

### ***II.3.1 – Avaliação de biodegradabilidade***



**Relatório Final RL0091/2008 – 2.0 BDM**  
10 de Março de 2008

**Título do Estudo**  
Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha  
para o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA**

**Patrocinador**  
PETROLEO BRASILEIRO S/A.  
Av. República do Chile, 65 – 20031-170  
Rio de Janeiro, RJ

**Laboratório executor**  
TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.  
R. Fábria, 59 - 05051-030.  
São Paulo, S.P.  
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

## ÍNDICE

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO .....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	4
INTRODUÇÃO .....	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
1. Dados da substância-teste.....	5
2. Dados dos organismos-teste .....	5
3. Água de diluição.....	6
4. Preparo das soluções.....	6
5. Condições de teste e procedimentos .....	7
6. Tratamento dos resultados .....	7
RESULTADOS .....	8
CONCLUSÃO.....	9
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	9
TABELAS .....	10
FIGURA .....	11
ANEXO .....	12

**DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

O presente estudo com o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA**, requerido pela empresa **PETROLEO BRASILEIRO S/A.**, foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à Rua Fábيا, 59 - São Paulo – SP.

*Maria Fernanda Romanelli*

MARIA FERNANDA ROMANELLI

**Bióloga (MSc)**

**CRBio 35816/01-D**

10/03/08

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a biodegradabilidade do produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA (0091/2008)** em água marinha. A concentração 2,00mg/L do produto apresentou biodegradação em meio marinho após o período de 28 dias de incubação, sob temperatura de  $24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e no escuro.

### ABSTRACT

This study was carried out to determine the biodegradability of the product **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA (0091/2008)** in seawater. The concentration 2.00mg/L of the sample was biodegradable in seawater after the period of 28 days of incubation, under temperature of  $24.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  in the dark.

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradabilidade do produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA** em água marinha. O método consiste na diluição de uma concentração pré-estabelecida do produto, seguida de exposição a microrganismos presentes em água marinha natural filtrada. A solução é mantida em frascos de DBO fechados, no escuro, sob temperatura constante, e a degradação é acompanhada por análises da concentração de oxigênio dissolvido durante um período de 28 dias. Tal procedimento permite determinar a porcentagem de biodegradação do produto após 28 dias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada segue a norma OECD 306 - Biodegradability in Seawater (OECD, 1992). Conforme estabelecido nesta norma, a avaliação deve ser feita a partir de uma solução de 2,00mg/L do produto, podendo ser de até 10,00mg/L em casos especiais.

### 1. Dados da substância-teste

Nome comercial: **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA.**

Protocolo nº: 0091/2007.

Data de entrada: 08/01/2008.

Acondicionamento: frasco plástico, sob refrigeração.

Estado Físico: Líquido.

Demanda química de oxigênio (DQO): 489000mg/kg.

### 2. Dados dos organismos-teste

Foram utilizadas várias espécies de microrganismos naturalmente presentes na água marinha, não identificadas individualmente. No início do teste foram realizadas

análises microbiológicas da água, através do método de contagem padrão de bactérias heterotróficas.

### 3. Água de diluição

Para o preparo das soluções-teste foi utilizada água marinha natural filtrada, enriquecida com nutrientes minerais.

A água marinha foi coletada em 23/01/2008, em Ilhabela (SP). A qualidade desta água foi caracterizada através das seguintes análises:

- . Salinidade: 36‰
- . Demanda química de oxigênio (DQO): 770mg/L
- . Nitrato: 0,3mg/L
- . Amônia: 0,001mg/L
- . Fósforo total: 11,50mg/L
- . Contagem padrão de bactérias: >5600UFC/mL

Após a coleta, a água foi mantida no laboratório por 8 dias, sob aeração suave, na mesma temperatura de teste e no escuro. Antes de ser utilizada no teste, foi filtrada em papel de filtro para remover partículas grosseiras e organismos planctônicos. Em seguida, foram adicionados nutrientes (nitrogênio e fósforo) para garantir a sobrevivência dos microrganismos.

### 4. Preparo das soluções

Foi preparada uma solução de 2,00mg/L do produto com água de diluição em volume suficiente para preencher oito frascos de incubação (dois frascos para cada dia de leitura). Para avaliar a atividade dos microrganismos presentes na água foi preparada uma solução 2,00mg/L com a substância de referência, benzoato de sódio. Foram, também, preparados um controle somente com água marinha enriquecida (controle branco) e outro idêntico à solução do produto, porém sem atividade microbiológica devido à adição de cloreto de mercúrio (controle físico-químico). A ocorrência de efeitos inibitórios devido à toxicidade do produto foi avaliada através do

preparo de uma solução de 2,00mg/L da substância de referência com 2,00mg/L do produto (controle de toxicidade).

Portanto, para o presente teste, foram preparadas as seguintes soluções:

- A. Amostra (2,00mg/L): 6,00mg do produto + 3000mL de água de diluição.
- B. Substância de referência (2,00mg/L): 6,00mg da substância de referência + 3000mL de água de diluição.
- C. Controle branco: somente água de diluição.
- D. Controle físico-químico: 6,00mg do produto + cloreto de mercúrio + 3000mL de água de diluição.
- E. Controle de toxicidade: 6,00mg do produto + 6,00mg da substância de referência + 3000mL de água de diluição.

## 5. Condições de teste e procedimentos

O teste teve início em 01/02/2008 e término em 29/02/2008. No início do teste, as soluções foram transferidas para os frascos de incubação, mantidos em ambiente escuro, com temperatura de  $24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 28 dias.

A concentração de oxigênio dissolvido de cada tratamento foi analisada em frascos duplicados, no início do teste e após 5, 15 e 28 dias de teste. No início do teste foram feitas análises de contagem padrão de bactérias heterotróficas das soluções de teste e análise de DQO da amostra pura.

## 6. Tratamento dos resultados

Para cada dia de análise foi calculado o consumo líquido de oxigênio como a diferença no consumo de oxigênio do controle branco e da solução do produto, nas condições de teste, e o resultado foi expresso em mg O<sub>2</sub>/mg de amostra. A biodegradação foi calculada como a razão entre este consumo líquido e a DQO do produto, expressa em porcentagem.

Para verificar se o produto foi tóxico para os microrganismos durante o teste, foi comparado o consumo líquido de oxigênio do controle de toxicidade com a soma dos consumos das soluções do produto e da substância de referência.

## RESULTADOS

Os resultados do teste com o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA** estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e o consumo real de oxigênio de todas as soluções preparadas está representado graficamente na Figura 1.

Foi verificado que houve consumo de oxigênio no controle branco, porém a porcentagem foi inferior ao limite recomendado de 30% de consumo para aprovação da água de diluição (OECD, 1992).

A porcentagem de biodegradabilidade obtida para a substância de referência foi de 72%. Esse resultado está acima do limite de 60% estabelecido pela norma OECD (1992), atendendo ao critério de validação do teste.

A presença de bactérias heterotróficas no início do teste (Tabela 1) e a concentração de oxigênio dissolvido nos frascos-teste indicaram que os compostos orgânicos presentes nas soluções poderiam ser degradados por via aeróbica. A exceção prevista foi o controle físico-químico, no qual não havia microrganismos durante o teste.

Os resultados obtidos indicaram que o produto apresentou certa toxicidade aos microrganismos, uma vez que o consumo de oxigênio do controle de toxicidade (contendo amostra e substância de referência) foi cerca de três vezes inferior à soma do consumo separado de cada uma destas soluções (Tabela 2). Apesar da toxicidade observada, o grau de toxicidade e a capacidade de adaptação dos microrganismos à amostra permitiram que, ao final de 28 dias de teste, houvesse consumo significativo de oxigênio, permitindo, assim, estimar a biodegradabilidade da amostra.

Além disso, o consumo observado no controle físico-químico indicou que não houve degradação abiótica na solução do produto. A curva de consumo de oxigênio

da substância de referência indicou que os microrganismos presentes na água marinha estiveram aptos a degradar a matéria orgânica presente nas diversas soluções preparadas (Figura 1).

Ao final do período de 28 dias de incubação, o consumo de oxigênio na solução da amostra foi superior ao do controle branco, indicando que a amostra sofreu degradação microbiana. O cálculo de porcentagem de biodegradabilidade resultou em um valor elevado, o que indica que uma quantidade adicional de matéria orgânica, presente na água marinha natural utilizada no teste e, portanto, não proveniente do produto, deveria estar disponível para os microrganismos, permitindo sua multiplicação e geração de nova biomassa, que por sua vez, fornece mais matéria orgânica para ser degradada. Com isso, embora matematicamente a porcentagem final da biodegradação tenha sido de 393% (ANEXO), o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA** foi considerado biodegradável.

### CONCLUSÃO

A concentração 2,00mg/L do produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA** apresentou biodegradação após 28 dias de exposição em meio marinho.

### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Biodegradability in Seawater. 306, 27 p., 1992.

**TABELAS**

**Tabela 1** – Contagem padrão inicial de bactérias das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA**.

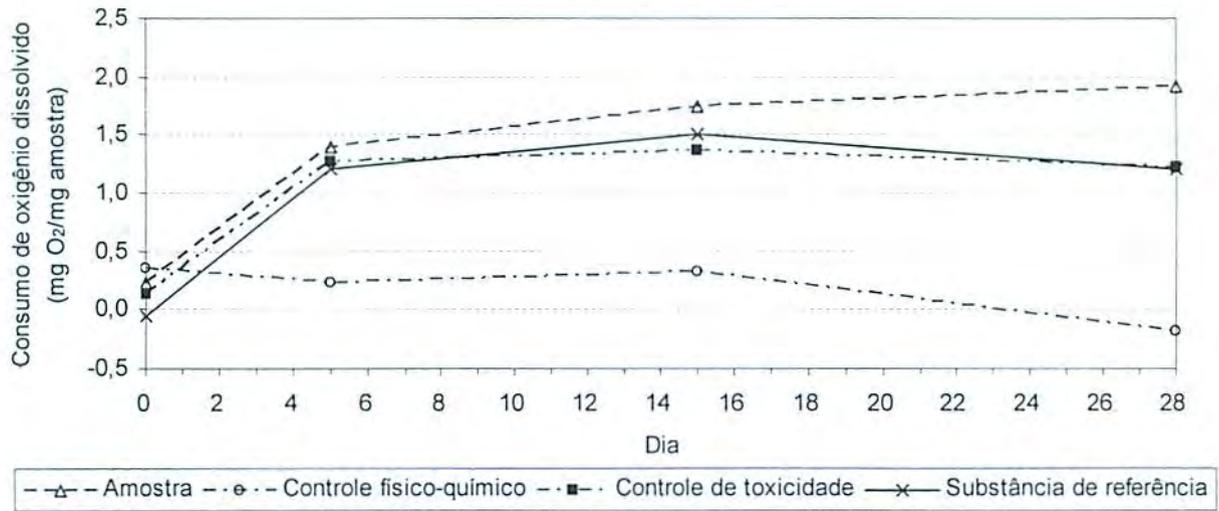
Solução	Contagem padrão de bactérias (UFC/mL)
Controle branco	> 5600
Amostra	> 5600
Controle físico-químico	0
Controle de toxicidade	>5600
Substância de referência	> 5600

UFC = unidades formadoras de colônias.

**Tabela 2** – Consumo líquido de oxigênio após 28 dias das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA**.

Solução	Consumo líquido de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /mg de amostra)		
	Dia 5	Dia 15	Dia 28
Amostra	1,40	1,74	1,92
Controle físico-químico	0,23	0,32	-0,19
Controle de toxicidade	1,27	1,36	1,22
Substância de referência	1,21	1,50	1,21

**FIGURA**



**Figura 1** - Consumo líquido de oxigênio dissolvido das soluções preparadas para o Teste de Biodegradabilidade em Água Marinha para o produto **SOLUÇÃO DE N-PARAFINA E ISOPARAFINA**.

**ANEXO**

**Ficha de Dados**

1. **Laboratório:** TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.
2. **Data de início do teste:** 01/02/2008.
3. **Substância-teste**
  - Nome:** Solução de N-Parafina e Isoparafina.
  - Código TECAM:** 0091/2008 – 2.0
  - Concentração na solução estoque:** -
  - Concentração inicial no meio sintético:** 2,0mg/L.
  - DQO:** 489000mg O<sub>2</sub>/mg substância-teste.
4. **Água Marinha**
  - Local de coleta:** Ilhabela – SP.
  - Data da coleta:** 23/01/2008.
  - Profundidade da coleta:** Superficial.
  - Características da água no momento da coleta:** Límpida.
  - Salinidade:** 36‰.
  - Temperatura:** -
  - DQO “x” horas após a coleta:** -
  - Pré-tratamento:** envelhecimento por 8 dias (sob aeração suave, a 25°C e no escuro); filtragem e adição de nutrientes (nitrogênio e fósforo).
  - Contagem Padrão de Bactérias (PCA)**
    - Amostra original:** -
    - No início do teste:** >5600 UFC/mL
  - Outras Características:** Nitrato: 0,3mg/L
    - Amônia: 0,001mg/L
    - Fósforo total: 11,50mg/L
5. **Meio de Teste**
  - Temperatura após a aeração:** 25°C.
  - Concentração de O<sub>2</sub> após a aeração e antes do início do teste:** 6,00mg O<sub>2</sub>/L.

RL0091/2008 – 2.0 BDM

## 6. Determinação do O<sub>2</sub>

	Frasco n <sup>o</sup>		mg O <sub>2</sub> /L após n dias			
			0	5	15	28
Substância-teste (2,0mg/L)	1	a <sub>1</sub>	5,97	3,59	2,72	1,63
	2	a <sub>2</sub>	5,71	3,36	2,56	1,52
	Média	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$	<b>5,84</b>	<b>3,48</b>	<b>2,64</b>	<b>1,58</b>
Controle Branco	1	c <sub>1</sub>	5,31	5,87	5,75	5,15
	2	c <sub>2</sub>	5,48	5,80	5,58	4,80
	Média	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$	<b>5,40</b>	<b>5,84</b>	<b>5,67</b>	<b>4,98</b>

## 7. Consumo de O<sub>2</sub>: % Biodegradação

		Consumo de O <sub>2</sub> (mg/L) após n dias		
		5	15	28
Substância-teste (2,0mg/L)	$(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$	2,81	3,47	3,85
	$\%D = \frac{(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})}{2,0mg / L \times DQO} \times 100$	287	355	393

m<sub>t0</sub> = média do consumo da substância-teste no dia 0.

m<sub>tx</sub> = média do consumo da substância-teste no dia x.

m<sub>b0</sub> = média do consumo do controle branco no dia 0.

m<sub>bx</sub> = média do consumo do controle branco no dia x.