/placa
Presente	Todas	2-Aminoantraceno	DMSO	2,5 µg/placa



### 3.6 Teste de solubilidade

A solubilidade do item de teste foi determinada dissolvendo-se sua máxima concentração recomendada em água deionizada. As soluções do item de teste foram preparadas imediatamente antes do início do teste. Insolubilidade pode ser detectada pela observação a olho nu de precipitado na solução. O item de teste apresentou boa solubilidade na concentração máxima recomendada de 5000 µg/placa em água deionizada, não sendo observado sinais de precipitação. Água deionizada foi escolhida como solvente por não ser tóxico para as bactérias.

### 3.7 Controle de viabilidade das culturas

As culturas utilizadas no teste foram preparadas através de inoculação em frascos com tampa contendo 30 mL de caldo nutriente Oxoid N° 2, incubado por 16 a 18 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  em incubadora giratória para obtenção de uma densidade aproximada de  $10^8 - 10^9$  unidades formadoras de colônias/mL. O número de colônias viáveis foi determinado plaqueando-se 100 µL da cultura após diluição de  $10^{-6}$  em placas de ágar nutriente. Após período de incubação de 24 a 72 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  foi realizada a contagem das colônias (Anexo 4).

### 3.8 Controle de esterilidade do sistema operacional

A esterilidade do top ágar, mistura S9, solvente (água deionizada), solução estoque do item de teste e placas de ágar mínimo foi verificada. Para a verificação das condições de esterilidade do item de teste, uma placa de ágar mínimo foi incubada com 100 µL do item de teste na concentração máxima recomendada de 5000 µg/placa a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $72 \pm 3$  horas.

### 3.9 Ativação metabólica (Fração S9 e Mistura S9)

A fração microsomal (fração S9) foi preparada a partir de fígado de ratos machos Sprague Dawley tratados com o agente indutor (Aroclor 1254) e comercializada pela Molttox® (Boone, NC, EUA).

A mistura S9 foi preparada no momento do teste, de acordo com Maron & Ames (1983), contendo os seguintes compostos abaixo por mL:

Água deionizada	385 µL
Tampão fosfato 0,2 M pH 7,4	500 µL
Solução de glicose-6-fosfato 1 M	5 µL
Solução de NADP 0,1 M	40 µL
Solução de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M + solução de KCl 1,65 M	20 µL
Fração S9	50 µL

Durante o experimento a mistura S9 foi mantida em banho de gelo.

A concentração de proteína na fração S9 empregada no ensaio foi de 37,0 mg/mL (Lote do S9 4253). Os resultados do controle com benzo(a)pireno para a fração S9 estão apresentados no Anexo 3.

### 3.10 Composição do ágar mínimo glicosado e top ágar

Os meios foram preparados de acordo com protocolo descrito por Maron & Ames (1983). O meio ágar mínimo glicosado é constituído de Bacto ágar, meio Vogel Bonner E (10x) e solução de glicose 40%. O top ágar contém 0,6% de Bacto ágar, 0,5% de NaCl e solução 0,5 mM de histidina/biotina.

### 3.11 Método de incorporação direta (Experimento I)

O experimento I foi realizado pelo método de incorporação direta em placa com todas as linhagens (TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537) na ausência e presença de ativação metabólica para determinar os limites de concentração, a citotoxicidade e a solubilidade do item de teste e, também, para a seleção das concentrações que foram utilizadas no Experimento II.

Sinais de toxicidade nas placas teste são evidenciados pelo fundo ("background") ausente ou reduzido e pela redução do número de colônias. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa. Todas as placas foram testadas em triplicatas, exceto os controles positivos, que foram testados em duplicata.

Para o método de incorporação direta em placa na ausência de ativação metabólica 0,1 mL do item de teste, 0,1 mL da cultura bacteriana crescida por 18 horas e 0,5 mL de tampão fosfato foram adicionados a 2,0 mL de top ágar. Para o teste na presença de ativação metabólica 0,5 mL de mistura S9 foram incorporados ao top ágar em vez de 0,5 mL de tampão fosfato utilizados na ausência de atividade metabólica. O conteúdo de cada tubo foi misturado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo. Após a solidificação, as placas foram incubadas por  $72 \pm 3$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.12 Método de pré-incubação (Experimento II)

O Experimento II foi realizado pelo método de pré-incubação. Foram utilizadas as concentrações: 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa para todas as cepas, exceto para a cepa TA1535 ( $\pm$  S9). Devido à inibição do *background* bacteriano observado no Experimento I nas concentrações de 1500 e 5000 µg/placa, a cepa TA1535 ( $\pm$  S9) foi testada com as concentrações de 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa.

Todas as placas foram analisadas com intervalos adequados entre os pontos utilizando-se a concentração máxima de 5000 µg/placa e pré-incubadas por 20 minutos a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  antes da adição do top ágar. Todas as placas foram testadas em triplicatas (exceto os controles positivos que foram testados em duplicata).

Para o teste na ausência de ativação metabólica, 0,5 mL de tampão fosfato foi incubado com 0,1 mL do item de teste e 0,1 mL da cultura bacteriana crescida pernoite. Para o teste na presença de ativação metabólica, 0,5 mL da mistura S9 foi incubado com 0,1 mL do item de teste e 0,1 mL da cultura bacteriana crescida pernoite. Após os 20 minutos de incubação à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , foram adicionados 2,0 mL de top ágar à mistura. O conteúdo de cada tubo foi misturado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo. Após a solidificação, as placas foram incubadas por  $72 \pm 3$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.13 Avaliação do Ensaio

Os resultados foram expressos em número de colônias revertentes por placa e pela razão de mutagenicidade (RM), que corresponde à razão entre o número de colônias revertentes nas

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RI25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes resultados e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGRO DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Página 16 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)



placas-teste e o número de colônias revertentes nas placas controle negativo. O número de colônias de revertentes espontâneos de cada cepa do controle negativo foi comparado à faixa normal aceitável descrita na literatura e aos valores do controle histórico.

### 3.14 Análise dos Resultados

Um resultado é considerado positivo quando as razões de mutagenicidade nas placas-teste, após 72 horas de incubação, forem superiores ou iguais a 2 ( $RM \geq 2$ ) para as cepas TA98, TA100 e TA102 ou se forem maiores ou iguais a 3 ( $RM \geq 3$ ) para as cepas TA1535 e TA1537. Para confirmação do resultado positivo, a análise de variância deve apresentar resultados significantes ( $pANOVA < 0,05$ ) e as concentrações testadas devem apresentar uma clara relação dose-resposta. Uma substância cujos resultados não estejam de acordo com os critérios descritos é considerada não mutagênica.

A análise de variância (pANOVA) tem por finalidade comparar estatisticamente as médias dos números de revertentes entre as diferentes concentrações do item de teste. Quando o valor do pANOVA é menor que 0,05 conclui-se que há uma diferença significativa em pelo menos uma das concentrações. O efeito dose-resposta é avaliado por meio de análise de regressão linear simples, onde o modelo Revertentes (*dose*) = *intercept* + *slope dose* é ajustado pelo método dos quadrados mínimos. Os principais indicadores utilizados nessa análise são a inclinação da reta e seu nível descritivo (p-valor). Quando p-valor é menor que 0,05, conclui-se que há uma tendência de variação do número de revertentes em função da concentração do produto. Nesse caso, uma inclinação positiva da reta pode indicar tendência crescente (possível mutagenicidade) e uma inclinação negativa pode indicar tendência decrescente (possível toxicidade).



### 3.15 Critérios de avaliação do ensaio

O ensaio é considerado válido quando:

- a) houver presença de uma fina camada de crescimento bacteriano ("*background*") nas placas controle;
- b) a frequência de reversão espontânea das placas do controle negativo estiver dentro da descrita pela literatura (Maron & Ames, 1983; De Serres & Shelby, 1979) e próximo aos valores do histórico do laboratório;
- c) os controles positivos apresentarem atividade mutagênica frente às cepas-teste.
- d) um mínimo de cinco doses analisáveis deve estar presente, não apresentando sinais de toxicidade como a redução no número de revertentes resultando em RM abaixo de 0,5.

## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Controles Negativo e Positivo

Os resultados dos controles negativos utilizados nos testes foram adequados para todas as cepas. Os controles negativos com a cepa TA1537 (-S9) no Experimento II mostraram resultados acima dos valores do histórico do laboratório. Porém esses valores estão de acordo com o descrito pela literatura (Maron & Ames 1983; De Serres & Shelby 1979) e não foram considerados significativos. Portanto, os experimentos foram considerados válidos para a análise.

Os controles positivos claramente induziram aumentos no número de revertentes para todas as cepas bacterianas, confirmando a sensibilidade da cultura e da atividade da mistura S9. No Experimento II, a linhagem TA100 (+S9) apresentou número de revertentes do controle positivo abaixo do histórico do laboratório. Como a atividade mutagênica e a eficácia do sistema de ativação metabólica foram confirmadas, essa variação não foi considerada relevante.

### 4.2 Teste de mutagenicidade

Os resultados do teste definitivo obtidos após 72 horas de incubação de *Salmonella* Typhimurium expostas ao item de teste Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) estão dispostos nas Tabelas 1 a 20.

Experimento I foi realizado pelo método de incorporação direta em placa com todas as linhagens nas seguintes concentrações: 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa.

Foi observada inibição total do "background" bacteriano nas concentrações de: 1500 e 5000 µg/placa para a cepa TA1535 (±S9).

Com base nos resultados obtidos no Experimento I, Experimento II foi realizado, utilizando-se do método de pré-incubação, nas seguintes concentrações 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa para todas as cepas, exceto para a cepa TA1535 (±S9) que foram utilizadas as concentrações: 5, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 µg/placa.

Ambos os experimentos foram realizados na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica (mistura S9). A mistura S9 consiste em 5% v/v da fração microsomal de fígado de ratos induzido com Aroclor 1254, suplementada com cofatores

Não se observou um aumento significativo do número de revertentes nas cepas testadas após o tratamento com **isopirrazam/cyproconazole SC (A19022A)** em qualquer uma das concentrações testadas tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Uma tendência de efeito concentração-resposta (aumento do número de revertentes com o aumento da concentração testada) também não foi observada dentro dos critérios considerados de significância biológica. As razões de mutagenicidade foram inferiores a 2 para todas as cepas na ausência e presença de ativação metabólica. A análise de variância apresentou respostas significantes ( $p\text{ANOVA} < 0,05$ ) para as cepas TA98 (+S9), TA102 (+S9), TA1535 (+S9) e TA1537 (-S9), no Experimento I, e para as cepas TA98 (-S9), TA100 (+S9) e TA1537 ( $\pm$ S9), no Experimento II.

A análise de variância foi realizada, a significância estatística encontrada não é indicativa de efeito mutagênico, é devido às oscilações no número de revertentes, sinais de toxicidade e aumento do número de revertentes nas maiores concentrações analisadas.

Esta significância estatística ocorreu, pois, as cepas TA98 (+S9), TA102 (+S9) e TA1537 (-S9), no experimento I e TA98 (-S9) e TA1537 ( $\pm$ S9), no experimento II, apresentaram oscilações no número de revertentes entre as diferentes concentrações analisadas. As cepas TA1535 (+S9), no experimento I e TA100 (+S9), no experimento II, apresentaram o aumento do número de revertentes nas maiores concentrações analisadas, porém sem significância biológica uma vez que o valor da razão de mutagenicidade (RM) manteve-se abaixo de 2. Portanto, a significância estatística não é indicativa de um efeito mutagênico.

## 5.0 CONCLUSÕES

Nas condições do teste, o item de teste **isopirrazam/cyproconazole SC (A19022A)** não induziu mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA no genoma das cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 de *Salmonella* Typhimurium nas concentrações testadas, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Portanto, o item de teste **isopirrazam/cyproconazole SC (A19022A)** nas condições descritas não apresentou efeito mutagênico.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De Serres, F.J.; Shelby, M.D. Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/Microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 64: 159-165, 1979.

INMETRO: NIT-DICLA-035 - Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL, Rev. 04, Outubro/2019 e seus documentos complementares.

Maron, D.M. & Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215, 1983.

OECD Guideline for Testing of Chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test. 471, 11p. 2020.

Turner, J.A. The Online Pesticide Manual. 18.ed. United Kingdom: BCPC, 2018. Disponível em: <http://www.bcpc.org/>.

TABELAS

CONFIDENTIAL  
Property of Syngenta



RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL  
Número do relatório: RI25224/2021AM

Right Solutions - Right Partner  
autorizados.

Estes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNGENTA S.A. DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV, da  
Lei 9.279/96



**TABELA 1** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA98 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	24	24	26	25 $\pm$ 1	-
1,5	20	22	27	23 $\pm$ 4	0,93
5	24	27	20	24 $\pm$ 4	0,96
15	21	20	26	22 $\pm$ 3	0,91
50	20	22	20	21 $\pm$ 1	0,84
150	25	24	21	23 $\pm$ 2	0,95
500	21	20	20	20 $\pm$ 1	0,82
1500	23	26	23	24 $\pm$ 2	0,97
5000	21	21	18	20 $\pm$ 2	0,81
CP <sup>b</sup>	178	188	-	183 $\pm$ 7	7,42

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,187

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta  $\approx$  -0,001; p-valor = 0,113

**TABELA 2** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) SC testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA98 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	26	28	28	27 $\pm$ 1	-
1,5	19	23	22	21 $\pm$ 2	0,78
5	23	23	23	23 $\pm$ 0	0,84
15	20	23	20	21 $\pm$ 2	0,77
50	21	20	21	21 $\pm$ 1	0,76
150	25	20	22	22 $\pm$ 3	0,82
500	23	22	24	23 $\pm$ 1	0,84
1500	26	19	25	23 $\pm$ 4	0,85
5000	22	21	20	21 $\pm$ 1	0,77
CP <sup>b</sup>	312	267	-	290 $\pm$ 32	10,59

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,011

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta  $\approx$  -0,001; p-valor = 0,344

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100  $\mu\text{L/placa}$ ).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 2,0  $\mu\text{g/placa}$  de 2-Nitrofluoreno (sem ativação metabólica).  
2,5  $\mu\text{g/placa}$  de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 3** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA100 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	93	109	95	99 $\pm$ 9	-
1,5	103	79	100	94 $\pm$ 13	0,95
5	105	91	105	100 $\pm$ 8	1,01
15	112	94	121	109 $\pm$ 14	1,10
50	117	95	105	106 $\pm$ 11	1,07
150	92	93	89	91 $\pm$ 2	0,92
500	119	96	95	103 $\pm$ 14	1,04
1500	104	108	172	128 $\pm$ 38	1,29
5000	93	101	76	90 $\pm$ 13	0,91
CP <sup>b</sup>	588	545	-	567 $\pm$ 30	5,72

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,229

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,625

**TABELA 4** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA100 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	128	151	132	137 $\pm$ 12	-
1,5	131	142	125	133 $\pm$ 9	0,97
5	135	131	133	133 $\pm$ 2	0,97
15	118	131	138	129 $\pm$ 10	0,94
50	146	109	128	128 $\pm$ 19	0,93
150	114	138	122	125 $\pm$ 12	0,91
500	125	120	105	117 $\pm$ 10	0,85
1500	115	124	121	120 $\pm$ 5	0,88
5000	145	129	111	128 $\pm$ 17	0,94
CP <sup>b</sup>	473	506	-	490 $\pm$ 23	3,57

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,536

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,660

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100  $\mu\text{L/placa}$ ).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 5,0  $\mu\text{g/placa}$  de Azida Sódica (sem ativação metabólica).

2,5  $\mu\text{g/placa}$  de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 5** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA102 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	262	259	296	272 ± 21	-
1,5	278	279	262	273 ± 10	1,00
5	268	261	275	268 ± 7	0,98
15	269	253	274	265 ± 11	0,97
50	278	248	289	272 ± 21	1,00
150	260	258	247	255 ± 7	0,94
500	259	267	270	265 ± 6	0,97
1500	261	260	263	261 ± 2	0,96
5000	271	279	267	272 ± 6	1,00
CP <sup>b</sup>	628	638	-	633 ± 7	2,32

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,611

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,001; p-valor = 0,642

**TABELA 6** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA102 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	291	281	272	281 ± 10	-
1,5	258	258	250	255 ± 5	0,91
5	253	247	253	251 ± 3	0,89
15	279	259	246	261 ± 17	0,93
50	250	249	246	248 ± 2	0,88
150	248	245	255	249 ± 5	0,89
500	251	242	250	248 ± 5	0,88
1500	253	271	248	257 ± 12	0,91
5000	265	244	245	251 ± 12	0,89
CP <sup>b</sup>	597	557	-	577 ± 28	2,05

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,006

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,455

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 0,5 µg/placa de Mitomicina C (sem ativação metabólica).

2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).



**TABELA 7** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1535 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	23	16	17	19 ± 4	-
1,5	18	16	18	17 ± 1	0,93
5	20	15	17	17 ± 3	0,93
15	15	18	19	17 ± 2	0,93
50	16	17	16	16 ± 1	0,88
150	26	17	17	20 ± 5	1,07
500	16	18	16	17 ± 1	0,89
1500*	-	-	-	-	-
5000*	-	-	-	-	-
CP <sup>b</sup>	514	729	-	622 ± 152	33,29

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,720

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,752

**TABELA 8** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1535 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	26	21	18	22 ± 4	-
1,5	19	20	15	18 ± 3	0,83
5	15	16	18	16 ± 2	0,75
15	20	16	16	17 ± 2	0,80
50	16	16	15	16 ± 1	0,72
150	22	21	28	24 ± 4	1,09
500	22	25	28	25 ± 3	1,15
1500*	-	-	-	-	-
5000*	-	-	-	-	-
CP <sup>b</sup>	82	113	-	98 ± 22	4,50

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,004

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,015; p-valor = 0,003

\* Concentração tóxica; (-) nenhum crescimento observado.

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 5,0 µg/placa de Azida Sódica (sem ativação metabólica).  
2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 9** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1537 (experimento I; método de incorporação direta em placas; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	9	7	8	8 $\pm$ 1	-
1,5	7	7	6	7 $\pm$ 1	0,83
5	9	9	9	9 $\pm$ 0	1,13
15	8	9	8	8 $\pm$ 1	1,04
50	6	7	6	6 $\pm$ 1	0,79
150	9	8	8	8 $\pm$ 1	1,04
500	10	10	12	11 $\pm$ 1	1,33
1500	12	10	8	10 $\pm$ 2	1,25
5000	6	10	8	8 $\pm$ 2	1,00
CP <sup>b</sup>	897	814	-	856 $\pm$ 59	106,94

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,004

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta < 0,001; p-valor = 0,720

**TABELA 10** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1537 (experimento I; método de incorporação direta em placas; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	18	16	18	17 $\pm$ 1	-
1,5	14	17	13	15 $\pm$ 2	0,85
5	16	9	19	15 $\pm$ 5	0,85
15	20	13	10	14 $\pm$ 5	0,83
50	14	17	19	17 $\pm$ 3	0,96
150	13	12	12	12 $\pm$ 1	0,71
500	16	11	14	14 $\pm$ 3	0,79
1500	13	19	15	16 $\pm$ 3	0,90
5000	17	17	17	17 $\pm$ 0	0,98
CP <sup>b</sup>	92	115	-	104 $\pm$ 16	5,97

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,522

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta < 0,001; p-valor = 0,270

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100  $\mu\text{L/placa}$ ).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 1,0  $\mu\text{g/placa}$  de ICR 191-Acridina (sem ativação metabólica).  
2,5  $\mu\text{g/placa}$  de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 11 Resultados de Isopirrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA98 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).**

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	25	34	31	30 ± 5	-
15	21	22	21	21 ± 1	0,71
50	28	41	34	34 ± 7	1,14
150	36	31	26	31 ± 5	1,03
500	30	29	24	28 ± 3	0,92
1500	23	18	18	20 ± 3	0,66
5000	20	34	18	24 ± 9	0,80
CP <sup>b</sup>	210	211	-	211 ± 1	7,02

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,030

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,174

**TABELA 12 Resultados de Isopirrazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA98 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).**

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	44	28	28	33 ± 9	-
15	30	24	29	28 ± 3	0,83
50	38	33	38	36 ± 3	1,09
150	24	27	36	29 ± 6	0,87
500	30	36	21	29 ± 8	0,87
1500	38	35	27	33 ± 6	1,00
5000	33	19	25	26 ± 7	0,77
CP <sup>b</sup>	396	291	-	344 ± 74	10,31

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,426

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,202

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 2,0 µg/placa de 2-Nitrofluoreno (sem ativação metabólica).

2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).



**TABELA 13** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA100 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	100	94	109	101 ± 8	-
15	118	80	74	91 ± 24	0,90
50	117	125	121	121 ± 4	1,20
150	144	137	93	125 ± 28	1,23
500	160	133	121	138 ± 20	1,37
1500	138	130	111	126 ± 14	1,25
5000	102	120	125	116 ± 12	1,15
CP <sup>b</sup>	530	508	-	519 ± 16	5,14

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,071

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,001; p-valor = 0,718

**TABELA 14** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA100 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	115	87	109	104 ± 15	-
15	73	125	74	91 ± 30	0,87
50	116	122	102	113 ± 10	1,09
150	147	127	137	137 ± 10	1,32
500	155	130	138	141 ± 13	1,36
1500	117	150	136	134 ± 17	1,30
5000	156	144	140	147 ± 8	1,41
CP <sup>b</sup>	320	334	-	327 ± 10	3,15

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,005

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,007; p-valor = 0,022

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 5,0 µg/placa de Azida Sódica (sem ativação metabólica).  
2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 15** Resultados de Isoprazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA102 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	279	249	273	267 ± 16	-
15	248	267	271	262 ± 12	0,98
50	282	267	288	279 ± 11	1,04
150	275	259	249	261 ± 13	0,98
500	245	269	270	261 ± 14	0,98
1500	256	261	248	255 ± 7	0,96
5000	268	248	248	255 ± 12	0,95
CP <sup>b</sup>	706	766	-	736 ± 42	2,76

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,299

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,003; p-valor = 0,117

**TABELA 16** Resultados de Isoprazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA102 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	256	263	287	269 ± 16	-
15	278	277	265	273 ± 7	1,02
50	251	281	250	261 ± 18	0,97
150	266	263	277	269 ± 7	1,00
500	243	276	266	262 ± 17	0,97
1500	254	286	242	261 ± 23	0,97
5000	254	250	252	252 ± 2	0,94
CP <sup>b</sup>	555	551	-	553 ± 3	2,06

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,648

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = -0,003; p-valor = 0,079

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 0,5 µg/placa de Mitomicina C (sem ativação metabólica).  
2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

**TABELA 17** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1535 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	23	26	23	24 ± 2	-
5	28	23	15	22 ± 7	0,92
15	20	25	24	23 ± 3	0,96
50	24	24	17	22 ± 4	0,90
150	17	17	18	17 ± 1	0,72
500	28	27	20	25 ± 4	1,04
1500*	-	-	-	-	-
5000*	-	-	-	-	-
CP <sup>b</sup>	513	518	-	516 ± 4	21,48

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,276

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,004; p-valor = 0,525

**TABELA 18** Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1535 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).

ITEM DE TESTE (µg/placa)	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	30	17	24	24 ± 7	-
5	20	19	19	19 ± 1	0,82
15	23	29	15	22 ± 7	0,94
50	20	29	28	26 ± 5	1,08
150	24	25	28	26 ± 2	1,08
500	20	33	28	27 ± 7	1,14
1500*	-	-	-	-	-
5000*	-	-	-	-	-
CP <sup>b</sup>	147	128	-	138 ± 13	5,81

Análise de variância ⇒ pANOVA = 0,533

Regressão Linear ⇒ inclinação da reta = 0,010; p-valor = 0,161

\*Concentração tóxica; (-) nenhum crescimento observado.

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100 µL/placa).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 5,0 µg/placa de Azida Sódica (sem ativação metabólica).  
2,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).



**TABELA 19 Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1537 (experimento II; método de pré-incubação; ausência de ativação metabólica).**

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	11	18	14	14 $\pm$ 4	-
15	7	10	7	8 $\pm$ 2	0,56
50	12	10	13	12 $\pm$ 2	0,81
150	12	8	10	10 $\pm$ 2	0,70
500	8	9	6	8 $\pm$ 2	0,53
1500	9	6	9	8 $\pm$ 2	0,56
5000	7	10	6	8 $\pm$ 2	0,53
CP <sup>b</sup>	132	129	-	131 $\pm$ 2	9,10

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,010

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta = -0,001; p-valor = 0,094

**TABELA 20 Resultados de Isopirazam/Cyproconazole SC (A19022A) testado com *Salmonella* Typhimurium cepa TA1537 (experimento II; método de pré-incubação; presença de ativação metabólica).**

ITEM DE TESTE ( $\mu\text{g/placa}$ )	REVERTENTES POR PLACA			MÉDIA E DP	RM
0 <sup>a</sup>	10	15	12	12 $\pm$ 3	-
15	6	7	7	7 $\pm$ 1	0,54
50	5	10	7	7 $\pm$ 3	0,59
150	7	9	5	7 $\pm$ 2	0,57
500	9	7	6	7 $\pm$ 2	0,59
1500	8	8	7	8 $\pm$ 1	0,62
5000	8	6	6	7 $\pm$ 1	0,54
CP <sup>b</sup>	158	154	-	156 $\pm$ 3	12,65

Análise de variância  $\Rightarrow$  pANOVA = 0,015

Regressão Linear  $\Rightarrow$  inclinação da reta  $\approx$  -0,001; p-valor = 0,293

DP = Desvio padrão.

RM = Razão de mutagenicidade.

0<sup>a</sup> = Controle negativo: água deionizada (100  $\mu\text{L/placa}$ ).

CP<sup>b</sup> = Controles positivos: 1,0  $\mu\text{g/placa}$  de ICR 191-Acridina (sem ativação metabólica).  
2,5  $\mu\text{g/placa}$  de 2-Aminoantraceno (com ativação metabólica).

## ANEXOS

CONFIDENTIAL  
Property of Syngenta

syngenta®

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL  
Número do relatório: RI25224/2021AM

### RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNGENTA DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da  
Lei 9.279/96

Right Solutions - Right Partner  
É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não  
autorizados.

Página 31 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Cepa	Controle negativo			
	Ausência de ativação metabólica		Presença de ativação metabólica	
	Min. – Máx.	Média ± DP	Min. – Máx.	Média ± DP
TA98	17 - 38	25 ± 4	19 - 41	28 ± 4
TA100	71 - 174	117 ± 15	83 - 185	118 ± 17
TA102	248 - 305	273 ± 9	247 - 303	272 ± 10
TA1535	16 - 31	23 ± 4	16 - 32	23 ± 4
TA1537	6 - 16	10 ± 2	6 - 19	12 ± 3
Cepa	Controle positivo			
	Ausência de ativação metabólica		Presença de ativação metabólica	
	Min. – Máx.	Média ± DP	Min. – Máx.	Média ± DP
TA98	92 - 314	144 ± 40	78 - 1287	380 ± 278
TA100	303 - 1133	737 ± 162	307 - 1239	641 ± 233
TA102	526 - 1130	701 ± 105	515 - 1095	621 ± 103
TA1535	86 - 1210	756 ± 226	83 - 772	189 ± 113
TA1537	109 - 1460	633 ± 347	50 - 1231	122 ± 126

DP = Desvio padrão

Período: Março de 2019 a Março de 2021.



## ANEXO 2

## Histórico de Dados dos Controles Negativo e Positivo para o Método de Pré-Incubação (Experimento II).

Cepa	Controle negativo			
	Ausência de ativação metabólica		Presença de ativação metabólica	
	Min. – Máx.	Média ± DP	Min. – Máx.	Média ± DP
TA98	20 - 31	24 ± 3	19 - 40	27 ± 5
TA100	86 - 176	119 ± 18	80 - 195	119 ± 24
TA102	257 - 296	272 ± 8	258 - 302	271 ± 10
TA1535	16 - 30	22 ± 3	17 - 26	22 ± 2
TA1537	6 - 13	10 ± 2	6 - 17	11 ± 2
Cepa	Controle positivo			
	Ausência de ativação metabólica		Presença de ativação metabólica	
	Min. – Máx.	Média ± DP	Min. – Máx.	Média ± DP
TA98	96 - 427	175 ± 61	99 - 1245	698 ± 325
TA100	396 - 941	698 ± 145	379 - 1343	838 ± 282
TA102	520 - 1133	766 ± 168	528 - 1314	671 ± 163
TA1535	148 - 961	682 ± 225	96 - 312	167 ± 56
TA1537	112 - 1100	537 ± 258	52 - 292	155 ± 68

DP = Desvio padrão

Período: Março de 2019 a Março de 2021.

## ANEXO 3

## Resultados do Controle com Benzo(A)Pireno

## Resultados do controle com Benzo(a)pireno (lote nº LRAB7723) para os controles negativo e positivo com ativação metabólica (S9 lote nº 4253)

Cepa	Benzo(a)pireno (µg/placa)	Revertentes/placa Controle Negativo Média ± DP	Revertentes/placa Controle Positivo Média ± DP
TA98	20	35 ± 3	432 ± 8
TA100	20	106 ± 8	642 ± 11
TA102	20	273 ± 11	463 ± 35
TA1535	20	20 ± 3	188 ± 10
TA1537	20	11 ± 2	330 ± 50

DP = Desvio padrão

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

Número do relatório: RI25224/2021AM

Lei 9.279/96

Right Solutions e Right Partner autorizados.

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

SYNGENETICS E S9 DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Lei 9.279/96

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

Data do teste	Viabilidade				
	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
16/04/2021	-	$3,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
20/04/2021	$6,6 \times 10^8$	-	-	-	-
23/04/2021	$7,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL"

Número do relatório: RI25224/2021AM

Right Solutions - Right Partner  
autorizados.

#### RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes dados e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNGENTA DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da  
Lei 9.279/96

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

**MOLTOX<sup>®</sup>**  
Molecular Toxicology, Inc.

**POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S9)**  
**QUALITY CONTROL & PRODUCTION CERTIFICATE**

<b>Animal Information</b>		<b>Part Number Information</b>		<b>PREP:</b> June 09, 2020
SPECIES: <u>Rat</u>		LOT NO.: <u>4253</u>		<b>EXPIRY:</b> June 09, 2022
STRAIN: <u>Sprague Dawley</u>		PART NO.: <u>11-01L</u>		<b>INDUCING AGENT:</b> <u>Aroclor</u>
SEX: <u>Male</u>		VOLUME: <u>2.1 mL</u>		<u>1254 (Monsanto KL61S), 500</u>
AGE: <u>5-6 weeks</u>		BUFFER: <u>0.15 M</u>		<u>mg/kg i.p.</u>
WEIGHT: <u>175-199 g</u>		KCl/Lyophilization Buffer		
TISSUE: <u>Liver</u>		STORAGE: <u>At or below -20°C</u>		

REFERENCE: Maron, D & Ames, B., *Mutat Res.* **113**: 173, 1983. For Research Purposes Only

**BIOCHEMISTRY:** Assayed according to the method of Lowry et al., *JBC* **193**:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

- PROTEIN: 37.0 mg/ml

- ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

Activity	P450	Fold - Induction	
BROD	2B1, 2B2	40.5	Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, benzyl- and methoxyresorufin-0-dealkylases (PROD, BROD, & MROD) were conducted using a modification of the methods of Burke, et al., <i>Biochem Pharm</i> <b>34</b> :3337, 1985. Fold-inductions were calculated as the ratio of the sample vs. uninduced specific activities (SA's). Control SA's (pmoles/min/mg protein) were 74.2, 45.4, 22.3 & 24.5 for BROD, EROD, MROD and PROD, respectively.
EROD	1A1, 1A2	134.6	
MROD	1A1, 1A2	49.5	
PROD	2B1, 2B2	30.0	

**BIOASSAY:**

- TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS  
Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 40 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

- PROMUTAGEN ACTIVATION  
The ability of the sample to activate ethidium (EtBr) and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca, et al., *Mutation Res.* **129**: 299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per mg CPA.

No. His <sup>+</sup> Revertants	TA98	TA1535
153.2	836	

Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 - 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(a)pyrene (BP) and 2-aminoanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted as described by Maron & Ames, (*Mutat Res* **113**: 173, 1983).

µl S9 per plate	number his <sup>+</sup> revertants per plate
Promutagen	0
BP (5 µg)	92
2-AA (2.5 µg)	131

0	1	5	10	20	50
92	153	193	232	329	513
131	263	633	1106	1762	1574

Approved: *Erin Decker* 06/12/20

MOLTOX TOXICOLOGY, INC. www.moltox.com (828) 264-9099

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL

Número do relatório: RI25224/2021AM

Right Solutions - Right Partner

autorizados.

#### RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNCHRONOUS TESTS DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV da Lei 9.279/96

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente



CERTIFICADO DE ANÁLISE PARA  
isopirazam/cyproconazole SC (A19022A)

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº: CA2030088

Patrocinador: SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA

Endereço: RUA DRº RUBENS GOMES BUENO, Nº 691-TO SIG. CEP: 04730-300 - SÃO PAULO/SP

## 1. DADOS DO ITEM DE TESTE

Identificação: Isopirazam/Cyproconazole (A19022A).  
Sinonímia: A19022; A19022A.  
Código ALS: 23359/2020CA.  
Número do lote: JCB001-020-002.  
Número do RET: 130419 Válido até: 26/12/2022.  
Data de fabricação: Novembro de 2019.  
Data de validade: Novembro de 2022.  
Ingrediente ativo (AI): Isopirazam; Cyproconazole.  
Concentração declarada de AI: 125 g/L (Isopirazam); 80 g/L (Cyproconazole).  
Nome Químico (IUPAC): mistura de syn-isômeros 3-(difluorometil)-1-metil-N-[(1RS,4SR,9RS)-1,2,3,4-tetrahydro-9-isopropyl-1,4-methanonaphthalen-5-yl]pyrazole-4-carboxamide e anti-isômeros 3-(difluorometil)-1-metil-N-[(1RS,4SR,9SR)-1,2,3,4-tetrahydro-9-isopropyl-1,4-methanonaphthalen-5-yl]pyrazole-4-carboxamide (Isopirazam); (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol (Cyproconazole).

## 2. EXPERIMENTAL

Equipamento: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC-DAD) 1260 Series AGILENT TECHNOLOGIES  
– Identificação 001822.

## 3. DATAS

Data inicial: 22 de Setembro de 2020.

Data final: 22 de Setembro de 2020.

## 4. RESULTADOS

Certificado de Análise	Resultados	
CA2030088	117,70 g/L Isopirazam	74,37 g/L Cyproconazole

*J. den*  
*flay*

ALS Laboratórios LS Ltda. - Rua Fábria, 59 - CEP: 05051-030 - São Paulo - SP - Brasil

Página 1 de 2

Right Solutions • Right Partner

www.alsglobal.com

“Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos

Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da

Número do relatório: RL25224/2021AM

Right Solutions • Right Partner

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente



CERTIFICADO DE ANÁLISE N°: CA2030088

##### 5. METODOLOGIA

Método Analítico fornecido pelo Patrocinador: Cyproconazole and Isopyrazam in Formulation (SC 080/125) by Liquid Chromatography

##### 6. ASSINATURAS

Victor F. G. da Silva  
Victor Ferreira Gomes da Silva  
Analista Químico  
CRQ 04164540

24- Setembro - 2020  
Data

Carolina Satie Hayashida  
Carolina Satie Hayashida  
Garantia da Qualidade

24- Setembro - 2020  
Data

ALS Laboratórios LS Ltda. - Rua Fábria, 59 - CEP: 05051-030 - São Paulo - SP - Brasil

Right Solutions • Right Partner

Página 2 de 2

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL"  
Número do relatório: RL25224/2021AM

Right Solutions • Right Partner

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente

RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS

Estes resultados de testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da SYNGENTA CROQUIS DE CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV, da Lei 9.279/96

Página 37 de 38

[www.alsglobal.com](http://www.alsglobal.com)

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro  
**Coordenação Geral de Acreditação**



### Certificado de Reconhecimento aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório

Reconhecimento n° BPL 0060

**ALS Laboratórios LS Ltda**  
Rua Cláudio, 182 – Água Branca – São Paulo – SP

Reconhecimento Inicial: 11-10-2017

A Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro concede à instalação de teste acima o Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório da OCDE para a condução de estudos não clínicos de segurança à saúde e ao meio ambiente, incluindo a mesma no Programa Brasileiro de Monitoramento BPL, com a seguinte definição de escopo:

Área de Especialidade	Categorias de Itens de Teste
Testes Físico-químicos; Estudos de Mutagenicidade	Agrotóxicos; Seus Componentes e Afins; Saneantes; Remediadores; Produtos Farmacêuticos; Cosméticos; Preservativos de Madeira; Aditivos de Alimentos; Aditivos para Rações; Produtos Veterinários; Produtos Químicos Industriais; Organismos Geneticamente Modificados (OGM) ou Derivados de OGM ou Organismos vivos Geneticamente Modificados; Produtos para Saúde; Dispositivos Médicos.

**Note:** As categorias de itens de teste "agrotóxicos, seus componentes e afins", "produtos farmacêuticos", "cosméticos", "saneantes", "medicamentos veterinários", "aditivos para rações", "preservativo de madeira", "produtos químicos industriais" e "produtos remediadores" estão contemplados pela adesão plena do Brasil, através da Coordenação Geral de Acreditação-Cgcre do Inmetro, aos Atos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE relacionados à Aceitação Mútua de Dados (MAD) de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratório-BPL.



Assinado de forma digital  
por ALDONEY FREIRE  
COSTA:54879590720  
Dados: 2021.02.18 08:03:11  
+03'00'

**Aldoney Freire Costa**  
Coordenador Geral de Acreditação

A situação atual do reconhecimento deve ser verificada no endereço eletrônico [http://www.inmetro.gov.br/monitoramento\\_BPL/certificados/](http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/certificados/)

MOD-CGCRE-027 – Rev. 08 – Apr. MAI/20 – Pg. 1/03

"Instalação de Teste Reconhecida em Conformidade aos  
Princípios das Boas Práticas de Laboratório BPL  
Número do relatório: RI25224/2021AM

**RESULTADOS DE TESTES E OUTROS DADOS NÃO DIVULGADOS**

Resultados de Testes e outros dados não divulgados são confidenciais e de propriedade da  
SYNCFID FERTILIZANTES E CULTIVOS LTDA., protegidos na forma da Lei 10.603/02 e do artigo 195, XIV, da  
Lei 9.279/96

Right Solutions – Right Partner

É proibida a revelação ou divulgação, e vedado o uso, ainda que parcial ou por vias indiretas, a terceiros não autorizados.

**Todos os infratores poderão ser processados civil e criminalmente**