

## **TÍTULO DO ESTUDO**

Sistema NOVAPLUS: Determinação da  
Biodegradabilidade em Água Salgada  
Usando o Método de Teste em Garrafa Fechada

## **REQUISITO DE DADOS**

Diretriz 306 da OECD

## **AUTOR**

Philip Sarff

## **DATA DO INÍCIO DO ESTUDO**

24 de janeiro de 2008

## **DATA DO TÉRMINO DO ESTUDO**

03 de março de 2008

## **PATROCINADOR**

M-I SWACO  
5950 North Course Dr.  
Houston, Texas 77072

## **LABORATÓRIO EXECUTANTE**

ABC Laboratories, Inc.  
7200 E. ABC Lane  
Columbia, Missouri 65202

## **IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO**

ABC Study No. 63454

## **DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO**

Esta Declaração de Conformidade é para ABC Study Nº. 63454 intitulado, “Sistema NOVAPLUS: Determinação da Biodegradabilidade em Água Salgada Usando o Método de Teste em Garrafa Fechada”, para M-I SWACO, Houston, Texas.

O Diretor do Estudo para o teste acima mencionado confirma que, com as seguintes exceções, o estudo foi realizado de conformidade com os Princípios de Boas Práticas de Laboratório da Organização para Colaboração e Desenvolvimento Econômico (OECD) (conforme revisadas em 1997), ENV/MC/CHEM(98)17, OECD, Paris 1998.

O teste e as substâncias de referência não foram caracterizadas sob as práticas GLP acima citadas.

Estas exceções não afetaram adversamente a integridade do estudo ou a interpretação dos resultados do estudo.

Todos os dados originais não processados, incluindo o protocolo original, foram submetidos ao Patrocinador juntamente com o relatório final. Uma cópia do relatório final, do protocolo e de todos os dados não processados do estudo, bem como todos os registros originais das instalações, estão arquivados nos Laboratórios ABC.

---

Philip Sarff  
Diretor do Estudo  
ABC Laboratories, Inc.

---

Data

**DECLARAÇÃO DE GARANTIA DE QUALIDADE**

a Unidade de Garantia de Qualidade da ABC Laboratories revisou o Estudo ABC No. 63454 intitulado, “Sistema NOVAPLUS: Determinação da Biodegradabilidade em Água Salgada Usando o Método de Teste em Garrafa Fechada,” para M-I SWACO, Houston, Texas. As seguintes auditorias/ inspeções foram realizadas neste estudo.

<b>Data da Inspeção com Base no Estudo</b>	<b>Fase Inspeccionada</b>	<b>Data Relatada ao Diretor do Estudo</b>	<b>Data Relatada à Administração</b>
30 de janeiro de 2008	Procedimento: Pesagem da Substância do Teste	31 de janeiro de 2008	1º de fevereiro de 2008
27 de fevereiro de 2008	Rascunho do Relatório e Dados Não Processados/ Relatório Final	27 de fevereiro de 2008	03 de março de 2008

Estas auditorias indicam que o relatório reflete corretamente o estudo conforme realizado por ABC Laboratories, Inc.

---

Garantia de Qualidade  
ABC Laboratories, Inc.

---

Data

**PESSOAL DO ESTUDO**

**Diretor do Estudo**

Philip Sarff, Químico Sênior

**Equipe Técnica**

Brett Clark, Químico Auxiliar  
Seth Lafferty, Técnico II

**PÁGINA DAS ASSINATURAS**

Submetido por: ABC Laboratories, Inc.  
7200 E. ABC Lane  
Columbia, Missouri 65202

Preparado por:

---

Philip Sarff  
Químico Sênior/ Diretor do Estudo

Data

Aprovado por:

---

Jon E. Rhodes  
Diretor, ABC Chemical Services

Data

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
PÁGINA DO TÍTULO.....	1
DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO .....	2
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DE QUALIDADE.....	3
PESSOAL DO ESTUDO.....	4
PÁGINA DAS ASSINATURAS .....	5
INDICE.....	5
RESUMO DO ESTUDO .....	6
1.0 INTRODUÇÃO .....	9
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS .....	9
2.1 Materiais .....	9
2.1.1 Substancia de Teste .....	9
2.1.2 Substancia de Referencia .....	9
2.1.3 Água Reagente .....	10
2.1.4 Teste Inóculo.....	9
2.1.5 Meio doTeste .....	10
2.1.6 Recipientes do Teste .....	10
2.2 Métodos.....	10
2.2.1 Preparo das Soluções Estoque da Substancia em Referencia .....	11
2.2.2 Determinação da Demanda Quimica de Oxigenio.....	11
2.2.3 Preparo das Soluções de Teste a Granel .....	12
2.2.4 Preparo e Incubação das Garrafas de DBO .....	12
2.2.5 Medição do Oxigenio Dissolvido e do pH.....	12
2.2.6 Avaliação de Micróbios .....	13
2.3 Cálculos.....	13
2.3.1 Calculo da Demanda Teórica de Oxigenio (ThOD) .....	13
2.3.2 Calculo da Demanda Quimica de Oxigenio (DQO) .....	13
2.3.3 Calculo da Demanda de Biológica de Oxigenio (DBO) .....	14
2.3.4 Calculo da Porcentagem de Degradação.....	14
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
3.1 Água de Teste.....	14
3.2 Ingredientes do Meio do Teste.....	14
3.3 Demanda Quimica de Oxigenio da Substancia de Teste .....	15
3.4 Respiração Endógena de Oxigenio no Tratamento de Controle .....	15
3.5 Biodegradação da Substancia de Referencia.....	15
3.6 Biodegradação da Substancia de Teste .....	15
3.7 Avaliação de Microbios .....	17
3.8 Temperatura .....	17
3.9 Medições de pH .....	18

4.0	CONCLUSÕES .....	16
5.0	REFERENCIAS.....	16
Table 1	Ingredientes do Meio de Sais Mineirais.....	17
Table 2	Determinação da Demanda de Oxigenio Quimico .....	18
Table 3	Respiração Endógena de Oxigenio no Tratamento de Controle .....	19
Table 4	Biodegradação das Substancias de Referencia e Teste .....	20
Table 5	Resultados da Contagem da Placa Bacteriana .....	21
Table 6	Medidas do pH .....	22
Figure 1.	Levantamento do Oxigênio vs. Tempo para os Tratamentos para o Controle, Substância do Teste e Referencia do Teste.....	23
Figure 2.	Porcentagem de Degradação vs Tempo para o Teste e Substancias de Referencia .....	24
APPENDIX A – PROTOCOLO .....		25
APPENDIX B – CERTIFICADOS DE ANÁLISE .....		42

## RESUMO DO ESTUDO

O objetivo primário deste estudo foi avaliar a biodegradabilidade da substância do teste, Sistema NOVAPLUS (Fluido Novaplus SBM com Novawet II) em água salgada natural numa concentração inicial de teste de 5 mg/L, de acordo com a diretriz 306 da OECD. A substância teste foi exposta ao inóculo da água salgada sob condições aeróbicas durante 18 dias a aproximadamente 20°C. A água salgada foi obtida do Gulf Specimen Marine Laboratory, Panacea, Florida. Um tratamento de substância de referencia contendo benzoato de sódio prontamente degradável numa concentração nominal de 5 mg/L foi simultaneamente testada para verificar a viabilidade do inóculo microbial. Um tratamento de controle sem substância de teste ou referencia foi testado simultaneamente para medir o levantamento de oxigênio causado pela respiração endógena microbial. Duas garrafas BOD de cada tratamento de 10 garrafas foram removidas aleatoriamente após 0, 7, 14 e 18 dias de incubação a 20°C e foram medidas para concentração de oxigênio dissolvido e para pH nos Dias 0 a 18 (2 garrafas para cada tratamento não foram usadas).

A demanda química de oxigênio (DQO) foi medida pelo método UV/VIS. Cinco réplicas das amostras da substância de teste foram preparadas para a determinação de UV/VIS pesando-se 1,5752, 1,0852, 1,0383, 1,2971, e 0,8264 mg da substância do teste, respectivamente, em lâminas de vidro e depositando as lâminas de vidro em frascos Bioscience accu-TEST™ Standard Range DQO com 2,5 ml de água reagente. A média da DQO das cinco réplicas foi 1,45 mg O<sub>2</sub>/mg.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi calculada a partir da concentração do oxigênio dissolvido consumido no teste ou em garrafas (mg O<sub>2</sub>/L) da substância de referencia, corrigidas para tal no controle, expressa como fração da concentração nominal do teste. A DBO para a substância do teste atingiu o máximo de 1,21 mg O<sub>2</sub>/mg da substância do teste no Dia 7. A DBO pra a substância de referencia atingiu o máximo de 1,52 mg O<sub>2</sub>/mg da substância de referencia no dia 7.

A porcentagem de degradação foi calculada expressando-se a DBO como uma porcentagem da demanda teórica de oxigênio (ThOD) ou demanda química de oxigênio (DQO). A DQO para a substância do teste foi determinada como sendo 1,45 mg O<sub>2</sub>/mg. A porcentagem de degradação do tratamento da substância do teste nos Dias 7, 14, e 18 foi 83,0, 79,6, e 69,8%, respectivamente. O teste terminou no Dia 18 devido a >60% de biodegradação da substância do teste no Dia 7 e permanecendo acima deste nível nos Dias 14 e 18. Como a biodegradação foi maior do que 60%, os resultados dos testes indicam que os Sistema NOVAPLUS tem o potencial para biodegradação num ambiente marítimo de acordo com a Diretriz 306 da OECD. A ThOD para a substância de referencia foi de 1,67 mg O<sub>2</sub>/mg. A porcentagem de degradação para a substância de referencia alcançou 91,1% no Dia 7, verificando-se que o inóculo da água salgada foi viável e ativo.

As análises da contagem da placa bacteriana indicaram que a substância de teste não era tóxica ao inóculo da água salgada na concentração do teste (5 mg/L).



## 1.0 INTRODUÇÃO

A finalidade deste estudo foi avaliar a biodegradabilidade aeróbica do Sistema NOVAPLUS (Fluido Novapplus SBM com Novawet II) em água salgada natural contendo sais minerais. O estudo foi conduzido como descrito no Protocolo do Estudo ABC intitulado “Sistema NOVAPLUS (Fluido Novapplus SBM com Novawet II): Determinação da Biodegradabilidade em Água Salgada Usando o Método de Teste em Garrafa Fechada,” ([Apêndice A](#)), que seguiu o Método 306, Diretriz para o Teste de Produtos Químicos, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) ([1](#)).

## 2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Substancia de Teste

A ABC Laboratories recebeu uma amostra da substancia do teste, Sistema NOVAPLUS, da M-ISWACO em 18 de janeiro de 2008. A substancia de teste foi guardada em temperatura ambiente. As seguintes informações são pertinentes à substancia do teste.

Nome da substância testada: NOVAPLUS System

Nome em português: Fluido Novapplus SBM com Novawet II

Número CAS: Não Aplicável (mistura)

Número do lote: Não Informado

Data de Validade: Não Informada

Aspecto: Líquido cinza a marrom

Pureza: Testada como 100%

Composição:

Produto	Concentração
NOVAPLUS B	167,13 lbs/bbl
Calcium Chloride	33,6 lbs/bbl
HYDRATED LIME	6,0 lbs/bbl
NOVAMUL	6,0 lbs/bbl
NOVAWET II	2,0 lbs/bbl
VG SUPREME	1,5 lbs/bbl
M-I BR CLAYPLUS	5,0 lbs/bbl
HRP	0,5 lbs/bbl
WATER	87,36 lbs/bbl
ECOTROL RD	1,0 lbs/bbl
Calcium Carbonate 2-44	15,0 lbs/bbl
BARITE Note:	73,9 lbs/bbl

lbs/bbl = libras por barril

### 2.1.2 Substancia de Referencia

Uma amostra da substancia de referencia, benzoato de sódio, foi recebida da Fisher Scientific em 5 de abril de 2005. A substancia de referencia foi guardada em temperatura ambiente. As seguintes informações são pertinentes à substancia de referencia em 05 de abril de 2005.

Número CAS:	532-32-1
Fórmula Molecular:	$C_7H_5O_2Na$
Peso Molecular:	144,11 g/mol
Número do Lote:	041447
Pureza Química:	100,4%
Data de Vencimento:	Não fornecida
Aparência:	Pó Branco
Solubilidade em Água:	solúvel

### 2.1.3 Água Reagente

A água reagente foi purificada, deionizada e filtrada usando um Sistema de Purificação de Água Millipore Milli-Q ou uma unidade Labconco Water Pro PS.

### 2.1.4 Teste Inóculo

O inóculo microbial usado neste teste foi água salgada coletada pelo Gulf Specimen Marine Laboratory in Panacea, Florida, em 23 de janeiro de 2008. A Gulf Speciment forneceu aproximadamente 20 L de água salgada de Dickerson Bay e registrou a temperatura antes do embarque a 12°C. Um registrador de dados foi incluído no pacote com a água salgada para continuamente monitorar a temperatura durante o embarque. A água salgada foi transferida para um vasilhame de vidro e mexida e aereada numa câmara ambiental a 20°C até a preparação do meio do teste.

### 2.1.5 Meio do Teste

Em 29 de janeiro de 2008, soluções estoque de sais minerais concentrados foram adicionadas à água salgada para fornecer nutrientes minerais essenciais e traços de elementos necessários para sustentar o inóculo da água salgada durante o período de teste. O meio do teste for mexido e aereado numa câmara ambiental a 20°C durante um dia até o início do teste. Antes do início do teste, a concentração do oxigênio dissolvido do meio do teste e o pH foram medidos como 8,72 mg O<sub>2</sub>/L e 7,82, respectivamente.

### 2.1.6 Recipientes do Teste

Garrafas DBO 300-mL, limpas, com tampas de vidro foram usadas neste teste.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparo das Soluções Estoque da Substancia em Referencia

Uma solução estoque de 1,00-mg/mL da substancia em referencia foi preparada pesando-se 500,7 mg de benzoato de sódio num frasco volumétrico de 500-mL classe A e diluindo o volume com água reagente. Esta solução de caldo foi refrigerada quando não estava em uso. Esta solução foi usada na determinação da demanda química de oxigênio da substancia do teste.

Uma solução estoque de 1,00-mg/mL da substancia em referencia foi preparada pesando-se 500,9 mg de benzoato de sódio num frasco volumétrico de 500-mL classe A e diluindo o volume com água reagente. Esta solução foi usada no dia do preparo do teste de biodegradação.

### 2.2.2 Determinação da Demanda Química de Oxigênio

Como a composição da substancia do teste era desconhecida, a demanda teórica de oxigênio não pôde ser calculada. Portanto, a demanda química de oxigênio (DQO) foi medida pelo método colorimétrico de refluxo fechado descrito em *Métodos Padrão para o Exame de Água e Água Residual* 0.

A substancia do teste foi agitada durante 15 minutos usando-se uma furadeira elétrica e um misturador de hélice com uma pequena lâmina sendo dosada diretamente nos frascos DQO. Cinco réplicas de amostras da substância do teste foram preparadas para a reação do refluxo fechado pesando-se 1,5752, 1,0852, 1,0383, 1,2971, 0,8264 mg da substancia do teste em laminas de vidro e depositando as laminas de vidro em frascos Bioscience accu-TEST™ Standard Range DQO com 2,5 mL de água reagente.

Duas amostras em branco foram preparadas adicionando-se 2,5 mL de água reagente aos frascos Bioscience accu-TEST™ Standard Range DQO. Uma das amostras em branco foi digerida no reator DQO e a segunda foi mantida em temperatura ambiente como uma amostra em branco não digerida.

Uma solução estoque de 1,06-mg/mL de ftalato potássico de hidrogênio (KHP) foi preparada pesando-se 105,8 mg de KHP em um frasco volumétrico de 100-mL Classe A e diluindo ao volume com água reagente. Como a DQO do KHP é 1,176 mg O<sub>2</sub>/mg, a DQO da solução estoque de 1,06-mg/mL foi 1,25 mg O<sub>2</sub>/mL. Amostras do padrão foram preparadas para a reação de refluxo fechado adicionando 0,10, 0,30, 0,70, 1,0, 1,4, e 1,8 mL da solução estoque KHP de 1,06-mg/mL e 2,4, 2,2, 1,8, 1,5, 1,1, e 0,70 mL de água reagente, respectivamente, aos frascos Bioscience accu-TEST™ Standard Range DQO. A DQO calculada dos padrões foi 0,125, 0,375, 0,875, 1,25, 1,75, e 2,25 mg O<sub>2</sub>.

Amostras de controle de qualidade foram preparadas para verificar a análise. Amostras de referencia em triplicata foram preparada para a reação de refluxo fechado adicionando 1,0 mL da solução estoque de benzoato de sódio de 1,00-mg/mL e 1,5 mL de água reagente aos frascos Bioscience accu-TEST™ Standard Range DQO. A demanda teórica de oxigênio (ThOD) das amostras de controle de qualidade foi 1,67 mg O<sub>2</sub>/mg.

As amostras DQO preparadas foram agitadas e colocadas num reator Bioscience DQO durante duas horas a aproximadamente 150°C. As amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e então as absorções foram medidas a 600 nm em um Espectrofotometro Genesys 20. A absorção foi inicialmente zerada usando a amostra em branco não digerida. A absorção de todas as outras amostras foi medida comparando-a com a amostra em branco não digerida. Amostras de valores DQO (mg O<sub>2</sub>/mg) foram calculadas por interpolação de absorção da amostra com a regressão linear da absorção padrão versus DQO (mg O<sub>2</sub>).

### **2.2.3 Preparo das Soluções de Teste a Granel**

Soluções de teste a granel para o tratamento do controle e do teste foram preparadas adicionando 3,980 mL do meio de teste para cada um dos dois vasilhames de 5-L Nalgene contendo 20 mL de água reagente, alcançando um volume total de 4.000 mL. O tratamento da substancia de referencia foi dosado numa concentração nominal de 5 mg/L adicionando 20 mL da solução original estoque da substancia de referencia de 1,00-mg/mL e 3.980 mL ao vasilhame de 5-L Nalgene para o volume total alcançar 4.000 mL. As soluções a granel preparadas foram mexidas usando-se barras misturadoras magnéticas cobertas com Teflon e placas misturados magnéticas isolantes.

### **2.2.4 Preparo e Incubação das Garrafas DBO**

Imediatamente antes de ser usada a substância do teste foi mexida durante 15 minutos usando-se uma furadeira elétrica e uma hélice misturadora com lâmina pequena. Alíquotas de aproximadamente 1,5-mg da substancia do teste foram pesadas em lâminas de vidro, que em seguida foram colocadas nas garrafas de teste BOD. As lâminas de vidro sem substância do teste foram adicionadas às garrafas BOD de controle e referencia.

Cada solução de teste a granel foi transferida para dez garrafas DBO drenando-se do vasilhame de 5-L Nalgene correspondente através da torneira. Todas as garrafas foram lacradas com tampas de vidro, não deixando espaço para o ar e rotulado com o número do estudo, tratamento, número da réplica, data do início, e iniciais (do Diretor do Estudo e do preparador).

As dez garrafas DBO de cada tratamento foram designadas aleatoriamente para amostragem em duplicata usando-se uma tabela de números aleatória. Duas garrafas aleatoriamente designadas para análise no Dia 0 foram retiradas de cada um dos grupos de tratamento. As garrafas restantes foram colocadas num misturador orbital numa câmara ambiental fixada em 20°C e mantidas no escuro embaixo de um pano preto. A temperatura na câmara ambiental foi continuamente medida.

### **2.2.5 Medição do Oxigênio Dissolvido e do pH**

As concentrações do oxigênio dissolvido foram medidas usando-se um WTW Oxi 330i ou um medidor de oxigênio dissolvido YSI Modelo 58. Esta sonda para oxigênio dissolvido é bastante sensível para medir os valores do oxigênio dissolvido abaixo de 0,5 mg O<sub>2</sub>/L. O pH da solução do teste foi medido usando-se um medidor de pH Accumet modelo AR50 pH. O oxigênio

dissolvido foi medido para as duas réplicas de cada um dos três tratamentos nos Dias 0, 7, 14, e 18. As medidas de pH foram feitas no Dia 0 e no Dia 18.

### 2.2.6 Avaliação de Micróbios

Contagens na placa bacteriana foram realizadas no meio de teste e na água salgada no início e em uma das garrafas DBO em duplicata de cada tratamento no Dia 18 e foram padronizadas de acordo com os métodos descritos em *Métodos Padrões para o Exame de Água e Água Residual* (3). As placas foram incubadas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  durante quatro a sete dias antes de contar o número de colônias nas placas com mais de 30, mas menos de 300 colônias. O número de colônias na diluição que chegou mais perto das 300 colônias foi usado para calcular as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

## 2.3 Cálculo

### 2.3.1 Cálculo da Demanda Teórica de Oxigênio (ThOD)

A demanda teórica de oxigênio foi calculada para a substância de referencia com base em sua composição de elementos usando as seguintes equações:

Para substâncias sem nitrogênio ou para substâncias com nitrogênio e onde o nitrogênio não é utilizado através de nitrificação,

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16[2C + \frac{1}{2}(H - Cl - 3N) + 3S + \frac{5}{2}P + \frac{1}{2}Na - O]}{\text{Molecular Weight (g/mol)}}$$

As variáveis C, H, Cl, N, S, P, Na, e O são o número de átomos de cada elemento na molécula. A ThOD calculada foi indicada em mg de oxigênio por mg de substância.

A substância de referencia, benzoato de sódio, não contém nitrogênio, e a  $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$  foi 1.67 mg  $\text{O}_2$ /mg.

### 2.3.2 Cálculo da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO da amostra (mg  $\text{O}_2$ ) foi determinada pela curva padrão preparada pelos padrões KHP conforme mostrado na equação abaixo:

$$Y = mX + b$$

Onde:

Y = Absorção

m = a inclinação da linha da curva de calibração

X = amostra da DQO (mg  $\text{O}_2$ )

b = a intercepção Y da curva de calibração

A amostra da DQO (mg O<sub>2</sub>) foi então dividida pela quantidade da amostra para determinar a quantidade de oxigênio pela quantidade da substância do teste. Foram realizados cálculos usando Microsoft Office Excel 2003.

### 2.3.3 Cálculo da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A DBO foi calculada com a seguinte equação

Onde:

DO<sub>T</sub> = captação de DO media no frasco de substância de teste ou referência (mg O<sub>2</sub>/L)

DO<sub>B</sub> = captação de DO media nos frascos de branco do inoculo (mg O<sub>2</sub>/L)

C<sub>T</sub> = concentração de teste para as substâncias de teste e referência (mg/L)

A DBO calculada é indicada em mg de oxigênio por mg de substância de teste.

### 11.3 Cálculo da Degradação Percentual

A degradação percentual com base na ThOD ou DQO (quando ThOD não puder ser determinada) é calculada através da seguinte equação:

$$\text{Degradação Percentual} = \frac{\text{BOD}}{\text{ThOD ou DQO}} \times 100$$

Onde:

DQO = 1,45 mg O<sub>2</sub>/mg para o tratamento de substância de teste, ou

ThOD = 1,67 mg O<sub>2</sub>/mg para o tratamento de substância de referência

## 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Água de Teste

A amostra de água de mar foi coletada em superfície na área costeira conhecida como Baía Dickerson. A temperatura mínima e máxima registrada da água do mar durante o carregamento foi 10,6 e 20,5°C, respectivamente. Na chegada aos Laboratórios ABC em 24 de janeiro de 2008, a salinidade da água do mar medida era de 29,0 partes por mil. A água do mar foi pré-tratada por sedimentação e decantação.

### 3.2 Ingredientes de Meio de Teste

As soluções de estoque de sal mineral foram adicionadas à água do mar para oferecer nutrientes minerais essenciais e traçar elementos necessários que mantenham a água do mar inócua por todo o período de teste. O meio de teste foi preparado usando 1 mL de cada uma das soluções mostradas na [Tabela 1](#) por litro de água do mar. O meio de teste foi agitado e aerado em uma câmara ambiental a aproximadamente 20°C até o início do teste.

### 3.3 Demanda Química de Oxigênio da Substância de Teste

A DQO média da substância de teste foi determinada para ser 1,45 mg O<sub>2</sub>/mg (Tabela 1 Ingredientes do Meio de Sais Minerais)

Solução	Composição	Solução de Estoque Concentração (g/L) Em Água Reagente
A1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,47
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,7
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	50,3
	NH <sub>4</sub> Cl	0,507
B	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	36,62
C	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	22,5
D	FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,253
	HCl Concentrado	1 gota

<sup>1</sup> pH da solução A foi 7,41.

O meio de teste foi preparado com o uso de 1 mL de cada das soluções acima por litro de água do mar.

). A correlação da curva padrão foi 0,9997. A DQO média da amostra de referência foi calculada para ser 1,67 mg O<sub>2</sub>/mg, o que é equivalente ao ThOD.

### 3.4 Respiração Endógena de Oxigênio no Tratamento de Controle

As concentrações de oxigênio dissolvido (DO) nas garrafas de controle DBO diminuíram de uma média de 8,09 mg O<sub>2</sub>/L no Dia 0 para uma média de 5,87 mg O<sub>2</sub>/L no Dia 18 (Tabela 2 Determinação da Demanda Química de Oxigênio)

ID da Amostra	Rep.	Absorção Medida (λ = 600 nm)	DQO (mg O <sub>2</sub> )	Quantida de de Amostra Adiciona da l	Conc. da Amostra Adicionad a(mg/mL)	Amostra DQO (mg O <sub>2</sub> /mg)
Benzoato de Sódio (Controle de Qualidade)	1	0,264	1,669	1,00	1,00	
	2	0,264	1,669	1,00	1,00	
	3	0,264	1,669	1,00	1,00	
	Médio		1,669	1,00	1,00	1,672

Sistema NOVAPLUS	1	0,356	2,254	1,5752	---	1,43
	2	0,254	1,605	1,0852	---	1,48
	3	0,238	1,504	1,0383	---	1,45
	4	0,292	1,847	1,2971	---	1,42
	5	0,194	1,224	0,8264	---	1,48
Média:						1,45
STDEV:						0,03
CV:						2 %

Valores calculados com o uso de números não arredondados.

$DQO\ (mg\ O_2) = (Absorção\ Medida - Y\text{-intercepta}) / \text{inclinação}$

$y\text{-intercepta} = 1.50 \times 10^{-3}$

$Inclinação = 0.1573$

$r^2 = 0.9997$

$Amostra\ DQO\ (mg\ O_2/mg) = DQO / \text{Quantidade de Amostra (mg)}$

<sup>1</sup> Referência (Benzoato de Sódio) adicionado por volume (mL). Substância de teste (Sistema NOVAPLUS) adicionada por peso (mg).

<sup>2</sup> DQO de controle de qualidade representa 100% do ThOD, 1.67 mg O<sub>2</sub>/mg.

). O objetivo dos controles era oferecer uma medida do oxigênio dissolvido consumido devido à respiração endógena do micróbio inoculado. Como um percentual da concentração do oxigênio dissolvido inicial medido, 8,09 mg O<sub>2</sub>/L, o oxigênio total consumido foi um Máximo de 27% (diferença dos valores de oxigênio dissolvido nos Dias 0 e 18 divididos pelo valor do oxigênio dissolvido no Dia 0 para o tratamento de controle). Este valor estava entre a recomendação afirmada no protocolo (1) que o oxigênio consumido pelo controle não deveria exceder 30% da concentração inicial.

### 3.5 Biodegradação da Substância de Referência

A substância de referência atingiu 91,1% de biodegradação no Dia 7 de teste (Tabela 4, Tabela 6 Medidas de pH

Dia	Réplica	Grupo de Tratamento		
		Controle	Substância de Referência	Substância de Teste
0	1	7,72	7,92	7,96
	2	7,87	7,90	7,98
18	1	7,62	7,27	7,43
	2	7,64	7,26	7,38



e Figura 2). Com base neste resultado, a substância de referência atendeu os critérios de aceitabilidade definidos no protocolo (>60% biodegradação em 10 dias) e confirmada se o micróbio inoculado era viável e ativo.

### 3.6 Biodegradação da Substância de Teste

A substância de teste, Sistema NOVAPLUS, atingiu uma biodegradação máxima de 83,0% no Dia 7 do estudo. Como a biodegradação do Sistema NOVAPLUS foi maior que 60%, os resultados do teste são positivos para biodegradação em um ambiente marinho de acordo com o Protocolo OECD 306 (1). Notou-se que o OD no Dia 18 para uma das réplicas foi mais alto que outras réplicas no Dia 14 e 18 (1,30 mg O<sub>2</sub>/L versus <0,25 mg O<sub>2</sub>/L). Como este valor também corresponderia à biodegradação >60%, nenhuma outra investigação foi feita. Estes resultados são exibidos na [Tabela 4](#) e graficamente na [Tabela 6](#) Medidas de pH

Dia	Réplica	Grupo de Tratamento		
		Controle	Substância de Referência	Substância de Teste
0	1	7,72	7,92	7,96
	2	7,87	7,90	7,98
18	1	7,62	7,27	7,43
	2	7,64	7,26	7,38

e [Figura 2](#).

### 3.7 Avaliação Microbiana

Os resultados da contagem de bactérias em lâminas de  $1,70 \times 10^5$  e  $1,10 \times 10^5$  UFC/mL para a água do mar aerada e o meio de teste do Dia 0 confirmou que o micróbio inoculado era viável e ativo no início do estudo. A contagem de bactérias em lâminas no Dia 18 ([Tabela 5](#)) indicam que o micróbio inoculado permaneceu viável e ativo até o final do teste em cada tratamento. Os resultados da contagem de bactérias em lâminas de substância de teste de tratamento mostram que a substância de teste era não tóxica para o micróbio inoculado na concentração de teste (5 mg/L).

### 3.8 Temperatura

O desvio médio e padrão das medições de temperatura foram  $19,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$  do Dia 0 até o final do dia 18 do teste. A temperatura da câmara ambiental variou de 19,3 a 20,6°C durante este tempo.

### 3.9 Medidas de pH

Todos os valores de pH estiveram em uma variação aceitável para sistemas biológicos ([Tabela 6](#)).

### 4.0 CONCLUSÕES

A degradação percentual para a substância de teste nos Dias 7, 14 e 18 foi 83,0, 79,6, e 69,8%, respectivamente. O teste foi terminado no Dia 18 devido ao valor >60% de biodegradação da substância de teste nos Dias 7 e 14. Como a biodegradação foi maior que 60%, os resultados do teste indicaram que o Sistema NOVAPLUS tem potencial de biodegradar em ambiente marinho de acordo com o Protocolo OECD 306 (1). A degradação percentual da substância de referência, benzoato de sódio, atingiu 91,1% no Dia 7, atendendo os critérios de aceitabilidade de teste. Os resultados da análise de contagem de bactérias em lâminas indicaram que a substância de teste era não tóxica para a água do mar inoculada na concentração de teste de 5 mg/L.

Não houve dificuldades encontradas que afetassem a integridade do estudo.

### 5.0 REFERÊNCIAS

- (1) *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*. 17 de Julho de 1992. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Biodegradability in Seawater*, Guia OECD Nº. 306.
- (2) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20ª Edição. 1998. *American Public Health Association*. Parte 5220 *Chemical Oxygen Demand (DQO)*.
- (3) *American Public Health Association (APHA)*, *American Water Works Association (AWWA)*, e *Water Environment Federation (WEF)*. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª Edição. Parte 9215 B. *Pour Plate Method*.

**Tabela 1**      **Ingredientes do Meio de Sais Minerais**

Solução	Composição	Solução de Estoque Concentração (g/L) Em Água Reagente
A <sup>1</sup>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,47
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	21,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50,3
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,507
B	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,62
C	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,5
D	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,253
	HCl Concentrado	1 gota

<sup>1</sup> pH da solução A foi 7,41.

O meio de teste foi preparado com o uso de 1 mL de cada das soluções acima por litro de água do mar.

**Tabela 2** Determinação da Demanda Química de Oxigênio

ID da Amostra	Rep.	Absorção Medida ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ )	DQO (mg O <sub>2</sub> )	Quantida de de Amostra Adiciona da <sup>1</sup>	Conc. da Amostra Adicionad a(mg/mL)	Amostra DQO (mg O <sub>2</sub> /mg)
Benzoato de Sódio (Controle de Qualidade)	1	0,264	1,669	1,00	1,00	
	2	0,264	1,669	1,00	1,00	
	3	0,264	1,669	1,00	1,00	
	Médio		1,669	1,00	1,00	1,67 <sup>2</sup>
Sistema NOVAPLUS	1	0,356	2,254	1,5752	---	1,43
	2	0,254	1,605	1,0852	---	1,48
	3	0,238	1,504	1,0383	---	1,45
	4	0,292	1,847	1,2971	---	1,42
	5	0,194	1,224	0,8264	---	1,48
Média:						1,45
STDEV:						0,03
CV:						2 %

Valores calculados com o uso de números não arredondados.

$\text{DQO (mg O}_2\text{)} = (\text{Absorção Medida} - \text{Y-intercepta}) / \text{inclinação}$

y-intercepta =  $1.50 \times 10^{-3}$

Inclinação = 0.1573

$r^2 = 0.9997$

$\text{Amostra DQO (mg O}_2\text{/mg)} = \text{DQO} / \text{Quantidade de Amostra (mg)}$

<sup>1</sup> Referência (Benzoato de Sódio) adicionado por volume (mL). Substância de teste (Sistema NOVAPLUS) adicionada por peso (mg).

<sup>2</sup> DQO de controle de qualidade representa 100% do ThOD, 1.67 mg O<sub>2</sub>/mg.

**Tabela 3      Respiração Endógena de Oxigênio do Tratamento de Controle**

Dia de Amostragem	Oxigênio Dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)			Captação Média de Oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)
	Réplica 1	Réplica 2	Media	
0	8,06	8,12	8,09	---
7	7,01	7,00	7,01	1,08
14	6,33	5,73	6,03	2,06
18	5,83	5,91	5,87	2,22

Nota: Valores intermediários não são arredondados.

**Tabela 4 Biodegradação das Substâncias de Referência e de Teste**

Dia	Rep	Oxigênio Dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)		Captação Média de Oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)		BOD (mg O <sub>2</sub> /mg)		Percentual de Degradação	
		Referência	Teste	Captação Média de Oxigênio	Teste	Captação Média de Oxigênio	Teste	Captação Média de Oxigênio	Teste
0	1	8,82	8,19						
	2	<u>8,83</u>	<u>8,12</u>	---	---	---	---	---	---
	Média	8,83	8,16						
7	1	0,13	0,90						
	2	<u>0,15</u>	<u>1,06</u>	8,69	7,18	1,52	1,21	91,1	83,0
	Média	0,14	0,98						
14	1	0,12	0,11						
	2	<u>0,10</u>	<u>0,24</u>	8,72	7,98	1,33	1,16	79,8	79,6
	Média	0,11	0,18						
18	1	0,11	1,30						
	2	<u>0,10</u>	<u>0,13</u>	8,72	7,44	1,30	1,01	77,8	69,8
	Média	0,11	0,72						

Note: Valores intermediários não são arredondados.

**Tabela 5      Resultados da Contagem de Placas de Bactérias**

Meio de Teste no Início (UFC/mL)	Controle no Dia 18 (UFC/mL)	Referência no Dia 18 (UFC/mL)	Teste no Dia 18 (UFC/mL)
$1,10 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$

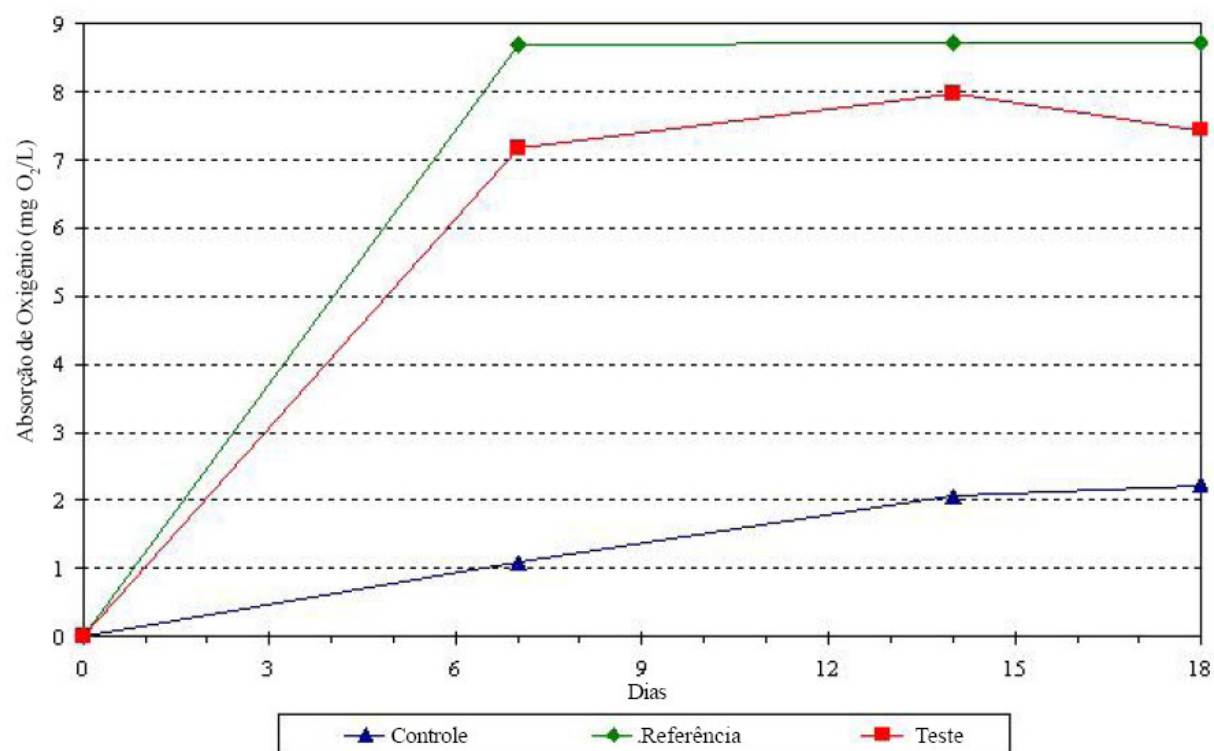
Nota: As placas no início foram incubadas por sete dias, enquanto as lâminas no Dia 18 foram incubadas por quatro dias.

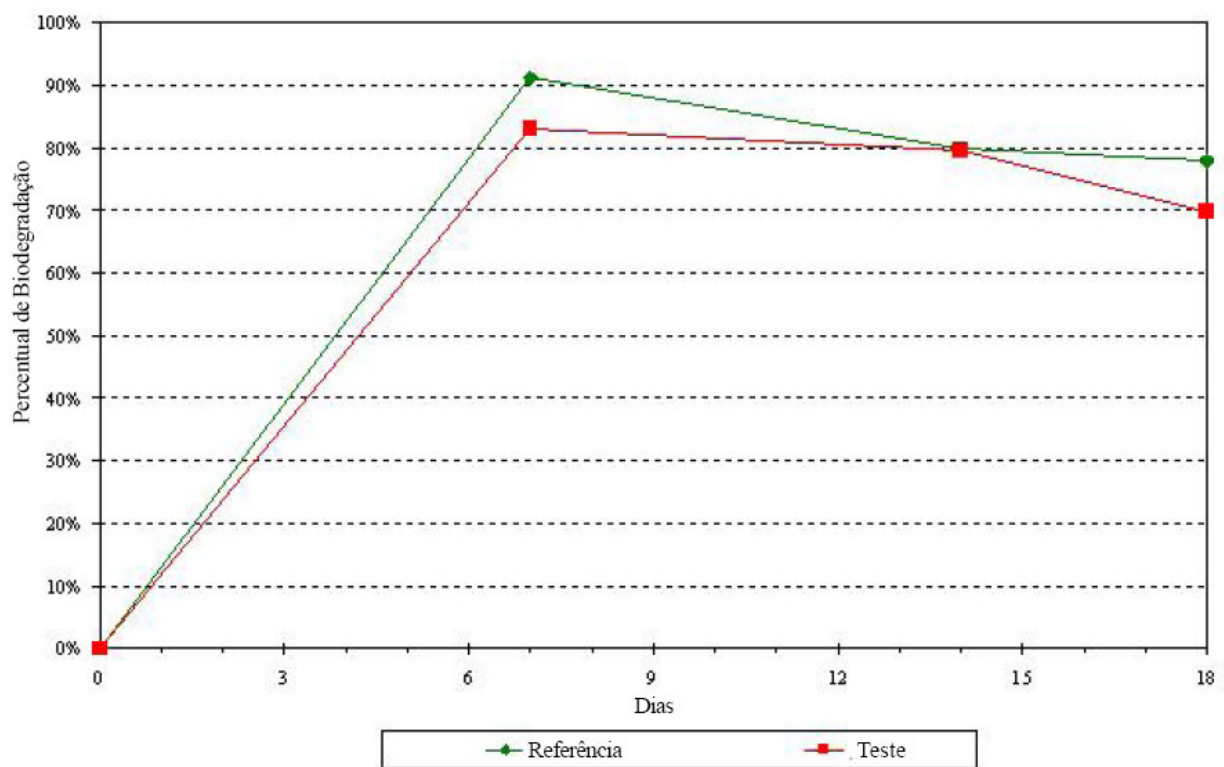
**Tabela 6**      **Medidas de pH**

Dia	Réplica	Grupo de Tratamento		
		Controle	Substância de Referência	Substância de Teste
0	1	7,72	7,92	7,96
	2	7,87	7,90	7,98
18	1	7,62	7,27	7,43
	2	7,64	7,26	7,38



**Figura 1. Captação de Oxigênio vs. Tempo, para Controle, Substância de Teste e Tratamentos da Substância de Referência**



**Figura 2. Degradação Percentual vs. Tempo, para Substâncias de Teste e Referência**

**APÊNDICE A – PROTOCOLO E ALTERAÇÕES**

**Sistema NOVAPLUS: Determinação da  
Biodegradabilidade em Água do Mar Usando o Método da Garrafa Fechada  
Metodologia de Teste**

Estudo ABC No. 63454

Este protocolo está em conformidade com a Diretriz OECD 306

Este protocolo é baseado no Protocolo Genérico ABC No. E818

## **1.0 TÍTULO DO ESTUDO**

Sistema NOVAPLUS: Determinação da biodegradabilidade em água do mar utilizando o método da garrafa fechada.

## **2.0 OBJETIVO**

O objetivo primário deste estudo é avaliar a biodegradabilidade aeróbica de uma substância de teste na água do mar contendo sais minerais. A flora microbiana na amostra da água do mar será a única fonte de micróbios. Os objetivos específicos do estudo são: 1) avaliar o potencial de biodegradabilidade do material de teste em um meio aquoso e aeróbico via uso de oxigênio dissolvido; e 2) determinar a utilização do oxigênio de um químico de referência para avaliar a disponibilidade do inoculo de teste.

## **3.0 PATROCINADOR DO ESTUDO**

M-ISWACO

5950 North Course Dr

Houston, TX 77072

Representante do estudo: Stephen P. Rabke

TEL: 281-561-1374 FAX: 281-561-1342

E-MAIL: [srabke\(S\)miswaco.com](mailto:srabke(S)miswaco.com)

## **4.0 LABORATÓRIO DE TESTE E ENDEREÇO DO DIRETOR DO ESTUDO**

ABC Laboratories, Inc. 7200 E. ABC Lane Columbia, Missouri 65202

Diretor do estudo: Philip Sarff

TEL: (573)876-8168 FAX: (573)443-9089

E-MAIL: [sarflp@abclabs.com](mailto:sarflp@abclabs.com)

## **5.0 CRONOGRAMA PROPOSTO**

DATA PROPOSTA DO INÍCIO EXPERIMENTAL: Janeiro de 2008

DATA PROPOSTA DE CONCLUSÃO DO EXPERIMENTO: Março de 2008

## **6.0 PROTOCOLO DO TESTE**

Este protocolo de teste é baseado na Diretriz da OECD para o Teste de Químicos, Método 306 (1).

## **7.0 DECLARAÇÕES DE QUALIFICAÇÃO**

O teste da garrafa fechada é considerado receptivo a substâncias voláteis de teste e substâncias de baixa solubilidade em água, assim como substâncias não-voláteis e solúveis em água.

Esse método não é apropriado para substâncias de teste que são inibitórias a bactérias ou são quimicamente instáveis sob as condições do teste. Provisões podem ser feitas para investigar efeitos inibitórios, mas serão realizadas como um escopo adicional.

O método de OECD 306 (1) foi estabelecido para substâncias puras ou as que contenham homólogos. Sempre que possível, substâncias de teste que são misturas não devem ser testadas, mas os componentes individuais devem ser testados em seu lugar.

## **8.0 SUBSTÂNCIAS DE TESTE E DE REFERÊNCIA**

### **8.1 Substância de teste**

A substância de teste será o Sistema NOVAPLUS. As seguintes informações da amostra e propriedades químicas/físicas devem ser fornecidas com a amostra da substância de teste ou antes de seu despacho: Número do lote/pacote, data de validade da amostra, descrição física, pureza (inclusive certificado de análise), estabilidade, condições de armazenagem sugeridas, solubilidade de solvente orgânico e água, pressão do vapor, informações de toxicidade disponíveis, uma Ficha de Dados de Segurança do Produto Químico (FISPQ) ou seu equivalente, e precauções de manuseio. Além disso, a fórmula empírica da substância de teste é exigida para determinar a demanda teórica de oxigênio (ThOD). Se o ThOD não pode ser fornecido ou calculado, a Demanda Química de Oxigênio (DQO) da substância de teste deve ser fornecida ou gerada como escopo adicional para servir como ponto de referência.

Antes de cada uso, a substância será apropriadamente misturada para garantir a homogeneidade.

### **8.2 Substância de Referência**

Uma substância de referência, como o benzoato de sódio, é usada para verificar a atividade inoculada nos sistemas de testes. Informações sobre a substância de referência serão obtidas com o fornecedor.

### **8.3 Caracterização da Amostra e Retenção**

Caracterização, estabilidade e estudos de solubilidade serão de responsabilidade do Patrocinador a menos que de outra maneira contratado para ABC Laboratories, Inc. A substância de teste será adequadamente disposta de conclusão seguida de seu uso no ABC Laboratories, Inc., a menos que outros acordos são feitos com o Responsável. O arquivamento de uma amostra de retenção, se necessário, será de responsabilidade do Patrocinador.

## 8.4 Preparação/Adição da Substância de Teste

Para substâncias teste solúveis em água, uma solução de estoque será preparada em uma concentração conhecida, que será documentada nos dados brutos. Soluções de estoque serão baseadas na porcentagem de ingrediente ativo na substância de teste, se conhecida. Caso a porcentagem de ingrediente ativo for desconhecida, soluções de estoque aquosas serão preparadas em uma concentração conhecida com base no peso do produto.

O pH da solução de estoque será medido. Ajustes do pH podem ser necessários dependendo do volume da dose e/ou quando a solução da dose for extremamente básica ( $\text{pH} > 10$ ) ou ácida ( $\text{pH} < 3$ ) para que não afete contrariamente a população microbial, mas será feito apenas após o Patrocinador ser consultado.

Produtos Químicos insolúveis podem ser dosados diretamente com base na gravimetria adicionando a substância de teste a uma bacia de vidro pesada ou uma cobertura de vidro. Alternativamente, e como um escopo adicional, substâncias teste insolúveis podem ser dosadas com o uso de sílica gel como um transportador inerte (Anexo 1). Demonstrou-se que a biodegradação para algumas substâncias de teste insolúveis em água é mais rápida e completa quando a substância de teste foi absorvida a um transportador inerte (2).

## 9.0 MATERIAIS

### 9.1 Água de teste

Água do mar natural será coletada e transportada para ABC Laboratories para teste. A temperatura da amostra da água do mar será medida no momento da coleta. A amostra da água do mar será transportada dentro de um ou dois dias da coleta de maneira que a temperatura da água do mar durante o transporte seja próxima da temperatura na coleta, e deve ser similar à temperatura do teste.

Se o carbono orgânico dissolvido (COD) da amostra da água do mar parecer alto, acredita-se que o DBO branco após 28 dias será mais do que 30% do das substâncias de referência, ou a temperatura na coleta for maior que  $\pm 5^\circ\text{C}$  da temperatura do teste, a água do mar será amadurecida sete dias antes de ser usada. A água do mar será amadurecida estocando-a sob condições aeróbicas à última temperatura e no escuro ou em luz difusa.

Antes de ser usada, a água do mar pode ser pré-tratada para eliminar partículas grossas (se estiverem presentes).

### 9.2 Recipientes de teste

Garrafas limpas de DBO de 250-300 mL (i. é, livre de matéria orgânica e tóxica) com tampas de vidro serão usadas em recipientes de teste. Objetos de cristal serão limpos adicionando 5-10 mL de solução de lavagem (iodo de 2,5 g + 12,5 g KI por litro de 1% de ácido sulfúrico p/V ) para a garrafa e agitando bem. Os objetos de cristal permanecerão em pé durante 15 minutos e depois

serão enxaguados completamente com água reagente. Os objetos de cristal serão então, transformados em cinza em um forno.

### **9.3 Eletrodo de oxigênio**

Um Medidor de Oxigênio Dissolvido Modelo 54 YSY ou equivalente com um exame de oxigênio BOD serão usados para medir as concentrações de oxigênio dissolvido dentro dos recipientes de teste.

### **9.4 Câmara ambiental**

O estudo será conduzido em uma câmara onde cabe uma pessoa a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  no escuro. Iluminação do laboratório será permitida dentro da câmara por períodos curtos de tempo para permitir monitoramento do sistema, medições da qualidade da água e coleta de amostra. A temperatura da câmara ambiental será registrada continuamente durante o teste.

## **10.0 PROCEDIMENTOS DE TESTE**

### **10.1 Meio do teste**

#### **10.1.1 Soluções estoque**

Solução tampão de fosfato: Aproximadamente (i. e, dentro de  $\pm 0.05$  g) 8,50 g.  $\text{KH}_2\text{P}_04$ , 21.75 g  $\text{K}_2\text{HP}_04$ , 33.30 g  $\text{Na}_2\text{HP}_04 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e 0,50 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  serão dissolvidos em e diluídos a 1L com água reagente. O pH será ajustado para  $7,4 \pm 0,2$  com 1,0 N HCl ou NaOH

Solução de cloreto de cálcio: Aproximadamente (i. e, dentro de  $\pm 0.05$  g) 27,50 g. anidro  $\text{CaCl}_2$  ou 36.40 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  será dissolvido em e diluído a 1 L com água reagente.

Solução de sulfato de magnésio: Aproximadamente (i.e, dentro de  $\pm 0,05$  g) 22,50 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  será dissolvido em e diluído a 1 L com água reagente.

Solução de cloreto férrico: Aproximadamente (i. e, dentro de  $\pm 0,02$  g) 0,25 g.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  serão dissolvidos em e diluídos a 1 L com água reagente. Uma gota de HCl concentrado ou 0,4 g EDTA será adicionado para que a solução seja armazenada.

Equivalentes molares de químicos podem ser usados. Os volumes acima podem ser ajustados para fazer mais ou menos, conforme necessário.

#### **10.1.2 Preparação do meio de teste**

O agente de teste será preparado diluindo 1mL de soluções de tampão de sulfato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e cloreto férrico por litro de água do mar pré-tratada. Um volume adequado de meio de teste será preparado.



O meio de teste será energeticamente agitado e ventilado ( $>250$  mL/minuto) por pelo menos uma hora. Se o oxigênio dissolvido (OD) for  $<7$  mg/L, agitação e ventilação devem ser mantidos até que o OD for  $>7$  mg/L. O meio do teste será então agitado moderadamente e ventilado a  $20^{\circ}\text{C}$  até seu uso. O OD e o pH do meio de teste será medido imediatamente antes de ser usado. Todas as operações de transferência e enchimento do meio de ar saturado serão conduzidas livres de bolha (i. e, puxando pelo sifão).

## 10.2 Preparação das Garrafas de Teste

Para cada um dos garrafões para ácido de 5-L, será adicionado um volume adequado do meio de teste preparado. Substância de teste e referência será adicionada aos garrafões conforme indicado abaixo:

1 Garrafão – espaço vazio de meio de teste, sem substância de teste e referência

1 Garrafão – substância de referência a 2 a 5 mg/L

1 Garrafão - Se solúvel: Substância de teste a 2 a 10 mg/L. Se insolúvel e a substância de teste é gravimetricamente adicionada às garrafas BOD, a composição em garrafão será a mesma que o espaço vazio do meio de teste.

A concentração da substância de teste será baseada na solubilidade, informações de toxicidade disponíveis e ThOD ou DQO. A substância de referência será adicionada na mesma concentração que a substância de teste, mas não mais de 5 mg/L. Todos os garrafões serão completamente misturados para garantir a uniformidade da mistura.

A pedido do Patrocinador, um garrafão adicional pode ser montado para checar os possíveis efeitos inibidores da substância de teste no inoculo se a toxicidade for conhecida. Esse garrafão de toxicidade conterá o meio de teste inoculado e tanto a substância de teste (se solúvel) quando a de referência nas respectivas concentrações. Se a substância de teste não for solúvel, a substância de teste será adicionada gravimetricamente.

A pedido do patrocinador, um garrafão adicional pode ser montado para checar mecanismos abióticos, como hidrólise ou absorção. Esse garrafão de controle abiótico conterá o meio de teste inoculado, a substância de teste (se solúvel), e o cloreto de mercúrio (50-100 mg/L) para parar a atividade microbial. Se a substância de teste não for solúvel, a substância de teste será adicionada gravimetricamente.

Cada garrafa será preenchida sem deixar nenhum espaço vazio pela adição das soluções dos garrafões correspondentes. Todas as bolhas de ar nas garrafas BOD serão furadas e cada garrafa, tapada. Cada garrafa de amostra será exclusivamente rotulada.

### 10.3 Oxigênio Dissolvido e Medições de pH

Garrafas duplicadas de cada tratamento serão destinadas aleatoriamente para cada dia de amostragem. Imediatamente depois das garrafas de DBO serem preenchidas, duas amostras de cada tratamento serão coletadas para medições de OD e pH no dia 0. As garrafas remanescentes serão colocadas em uma câmara ambiental a  $20 \pm 1$  °C. Garrafas duplicadas de cada grupo de teste serão removidas no término do teste (dia 28) e em dois pontos de amostragem entre o início e o término (i. é., dias 4 e 15) para medições de OD e pH. Periodicamente durante a incubação, as garrafas serão agitadas e os funis serão preenchidos com água reagente.

### 10.4 Contagem das Placas de Bactérias

Uma alíquota do meio de teste será avaliada no dia 0 para atividade microbial conduzindo uma contagem de placa padrão (3). Partes alíquotas de uma garrafa DBO de cada tratamento (isto é., controle, referência e teste) também serão avaliadas para atividade microbial no término para demonstrar que a substância de teste não era tóxica para o inóculo microbial.

### 10.5 Análise de nitrato/nitrito

Se a substância de teste contiver nitrogênio, a concentração final do nitrato e nitrito pode ser medida em todas as amostras, no final do teste, para que o grau calculado de biodegradação possa ser corrigido se a nitrificação tenha sido realizada.

## 11.0 CÁLCULOS E ESTATÍSTICA

### 11.1 Cálculo de Demanda Teórica de Oxigênio (ThOD)

A demanda teórica de oxigênio será calculada para a substância de teste com base em sua composição elementar usando as seguintes equações.

Para substâncias sem nitrogênio ou substâncias com nitrogênio e onde o nitrogênio não é utilizado por meio da nitrificação,

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16[2C + \frac{1}{2}(H-Cl-3N) + 3S + 5/2P + TNa-0]}{\text{Peso molecular (g/mol)}}$$

Para substâncias com nitrogênio e onde o nitrogênio é completamente utilizado por meio da nitrificação,

$$\text{ThOD}_{\text{NH}_3} = \frac{16[2C + \frac{1}{2}(H-Cl) + 5/2N - 3S + 5/2P + \frac{1}{2}Na-0]}{\text{Peso molecular (g/mol)}}$$

As variáveis C, H, Cl, N, S, P, Na e O são cada número do elemento de átomos na molécula. O ThOD calculado é indicado em mg do oxigênio por mg da substância de teste.

Se a substância de teste contém nitrogênio, ambas as equações serão usadas. A substância de referência, benzoato de sódio, não contém nitrogênio e o  $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$  é 1,67mgO<sub>2</sub>/mg.

## 11.2 Cálculo da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A DBO é calculada através da seguinte equação:

$$DBO = \frac{DO_T - DO_B}{C_T}$$

Onde:

$DO_T$  = captação de DO media no frasco de substância de teste ou referência (mg O<sub>2</sub>/L)

$DO_B$  = captação de DO media nos frascos de branco do inoculo (mg O<sub>2</sub>/L)

$C_T$  = concentração de teste para as substâncias de teste e referência (mg/L)

A DBO calculada é indicada em mg de oxigênio por mg de substância de teste.

## 11.3 Cálculo do Percentual de Degradação

O percentual de degradação com base na ThOD ou DQO (quando ThOD não puder ser determinada) é calculada através da seguinte equação:

$$\text{Percentual de Degradação} = \frac{\text{BOD}}{\text{ThOD ou DQO}} \times 100$$

Se a substância de teste contiver nitrogênio, a degradação percentual será calculada usando tanto ThOD<sub>NH3</sub> quanto ThOD<sub>NH3</sub>. Se a classificação de biodegradabilidade da substância de teste não for a mesma quando a biodegradação percentual for calculada usando os valores diferentes de ThOD (por exemplo, prontamente biodegradável usando ThOD<sub>NH3</sub> e inerentemente biodegradável usando ThOD<sub>NH3</sub>), a concentração final de nitrato e nitrito será medida em todas as amostras. O oxigênio consumido através da nitrificação será determinado da alteração na concentração de nitrato e nitrito. O oxigênio consumido na formação de nitrato é 4,57, multiplicado pelo aumento na concentração de nitrato-N e o oxigênio consumido na formação de nitrito é 3,43, multiplicado pelo aumento na concentração de nitrito-N. O oxigênio total consumido será somado e, então, subtraído de DO<sub>T</sub> antes de calcular a BOD. O valor corrigido do consumo de oxigênio devido à C-oxidação será, então, comparado com ThOD<sub>NH3</sub>.

Antecipa-se que não há tendência nos dados na condução do presente estudo. Nenhum teste estatístico específico será usado para o presente estudo.

## 12.0 CRITÉRIOS DE ACEITABILIDADE DO TESTE

Para o teste ser válido, os seguintes critérios devem ser atendidos: (A) a depleção de oxigênio nos frascos de branco do meio de teste não deve exceder 30% da concentração de oxigênio inicial; (B) a concentração residual de oxigênio nos frascos de DBO não deve ser abaixo de 0,5 mg/L em nenhum momento, a menos que o método usado para medição da captação de oxigênio dissolvido seja exato nesses níveis; e (C) a substância de referência deve exibir uma DBO  $\geq 50\%$  de ThOD dentro de um período de tempo razoavelmente curto (isto é, <10 dias).

## 13.0 RELATÓRIO

Um relatório final será apresentado ao Patrocinador e incluirá, entre outros, o que segue:

- Datas, nome e endereço do laboratório onde o teste foi realizado.
- Objetivos do estudo.
- Uma descrição do desenho experimental, juntamente com uma descrição de e referência a quaisquer métodos usados para análise de dados.
- Descrição da substância de teste (por exemplo, data do recebimento, condições de armazenamento, pureza, características físicas e método de preparação das soluções de estoque e/ou teste) e identificação da substância de referência, se aplicável.
- Descrição da matriz aquosa, incluindo fonte e dados obtidos.
- Resultados das medições de OD.
- A DBO calculada e a degradação percentual. Um gráfico da degradação percentual versus tempo.
- Variação da temperatura da câmara ambiental sobre a duração do teste.
- Resumo dos dados e uma declaração das conclusões tiradas de quaisquer análises de dados, se adequado.
- Descrição de quaisquer desvios no protocolo.
- Localização de dados brutos.
- Lista de todo o pessoal técnico envolvido no estudo e a assinatura do Diretor do Estudo.
- Declaração de conformidade com a GLP por parte do Diretor do Estudo e uma declaração por parte da Unidade de Garantia da Qualidade da ABC Laboratories.

#### **14.0 ALTERAÇÕES E DESVIOS NO PROTOCOLO**

O Diretor do Estudo pode fazer alterações ao presente protocolo. Todas as alterações descreverão a(s) modificação(ões), a(s) razão(ões) da alteração e o efeito no estudo, se houver, e serão comunicadas ao Representante do Patrocinador. Todas as alterações serão assinadas e datadas por no mínimo o Diretor do Estudo e mantidas no protocolo.

No caso de um desvio no protocolo, uma descrição por escrito do desvio, incluindo a razão para o desvio e qualquer impacto no estudo como um resultado do desvio será comunicado ao Representante do Patrocinador. Todos os desvios serão assinados e datados por no mínimo o Diretor do Estudo e mantidos no protocolo.

#### **15.0 GARANTIA DA QUALIDADE**

A Unidade de Garantia da Qualidade da ABC inspecionará uma ou mais fases críticas para assegurar que os equipamentos, o pessoal, os procedimentos e os registros estejam em conformidade com as diretrizes listadas neste protocolo. Os resultados dessas inspeções serão relatados ao Diretor do Estudo e à administração do ABC. A minuta e os relatórios finais serão revisados com relação ao protocolo e à conformidade com a GLP, bem como para assegurar que os métodos e procedimentos de operação padrão usados foram seguidos. Uma declaração assinada será incluída no relatório, especificando os tipos de inspeções realizadas, as datas nas quais as inspeções foram realizadas e as datas nas quais as inspeções foram relatadas ao Diretor do Estudo e à administração.

#### **16.0 CONFORMIDADE COM A GLP**

Todos os procedimentos de teste, documentação, registros e relatórios estarão em conformidade com os Princípios de Boas Práticas Laboratoriais (4) da OECD. O relatório conterá uma declaração atestando a esse fato.

#### **17.0 REGISTROS**

Os registros a serem mantidos incluirão, entre outros, recebimento da substância de teste, preparações e diluições de solução; registros de instrumento detalhando a calibração e manutenção; registros da instalação (mantidos na ABC); números de identificação de controle de material para todos os instrumentos usados; armazenamento da substância de teste, soluções e amostras; e pesos e volumes. Todos os dados brutos originais coletados durante o presente estudo serão mantidos na ABC Laboratories até a finalização do estudo. Mediante a conclusão do estudo, todos os dados brutos originais serão submetidos ao Patrocinador junto com o relatório final. Uma cópia do relatório final, cópias de todos os dados brutos do estudo e todos os registros de instalação originais serão mantidos nos arquivos da ABC Laboratories.

#### **18.0 DESCARTE DE ESPÉCIMES**

Após a finalização do relatório, a disposição de todos os espécimes (isto é, qualquer material derivado do sistema de teste para exame, análise ou retenção) gerados durante a condução do teste será concluída em uma maneira tempestiva. O tempo de detenção dos espécimes de retenção será baseado nas informações de estabilidade fornecidas pelo Patrocinador ou pelos dados de estabilidade gerados pela ABC Laboratories. Os espécimes de retenção serão devolvidos ao Patrocinador, a menos que o arquivamento seja contratado com a ABC Laboratories. A documentação do descarte de espécime será retida com os registros do estudo no Arquivo da ABC Laboratories.

## **19.0 REFERÊNCIAS**

- (1) *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*. 17 de Julho de 1992. *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Biodegradability in Seawater*, Guia OECD Nº. 306.
- (2) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20ª Edição. 1998. *American Public Health Association*. Parte 5220 *Chemical Oxygen Demand (DQO)*.
- (3) *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), e Water Environment Federation (WEF)*. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª Edição. Parte 9215 B. *Pour Plate Method*.
- (4) *Organization for Economic Cooperation and Development*. 1997. *Decision of the Council, Revised Principles of GLP [C(97) 186/Final]*.

## **APROVAÇÃO DO PROTOCOLO**

### **Diretor do Estudo**

Nome (assinatura): Data: 24 de janeiro de 2008

Nome/Cargo: Philip Sarff/Químico Sênior

### **Representante do Patrocinador**

Nome (assinatura): Data: 28 de janeiro de 2008

Nome/Cargo: JStephen P. Rabke/Gerente – Saúde Ocupacional

### **Gerente do Laboratório**

Nome (assinatura): Data: 24 de janeiro de 2008

Nome/Cargo: Jeri Hofen/Assistente II de Garantia da Qualidade

### **Revisão do Protocolo da QAU [Unidade de Garantia da Qualidade] com relação à Conformidade com a GLP**

Nome (assinatura): Data: 24 de janeiro de 2008

Nome/Cargo: Jon E. Rhodes/Diretor, ABC Chemical Services [Serviços Químicos da ABC]

## **ANEXO 1 -MÉTODOS PARA INTRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INSOLÚVEIS AO MEIO** (Baseados no Padrão ISO 10634)

- Prepare uma solução (~ 500 mg C/L) da substância de teste em um solvente orgânico (por exemplo, acetona ou diclorometano)
- Para cada sistema de substância de teste: Em um balão volumétrico com fundo arredondado de 250 mL, misture 30 g de sílica gel com o volume da solução da substância de teste exigida para fornecer a massa desejada à substância de teste (isto é, para uma solução de 20 mg C/L, um total de 60 mg C é necessário; se a solução da substância de teste for de 500 mg C/L, então, 120 mL da solução são adicionados). Seque o solvente orgânico usando um evaporador rotatório seguido por uma estufa a vácuo a 45 °C. A amostra de sílica gel com dose completa pode ser introduzida no sistema.
- Para cada sistema de substância de controle e referência: Prepare sílica gel não tratada da mesma maneira usando o mesmo solvente (sem substância de teste) e volume.
- A remoção do solvente pode ser verificada através da pesagem do balão volumétrico e da sílica gel antes da adição do solvente e após a secagem do solvente nas amostras de sílica gel não tratadas.

Alternativamente,

- Prepare uma solução (~ 1000 mg C/L) da substância de teste em um solvente orgânico (por exemplo, acetona ou diclorometano)
- Para cada sistema de substância de teste: Em um balão volumétrico com fundo arredondado de 250 mL, misture 30 g de sílica gel com 150 mL da solução da substância de teste. Seque o solvente orgânico usando um evaporador rotatório seguido por uma estufa a vácuo a 45 °C. Usando sub-amostras da dose de sílica gel, extraia a substância de teste e determine analiticamente a quantidade de substância teste absorvida. A quantidade de sílica gel a ser introduzida nos sistemas de teste pode, então, ser calculada. Um lote de sílica gel tratada pode ser adequado para múltiplos sistemas.
- Para sistema de substância de controle e referência: Prepare sílica gel não tratada da mesma maneira usando o mesmo solvente (sem substância de teste) e volume. Introduza a mesma quantidade de sílica gel não tratada aos sistemas conforme foi usado para os sistemas de substância de teste.
- A remoção do solvente pode ser verificada através da pesagem do balão volumétrico e da sílica gel antes da adição do solvente e após a secagem do solvente nas amostras de sílica gel não tratadas.

Se um método para extração da substância de teste da sílica gel não estiver disponível, então, o primeiro método deve ser usado. No primeiro método, uma pequena porção da substância de teste pode revestir o balão volumétrico de vidro e fazer com que a quantidade da substância de teste adicionada ao sistema seja menor do que a nominal. O segundo método, portanto, seria mais preciso já que a quantidade da substância de teste que reveste a sílica gel é analiticamente medida.



## NOTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PROTOCOLO

### TÍTULO DO PROTOCOLO

Sistema NOVAPLUS: Determinação da Biodegradabilidade em Água do Mar Usando o Método da Garrafa Fechada

### ALTERAÇÃO Nº: 1

**DATA DE ENTRADA EM VIGOR:** 15 de fevereiro de 2008

**LABORATÓRIO:** ABC Laboratories, Inc.

**Nº DO ESTUDO LABORATORIAL.:** 63454

**PATROCINADOR:** MI-SWACO

### **1. Seções 10.3 do Protocolo (Oxigênio Dissolvido e Medições de pH):**

A medição de pH será apenas realizada no início e no término.

O teste será terminado antes do Dia 28. O dia exato do término será relatado nos registros e no relatório do estudo.

Razão: A medição do pH é informação complementar, dessa forma, as medições no início e no término são suficientes para caracterização do pH durante o estudo. O teste será terminado antecipadamente porque as substâncias de teste e referência atingiram biodegradação > 60% no Dia 7 e confirmada pelos resultados do Dia 14.

Efeito no Estudo: Nenhum.

**ASSINATURA DO DIRETOR DO ESTUDO:.**

**DATA:** 18 de fevereiro de 2008.

**ASSINATURA DO REPRESENTANTE DO PATROCINADOR:**

**DATA:** 18 de fevereiro de 2008.

**ASSINATURA DA ADMINISTRAÇÃO DA ABC:**

**DATA:** 18 de fevereiro de 2008.

## NOTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PROTOCOLO

### TÍTULO DO PROTOCOLO

Sistema NOVAPLUS: Determinação da Biodegradabilidade em Água do Mar Usando o Método da Garrafa Fechada

### ALTERAÇÃO Nº: 1

**DATA DE ENTRADA EM VIGOR:** 28 de fevereiro de 2008

**LABORATÓRIO:** ABC Laboratories, Inc.

**Nº DO ESTUDO LABORATORIAL.:** 63454

**PATROCINADOR:** MI-SWACO

### 1. Protocolo:

O título desse estudo foi atualizado para:

“Sistema Novaplus (Fluido Novaplus SBM com Novawet II): Determinação da Biodegradabilidade em Água do Mar utilizando o Método da Garrafa Fechada”

**Razão:** Incluir o nome em português

**Efeito no estudo:** nenhum

**ASSINATURA DO DIRETOR DO ESTUDO:**

**DATA:** 28 de fevereiro de 2008.

**ASSINATURA DO REPRESENTANTE DO PATROCINADOR:**

**DATA:** 28 de fevereiro de 2008.

**ASSINATURA DA ADMINISTRAÇÃO DA ABC:**

**DATA:** 28 de fevereiro de 2008.

## NOTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PROTOCOLO

### TÍTULO DO PROTOCOLO

Sistema NOVAPLUS (Fluido Novaplus SBM com Novawet II): Determinação da Biodegradabilidade em Água do Mar Usando o Método da Garrafa Fechada

### ALTERAÇÃO Nº: 1

**DATA DE ENTRADA EM VIGOR:** 29 de fevereiro de 2008

**LABORATÓRIO:** ABC Laboratories, Inc.

**Nº DO ESTUDO LABORATORIAL.:** 63454

**PATROCINADOR:** MI-SWACO

#### **1. Protocolo Seção 10.1.1 Soluções Estoque**

Uma alíquota de 50,3065 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  foi utilizada na preparação da solução de fosfato. Essa alíquota não foi  $\pm 0,05\text{g}$  do equivalente molar desejado do  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (50,11 a 50,21 g)

**Razão:** A quantidade pesada foi aquela necessária para fazer 33,40 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , que é aquela utilizada no método de biodegradação OECD 301D.

**Efeito no Estudo:** Nenhum, pois o resultado da molaridade foi o mesmo (0,19 M do fosfato de sódio dibásico).

**ASSINATURA DO DIRETOR DO ESTUDO:**

**DATA:** 03 de março de 2008.

**ASSINATURA DO REPRESENTANTE DO PATROCINADOR:**

**DATA:** 03 de março de 2008.

**ASSINATURA DA ADMINISTRAÇÃO DA ABC:**

**DATA:** 03 de março de 2008.

**APÊNDICE B – CERTIFICADOS DA ANÁLISE**

Certificado de Análise  
 1 Reagent Lane Fairlawn, N3 07410  
 201.796.7100 tel  
 201.796.1329 fax

### Certificado de Análise

O Sistema de Qualidade da Fisher Scientific é Certificado pelo padrão ISO9002 (1994) pelo  
 Certificado da DNV nº 96-HOU-AQ-8052

Certifica-se, pelo presente, que as unidades do número do lote mencionado acima foram testadas e consideradas em conformidade com as especificações do grau listadas. Certos dados foram fornecidos por terceiros. A Fisher Scientific expressamente nega todas as garantias, expressas ou implícitas, incluindo as garantias implícitas de mercantibilidade e adequação para um propósito particular. A menos que, de outra forma, declarado, esses produtos não são propostos para diálise, uso parenteral ou injetável sem processamento adicional. Os seguintes são os resultados analíticos reais obtidos:

<b>Número do Catálogo:</b> S224	<b>Data de Fabricação:</b> 04/05/2004
<b>Número do Lote:</b> 041447	<b>ID da Amostra:</b> S224.041447.100
<b>Descrição:</b> BENZOATO DE SÓDIO NF/FCC	

Nome do Resultado	Unidades	Especificações	Valor do Teste
Alcalinidade	Aprovado/Reprovado	Aprovado no teste	Aprovado
Aparência	Relatório	Grânulos ou pó branco	Pó branco
Ensaio	%	99,0 a 100,5	100,4000
Ensaio – FCC	%	99,0 – 100,5	100,4
Metais Pesados (como Pb)	%	0,001 máximo	0,0003
Metais Pesados (como Pb) – FCC	MG/kg	10 máximo	3,3
Identificação	Aprovado/Reprovado	Aprovado no teste	Aprovado
Identificação – FCC	Aprovado/Reprovado	Aprovado no teste	Aprovado
Imp. Volátil Orgânica		Exigências atendidas	Aprovado
Água (FCC)	%	1,5 máximo	0,2
Água (H2O)	%	1,5 máximo	0,300

#### CERTIFICADO POR:

Assinado:.

Gerente Fairlawn do Laboratório de

Assinado:.

Gerente BPF do Laboratório

*Observação: Os dados listados são válidos para todos os tamanhos de embalagem deste lote do produto, expressos como uma extensão do número do catálogo listado acima. Se houve quaisquer dúvidas com relação ao presente certificado, queira entrar em contato com o Chemical Services pelo telefone 1.800.227.6701.*

<https://www.fishersci.com/CofASearch>

5/4/2005