

Relatório de ensaio: RE.DSA63.0115.06 **Teste de biodegradabilidade imediata da substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST**

Método: 301 B - OECD (1997)

Executado por: **BIOAGRI Laboratórios Ltda.**
Rod. SP 127, Km 24, Fone: (19) 3429-7700 – Fax: (19) 3429-7723
Cx. Postal: 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba – S.P. – Brasil
www.bioagri.com.br; bioagri@bioagri.com.br

Patrocinador: **LAAPSA LUBRIFICANTES E INSUMOS LTDA**
Rua Carlos Gomes, nº 1189
Fone: (19) 3452-7654
CEP: 13480-013
Limeira – SP – Brasil

**Gerente técnica-
substituta:**


Márcia R.T. de Camargo Ranzani, Dra.
Fone: (19) 3429-7707

Revisor:


Izabel C.G. de Souza, Msc.
Fone: (19) 3429-7722

Data de conclusão: **Mai/2006**

Este Relatório refere-se somente à amostra analisada, não sendo extensivo a outros lotes e/ou produtos.
Este Relatório só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Resumo

O teste de Biodegradabilidade Imediata 301 B (OECD, 1997) é um método respirométrico de avaliação, utilizado para substâncias não voláteis, e avalia a evolução de CO_2 . O teste tem uma duração máxima de 28 dias, podendo ter seu término antecipado desde que a substância teste apresente um nível de 100% de biodegradação ou quando a curva de biodegradação atingir um platô nítido e não haja mais evolução de CO_2 . Cinco tratamentos são empregados: branco, controle, substância teste, inibição e abiótico. O limite mínimo de 60% de evolução de CO_2 é necessário para classificação de facilmente biodegradável se atingido em 10 dias, contados a partir do dia em que se obtém 10% de CO_2 . Este ensaio foi conduzido para determinar a degradação da substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST, em solução nutritiva mineral, por uma cultura mista de microrganismos provenientes do meio ambiente. O ensaio teve duração de 28 dias, sendo realizado em ambiente com temperatura controlada entre 20-25°C. Os tratamentos constaram do: branco (somente inóculo), padrão biodegradável (benzoato de sódio a 20 mg de carbono por litro e inóculo), substância teste (SUGARPRESS BR16.000 CST a 10 mg de carbono por litro e inóculo), inibição (SUGARPRESS BR16.000 CST, benzoato de sódio e inóculo) e abiótico (SUGARPRESS BR16.000 CST e solução esterilizante). A biodegradação da substância teste foi verificada através da análise da liberação de CO_2 entre os tratamentos utilizados pela captura em $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e determinado por titulação com HCl. A percentagem de CO_2 liberado aos 28 dias de incubação foi de 84,61% do carbono total esperado da substância teste. O controle benzoato de sódio liberou 93,11% e o teste de inibição 43,29%. Os resultados mostraram que a substância SUGARPRESS BR16.000 CST pode ser classificada como facilmente biodegradável.

Summary

The Ready Biodegradability Test 301 B (OECD, 1997) is a respirometric evaluation method used for test substance that should be non-volatile, and evaluates the CO_2 evolution. The test must run no longer than 28 days, and it could be finished before 28 days since the test substance reaches 100% of biodegradation or when the biodegradation curve shows a clear plateau and no more CO_2 is produced. Five treatments are runned: inoculum blank; procedure control; test suspension; toxicity control; abiotic sterile control. The pass level for ready biodegradability is 60% of CO_2 evolution if attained in 10-d window, considered when the degree of biodegradation has reached 10% of CO_2 . This assay was conducted to determine the degradation of SUGARPRESS BR16.000 CST, in a mineral nutrient solution, by a mixture of environmental microorganisms. The incubation period was 28 days in a chamber with controlled temperature ranging from 20 to 25°C. The treatments were: inoculum blank (containing only inoculum); procedure control (sodium benzoate at 20 mg carbon per liter of solution and inoculum); test suspension (SUGARPRESS BR16.000 CST at 10 mg per liter of solution and inoculum); toxicity control (containing sodium benzoate, test substance and inoculum); abiotic (containing test substance and sterilizing agent). The CO_2 evolved from all treatments was captured in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ and determined by HCl titration. The total CO_2 evolved from test substance SUGARPRESS BR16.000 CST was 84.61% of the total carbon by the end of the test. The sodium benzoate control attained 93.11% and the inhibition treatment had 43.29% CO_2 evolved. The obtained results pointed out that the test substance SUGARPRESS BR16.000 CST could be classified as readily biodegradable.

1. INFORMAÇÕES DA SUBSTÂNCIA TESTE

Início do ensaio:	04/04/2006
Término do ensaio:	05/05/2006
Conclusão do relatório:	05/05/2006
Substância teste	SUGARPRESS BR16.000 CST
Recebida em	07/03/2006
Lote	Não informado pelo patrocinador
Código da Bioagri	DOM-1173/06
Número da proposta	12439
Aspecto físico	Líquido viscoso marrom
Composição declarada	Não informada pelo patrocinador
Substância teste enviada por	LAAPSA LUBRIFICANTES E INSUMOS LTDA
Corpo técnico	Márcia Ranzani e Paulo Sartorelli

2. INTRODUÇÃO

O ensaio baseia-se no estudo da metabolização de uma substância por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente. A percentagem de gás carbônico (CO₂) liberado, em relação ao total de CO₂ teórico esperado, informa se a substância teste é biodegradável, num período de tempo.

2.1. Definições

Biodegradabilidade imediata: É a propriedade de uma substância orgânica de ser metabolizada, isto é, oxidada por uma cultura mista de microrganismos oriundos do meio ambiente.

Biodegradação para efeito deste teste: é definida como a percentagem de CO₂ liberado, pela ação microbiana em um determinado tempo (28 dias), em relação ao total de CO₂ teoricamente esperado para a oxidação completa da quantidade de substância ensaiada.

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

3. OBJETIVO

O propósito do teste foi avaliar a biodegradabilidade imediata da substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A substância teste foi avaliada de acordo com o método - "Ready Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on 1992" (OECD, 1997).

4.1. Determinação do teor de carbono da substância teste

A quantidade total de carbono foi determinada por combustão. O teor médio de carbono encontrado foi de 69,29%. Foram transferidos 43,3mg da substância teste para os frascos, contendo 3 litros de solução nutritiva mais uma mistura de microrganismos.

4.2. Inóculo microbiano

Coletou-se, no Rio Piracicaba, uma mistura de microrganismos do esgoto, em alta concentração de material orgânico. Um litro do material coletado foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em solução nutriente para obtenção do inóculo para teste. O número de microrganismos foi determinado pela diluição em placas pelo método de plaqueamento em profundidade. O número de células viáveis, expressos em unidades formadoras de colônias por mL, foi de $1,1 \times 10^6$.

4.3. Procedimentos

Para o teste utilizou-se um sistema de aeração de fluxo contínuo, onde, colocou-se em série frascos com hidróxido de sódio para filtrar o ar de entrada no sistema. Os frascos de 3 L dos tratamentos, em duplicatas, foram acoplados ao sistema de aeração e a cada frasco acoplou-se, em série, frascos com 100 mL de hidróxido de bário - Ba(OH)₂, para captura do CO₂ liberado.

O teste foi conduzido no escuro, a temperatura de 20 a 25°C durante 28 dias.

Foram utilizados os seguintes tratamentos:

- A. Branco - solução mineral (em duplicata)
- B. Solução padrão para biodegradabilidade – benzoato de sódio 20 mg de carbono/Litro (em duplicata).
- C. Substância teste - SUGARPRESS BR16.000 CST na concentração de 10,0 mg de carbono/Litro.
- D. Inibição – benzoato de sódio (20 mg carbono/Litro) e substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST (10,0 mg carbono/Litro).
- E. Abiótico – SUGARPRESS BR16.000 CST na concentração de 10 mg de carbono/Litro e solução esterilizante (solução de cloreto de mercúrio a 5%, 100 mL).

Todos os tratamentos receberam 10 mL do inóculo/ litro de meio, 24 horas antes da adição da substância teste.

A biodegradabilidade da amostra foi analisada pela evolução do CO₂, que foi absorvido pela solução de Ba(OH)₂ durante todo o período do teste. O CO₂ liberado foi determinado por titulação com HCl.

5. RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os valores diários da liberação do CO₂ dos tratamentos benzoato de sódio, da substância teste, solução de inibição e do abiótico estão listados na Tabela 1.

Na Tabela 2, estão listados os valores cumulativos da liberação do CO₂. Na Tabela 3, estão listadas as percentagens de CO₂ liberado de todos os tratamentos.

A Figura 1 mostra a liberação de CO₂, em percentagem, das soluções de benzoato de sódio, da solução da substância teste e da solução de inibição em função do período de incubação.

O teste foi considerado válido, pois a diferença entre os extremos nas duplicatas foi menor do que 20% no momento em que a amostra demonstrou um platô e/ou onde não se observou mais a evolução de CO₂, no final do teste ou após a janela de 10 dias de incubação. O padrão biodegradável apresentou 93,11% de biodegradação, tendo atingido 60% de evolução de CO₂ em 10 dias contados a partir do momento em se observou 10% de evolução de CO₂, e não excedeu o período máximo de 14 dias. A inibição apresentou 43,29% de biodegradação, tendo sido atingido os 25% de liberação de CO₂ em 14 dias (caso contrário a substância teste é considerada inibitória aos microrganismos).

A percentagem de CO₂ liberado da substância teste, aos 28 dias de incubação, foi de 84,61% do carbono total. Para que a substância teste seja considerada facilmente biodegradável, um mínimo de 60% de degradação deve ser alcançado em 10 dias, contados a partir dos 10% de biodegradação, sendo que a janela de 10 dias deve acabar em 28 dias. Esta condição foi observada durante o teste.

De acordo com a metodologia empregada a substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST é facilmente biodegradável com 84,61% de liberação de CO₂ durante o período de 28 dias.

REFERÊNCIA

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Section 3: Degradation and Accumulation; Ready Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on 1992*. Paris:OECD, 1997.

Tabela 1. Quantidade diária de CO₂ liberado (mg) do benzoato de sódio, substância teste, da solução de inibição e do abiótico, durante o período de incubação de 28 dias.

Dias de incubação	Tratamentos					
	Benzoato de Sódio		SUGARPRESS BR16.000 CST		Inibição	Abiótico
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 1
1 ^o	0,495	0,275	2,915	3,465	5,335	0,935
3 ^o	2,365	3,685	2,255	1,815	12,155	0
6 ^o	25,19	25,63	0,44	0,33	1,32	0
8 ^o	37,565	36,905	15,565	15,455	1,815	0
9 ^o	47,08	47,74	28,6	29,15	18,37	1,1
11 ^o	40,92	41,25	4,18	3,41	30,03	0
16 ^o	35,31	34,65	20,13	20,02	31,13	0,33
21 ^o	15,345	15,235	19,525	18,865	34,265	0
23 ^o	0	0	0	0	6,05	0
28 ^o	0	0	0	0	2,365	0

Legenda: CO₂ - 1 e CO₂ - 2 (número de repetições).

Tabela 2. Total de CO₂ liberado (mg) do benzoato de sódio, substância teste, da solução de inibição e abiótico, durante o período de incubação de 28 dias.

Dias de incubação	Tratamentos					
	Benzoato de Sódio		SUGARPRESS BR16.000 CST		Inibição	Abiótico
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 1
1 ^o	0,495	0,275	2,915	3,465	5,335	0,935
3 ^o	2,86	3,96	5,17	5,28	17,49	0,935
6 ^o	28,05	29,59	5,61	5,61	18,81	0,935
8 ^o	65,615	66,495	21,175	21,065	20,625	0,935
9 ^o	112,695	114,235	49,775	50,215	38,995	2,035
11 ^o	153,615	155,485	53,955	53,625	69,025	2,035
16 ^o	188,925	190,135	74,085	73,645	100,155	2,365
21 ^o	204,27	205,37	93,61	92,51	134,42	2,365
23 ^o	204,27	205,37	93,61	92,51	140,47	2,365
28 ^o	204,27	205,37	93,61	92,51	142,835	2,365

Legenda: CO₂ - 1 e CO₂ - 2 (número de repetições).

Tabela 3. Percentagem de CO₂ liberado do benzoato de sódio, substância teste, da solução de inibição e abiótico, durante o período de incubação de 28 dias.

Dias de incubação	Tratamentos					
	Benzoato de Sódio		SUGARPRESS BR16.000 CST		Inibição	Abiótico
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 1
1º	0,2250409	0,125023	2,650482	3,150573	1,616961	0,850155
3º	1,3002364	1,800327	4,700855	4,800873	5,300964	0,850155
6º	12,752319	13,45245	5,100927	5,100927	5,701037	0,850155
8º	29,830424	30,2305	19,2535	19,15348	6,251137	0,850155
9º	51,234315	51,93444	45,25823	45,6583	11,81882	1,850336
11º	69,837698	70,68785	49,05892	48,75887	20,92047	1,850336
16º	85,890616	86,44072	67,36225	66,96217	30,35552	2,150391
21º	92,866885	93,36698	85,11548	84,11529	40,74074	2,150391
23º	92,866885	93,36698	85,11548	84,11529	42,57441	2,150391
28º	92,866885	93,36698	85,11548	84,11529	43,2912	2,150391
Total	93,11		84,61		43,29	

Legenda: CO₂ - 1 e CO₂ - 2 (número de repetições).

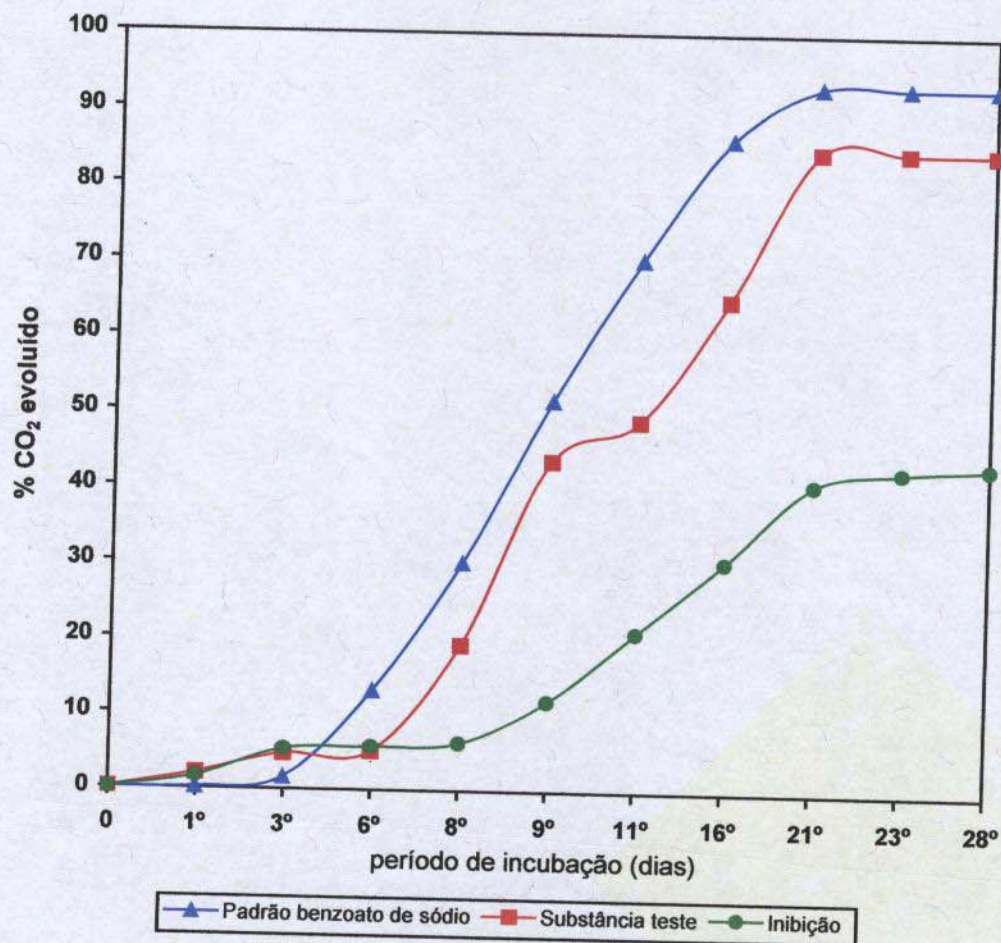


Figura 1. Percentagem de CO₂ liberado na solução de benzoato de sódio, na solução da substância teste SUGARPRESS BR16.000 CST e na solução de inibição em função do período de incubação em dias (médias obtidas da Tabela 3).

Fim do relatório