



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

Titulo do Ensaio

Determinação da Biodegradabilidade Imediata da Substância Teste ECO STAR SOFTEX

Relatório Final

31/Jan/2017

Solicitado por

ECOLAB QUÍMICA LTDA

Av. Alexander Graham Bell – 200, Bloco B1 – Condomínio Techno Park
Campinas/ SP – CEP: 13069-310

Executado por

BIOAGRI Laboratórios Ltda.

Rod. SP 127, km 24

Telefone: +55 (19) 3429-7700 – Fax: +55 (19) 3429-7713
Caixa Postal 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba/SP – Brasil
www.merieuxnutrisciences.com.br



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

Declaração de condução do ensaio

O ensaio descrito neste relatório foi executado sob nossa supervisão, de acordo com a metodologia "Ready Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on 1992" (OECD, 1997).

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

O Plano de amostragem não foi realizado pela BIOAGRI.

Os resultados e observações apresentados neste relatório final são uma descrição precisa dos dados brutos gerados durante a condução do ensaio.

Os documentos e registros gerados neste ensaio serão mantidos nos arquivos da BIOAGRI Laboratórios Ltda por um período de 6 anos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Gumiere".

Marina Gumiere, Dra
Responsável Técnica
Fone: (19) 3486-0999

31 17 m 2017
dd mmm aaaa



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

Dados da amostra:

Substância teste: ECO STAR SOFTEX

Aspecto Físico: Líquido azul

Lote: 3166395

Data de Fabricação: 05/04/2016

Quantidade recebida de amostra: 430 g

Data de Validade: 05/04/2018

Composição declarada (patrocinador) (cópia digitalizada do documento original): Vide anexo II.

Código Bioagri: SAN-1337/16

Proposta: 06270/16

Data de recebimento: 09/11/2016

Data do início do teste: 09/01/2017

Data do término do teste: 31/01/2017

Conclusão do Relatório: 31/01/2017

2ª via emitida em: 31/01/2017

Metodologias utilizadas: 301 B - OECD (1997)

1. OBJETIVO

Avaliar a biodegradabilidade imediata de substâncias orgânicas hidrossolúveis ou pouco hidrossolúveis ou adsorventes, porém não-voláteis, sob as condições do teste, com metodologia analítica que permita a determinação da biodegradação total.

2. 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 ensaio.

Substância teste 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.

3. PROCEDIMENTOS

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

3.1. Inóculo

Emprega-se, da estação de esgoto doméstico de Piracicaba, uma mistura de microrganismos do esgoto, em alta concentração de material orgânico. Dois litros do material coletado são centrifugados, filtrados, e o sobrenadante é descartado. O precipitado é suspenso em solução plaqueamento em profundidade.

3.2. Descrição do ensaio

São transferidas quantidades da substância teste correspondente a 10,0 mg de carbono/Litro, em frascos contendo 3 litros de solução nutritiva mais uma mistura de microrganismos. Para o teste utiliza-se um sistema de aeração de fluxo contínuo, onde, colocam-se em série frascos com hidróxido de sódio para filtrar o ar de entrada no sistema. Os frascos de 3 L dos tratamentos são acoplados ao sistema de aeração e a cada frasco acopla-se, em série, frascos com 100 mL de hidróxido de bário - Ba(OH)₂, para captura do CO₂ liberado. O teste é conduzido no escuro, a temperatura de 20 a 25°C, podendo durar até 28 dias.

São utilizados os seguintes tratamentos:



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

- A. Branco - solução mineral (em duplicate)
- B. Solução padrão para biodegradabilidade – benzoato de sódio 20 mg de carbono/Litro.
- C. Substância teste - na concentração de 10,0 mg de carbono/Litro (em duplícata).
- D. Inibição – benzoato de sódio (20 mg carbono/Litro) e substância teste (10,0 mg carbono/Litro).

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

A biodegradabilidade da amostra é avaliada pela evolução do CO₂, que é calculado da seguinte forma:

Determina-se a diferença de volumes de HCl gastos entre as titulações dos brancos e as dos ensaios com as substâncias:

- 1,0 mg de carbono orgânico oxidado produz 3,666 mg de CO₂ (o que corresponde a 0,0833 mmoles de CO₂);
- 1,0 mmoles desse gás reage com 2,0 mmoles de OH- do Ba(OH)₂ usado para a sua absorção, 0,0833 mmoles de CO₂ consumirão 0,1666 mmoles de HCl;
- Na titulação, é utilizado HCl 0,050 N, cada 1,00ml gasto na titulação, corresponderá a 1,10 mg de CO₂ absorvido.

A quantidade de CO₂ é calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{mgCO}_2 = \text{ml de HCl (diferença)} \times 1,10 \text{ mg.ml}^{-1}$$

Os resultados (mg de CO₂) obtidos em cada titulação são somados aos das titulações subsequentes, de modo a fazer-se a totalização do CO₂ desprendido ao longo do tempo de incubação.

A partir da quantidade de CO₂ desprendida para cada substância ensaiada, calcular a porcentagem de degradação, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{CO}_2-t = (\text{Cd}/\text{Ct}) \times 100$$

Onde:

%CO₂-t = porcentagem de degradação da substância ensaiada, num determinado tempo de incubação (dias).

C_d = quantidade totalizada de CO₂ (mg) desprendido num determinado tempo de incubação (dias), para a substância ensaiada.

C_t = quantidade de CO₂ (mg) teoricamente esperada para a oxidação completa da quantidade de substância ensaiada.

3.3. Validação do Ensaio

O teste é considerado válido, se a diferença entre os extremos nas duplícates for menor do que 20% no momento em que a amostra demonstra um platô e/ou onde não se observa mais a evolução de CO₂, no final do teste ou após a janela de 10 dias de incubação. O padrão biodegradável apresenta biodegradação, quando atinge 60% de evolução de CO₂ em 10 dias contados a partir do momento em que se observa 10% de evolução de CO₂, e não deve exceder o período máximo de 14 dias. A inibição deve apresentar biodegradação, atingindo os 25% de liberação de CO₂ em 14 dias, demonstrando que a substância teste não é inibitória aos microrganismos.

4. RESULTADOS

O ensaio foi conduzido tendo como condições:

- Teor de Carbono encontrado na amostra: 3,91%.
- Número de células viáveis obtidas no inoculo: 6,2 x 10⁸ UFC/mL.
- Quantidade de amostra utilizada para o ensaio: 0,767 g / 3 L



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

O ensaio foi considerado validado porque a diferença entre os extremos nas duplicatas foi menor do que 20%, o padrão biodegradável apresentou biodegradação de 60% de evolução de CO₂ em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO₂, e não excedeu o período máximo de 14 dias e, não houve inibição dos microrganismos empregados uma vez que o tratamento inibição atingiu 25% de liberação de CO₂ em 14 dias.

Os valores obtidos no ensaio encontram-se no Anexo I, onde estão:

1. Os valores diários da liberação do CO₂ dos tratamentos benzoato de sódio, da substância teste e solução de inibição estão apresentados na Tabela 1.
2. Os valores cumulativos da liberação do CO₂, apresentados na Tabela 2.
3. Valores das percentagens de CO₂ liberadas de todos os tratamentos, apresentados na Tabela 3.
4. Figura 1 demonstra 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.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e nas condições do ensaio a substância teste apresentou biodegradação de 100%, medido em CO₂ liberado durante o período de 18 dias e foi considerada como facilmente biodegradável.



Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

Tabela 1. Quantidade diária de CO₂ liberado (mg) do benzoato de sódio, substância teste e da solução de inibição, durante o período de incubação de 18 dias.

| Dias de incubação | Tratamentos | | | | Inibição |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | Benzoato de Sódio | | ECO STAR SOFTEX | | |
| | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | |
| 1º | 16,28 | 18,26 | 10,67 | 14,63 | 21,78 |
| 3º | 17,99 | 20,30 | 7,43 | 11,39 | 18,10 |
| 6º | 16,34 | 18,76 | 13,15 | 10,84 | 26,35 |
| 8º | 23,38 | 22,83 | 19,09 | 15,46 | 23,49 |
| 10º | 1,32 | 6,71 | 2,31 | 7,81 | 4,84 |
| 13º | 24,37 | 26,02 | 25,47 | 27,01 | 32,62 |
| 18º | 28,66 | 31,08 | 29,76 | 31,08 | 35,92 |

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

Tabela 2. Total de CO₂ liberado (mg) do benzoato de sódio, substância teste e da solução de inibição, durante o período de incubação de 18 dias.

| Dias de incubação | Tratamentos | | | | Inibição |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | Benzoato de Sódio | | ECO STAR SOFTEX | | |
| | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | |
| 1º | 16,28 | 18,26 | 10,67 | 14,63 | 21,78 |
| 3º | 34,27 | 38,56 | 18,10 | 26,02 | 39,88 |
| 6º | 50,60 | 57,31 | 31,24 | 36,85 | 66,22 |
| 8º | 73,98 | 80,14 | 50,33 | 52,31 | 89,71 |
| 10º | 75,30 | 86,85 | 52,64 | 60,12 | 94,55 |
| 13º | 99,66 | 112,86 | 78,10 | 87,12 | 127,16 |
| 18º | 128,32 | 143,94 | 107,86 | 118,20 | 163,08 |

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

Tabela 3. Percentagem de CO₂ liberado do benzoato de sódio, substância teste e da solução de inibição, durante o período de incubação de 18 dias.

| Dias de incubação | Tratamentos | | | | Inibição |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | Benzoato de Sódio | | ECO STAR SOFTEX | | |
| | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | CO ₂ - 1 | CO ₂ - 2 | |
| 1º | 7,40 | 8,30 | 9,70 | 13,30 | 6,60 |
| 3º | 15,58 | 17,53 | 16,45 | 23,65 | 12,09 |
| 6º | 23,00 | 26,05 | 28,41 | 33,51 | 20,07 |
| 8º | 33,63 | 36,43 | 45,76 | 47,56 | 27,19 |
| 10º | 34,23 | 39,48 | 47,86 | 54,66 | 28,66 |
| 13º | 45,31 | 51,31 | 71,01 | 79,21 | 38,54 |
| 18º | 58,34 | 65,44 | 98,07 | 107,47 | 49,43 |
| Total Médio | 61,89 | | 100,00 | | 49,43 |

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

Relatório de Ensaio: RE0052.0034.16

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

Biodegradability: 301 B CO₂ Evolution Test adopted on
1992 (OECD, 1997).

Anexo I

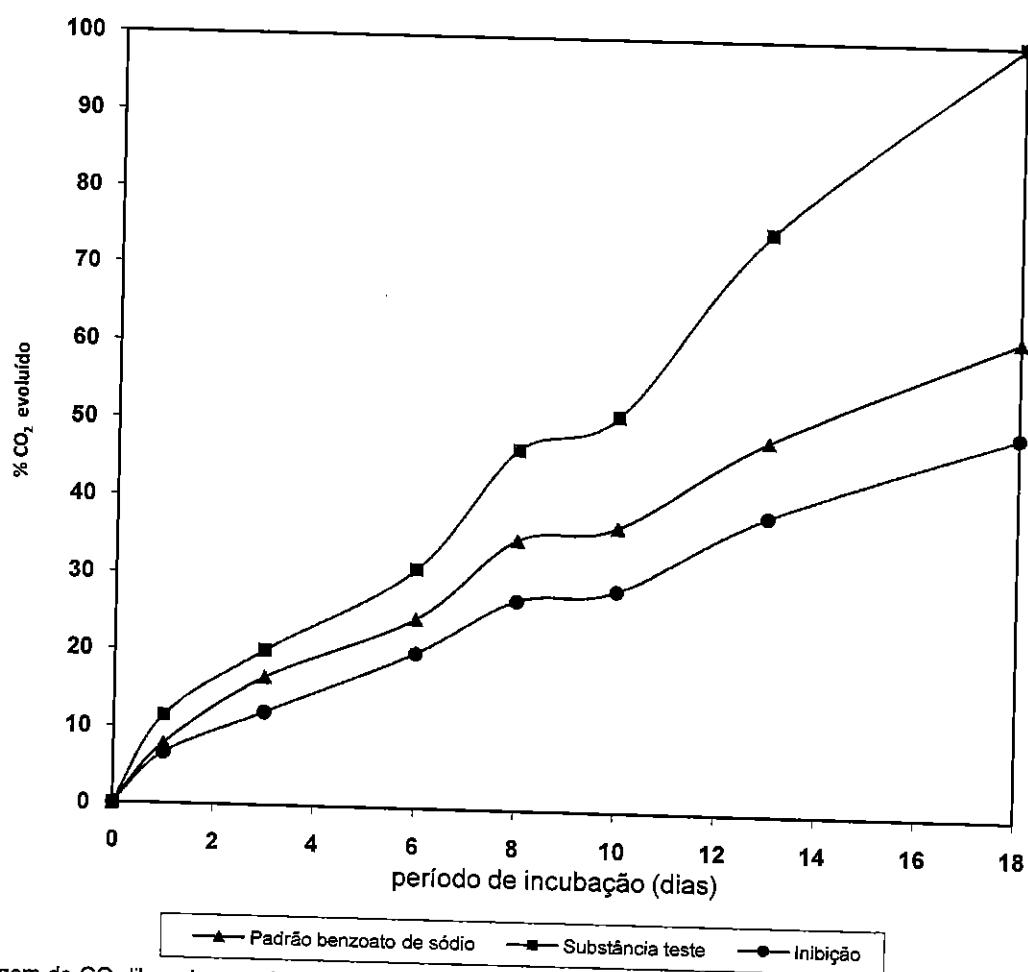


Figura 1. Percentagem de CO₂ liberado na solução de benzoato de sódio, na solução da substância teste ECO STAR SOFTEX e na solução de inibição em função do período de incubação em dias (médias obtidas da Tabela 3).