



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



Título do Ensaio

Determinação da Biodegradabilidade Imediata da Substância Teste ENZYMAX 6, ENZYPLUS

Relatório Final

30/06/2015

Solicitado por

COSMODERMA IND. COM. LTDA
Av. Padre Leo Lunders – 1673 – Pirassununga/SP
CEP: 13634-200
Fone: (19) 3562-6343

Executado por

BIOAGRI Laboratórios Ltda.
Via Vicente Verdi, nº 835 – Código CHQ 464 com a Rodovia SP 308
Bela Vista – Distrito Industrial II / Charqueada / SP
Fone: (19) 3486-0999 - CEP. 13515-000
Charqueada/SP – Brasil
www.bioagri.com.br
E-mail: bioagri@bioagri.com.br



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



Declaração de condução do ensaio e Revisão da Unidade de Garantia da Qualidade

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) e em conformidade com os requisitos da ABNT NBR ISO 17025:2005.

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

Este relatório de ensaio foi revisado pela Unidade de Garantia da Qualidade – UGQ da BIOAGRI Laboratórios Ltda.

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


Carla Valéria Mingati
Responsável Técnica
Fone: (19) 3486-0999

30 / jun / 2015
dd mm aaaa



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15



Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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

Dados da amostra:

Substância teste: ENZYMAX 6, ENZYPLUS

Aspecto Físico: Líquido Amarelo

Lote: 15172201

Data de Fabricação: 04/2015

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

Código Bioagri: SAN-0695/15

Data do início do teste: 26/05/2015

Data do término do teste: 30/06/2015

Conclusão do Relatório: 30/06/2015

Metodologias utilizadas: 301 B - OECD (1997)

Quantidade recebida da amostra: 318 g

Data de Validade: 04/2017

Proposta: 05861/15

Data de recebimento: 27/04/2015

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 nutritiva para obtenção do inóculo para teste. O número de microrganismos é determinado pela diluição em placas pelo método de 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:

- Branco - solução mineral (em duplicata)
- Solução padrão para biodegradabilidade - benzoato de sódio 20 mg de carbono/Litro.
- Substância teste - na concentração de 10,0 mg de carbono/Litro (em duplicata).
- Inibição - benzoato de sódio (20 mg carbono/Litro) e substância teste (10,0 mg carbono/Litro).



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



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 mmole 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 subseqüentes, 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:

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

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 duplicatas 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: 9,66%.
- Numero de células viáveis obtidas no inóculo: $2,3 \times 10^6$.
- Quantidade de amostra utilizada para o ensaio: 0,3105 g /3 L

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.



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



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 28 dias e foi considerada como facilmente biodegradável.



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



Anexo I

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 28 dias.

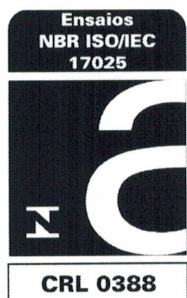
Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		ENZYMAX 6, ENZYPLUS		Inibição
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1
1º	13,70	18,21	2,70	0,00	23,60
3º	11,55	14,08	0,00	0,00	22,66
6º	12,54	21,56	9,46	9,90	41,36
8º	27,39	34,65	15,51	8,91	37,40
10º	35,09	34,43	14,41	9,35	36,96
13º	20,85	26,24	14,91	12,71	29,10
18º	25,52	31,24	21,56	20,68	40,81
23º	25,80	28,77	23,60	24,48	43,07
28º	33,11	24,09	27,17	30,69	38,28

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 28 dias.

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		ENZYMAX 6, ENZYPLUS		Inibição
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1
1º	13,70	18,21	2,70	0,00	23,60
3º	25,25	32,29	2,70	0,00	46,26
6º	37,79	53,85	12,16	9,90	87,62
8º	65,18	88,50	27,67	18,81	125,02
10º	100,27	122,93	42,08	28,16	161,98
13º	121,11	149,16	56,98	40,87	191,07
18º	146,63	180,40	78,54	61,55	231,88
23º	172,43	209,17	102,14	86,02	274,95
28º	205,54	233,26	129,31	116,71	313,23

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



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15



Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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

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

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		ENZYMAX 6, ENZYPLUS		Inibição
	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1	CO ₂ - 2	CO ₂ - 1
1º	6,23	8,28	2,45	0,00	7,15
3º	11,48	14,68	2,45	0,00	14,02
6º	17,18	24,48	11,05	9,00	26,55
8º	29,63	40,23	25,15	17,10	37,89
10º	45,58	55,89	38,26	25,60	49,09
13º	55,06	67,81	51,81	37,16	57,91
18º	66,66	82,01	71,41	55,96	70,28
23º	78,39	95,09	92,87	78,21	83,33
28º	93,44	100	100	100	94,93
Total Médio	99,74		100		94,93

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



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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

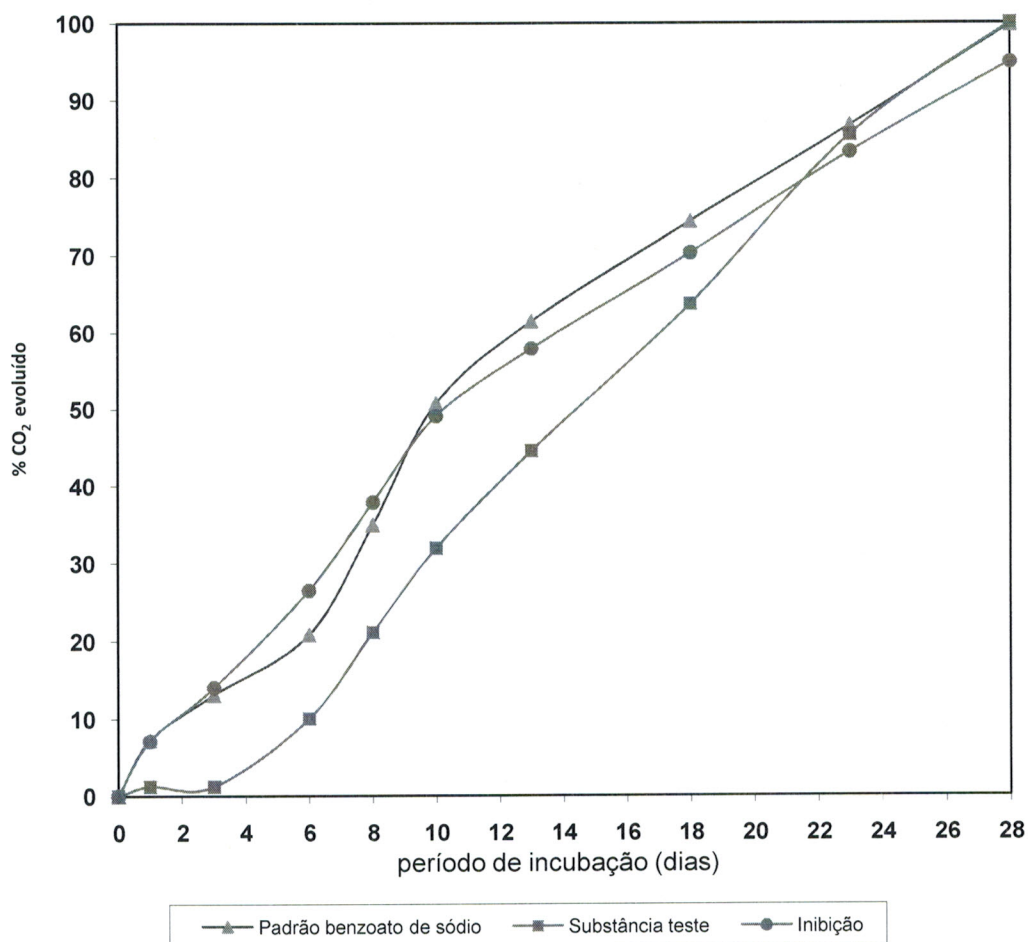


Figura 1. Percentagem de CO₂ liberado na solução de benzoato de sódio, na solução da substância teste ENZYMAX 6, ENZYPLUS e na solução de inibição em função do período de incubação em dias (médias obtidas da Tabela 3).



Relatório de Ensaio: RE0052.0018.15

Avaliação da Biodegradabilidade Imediata.

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



Anexo II

CONFIDENCIAL