

SETAC – Brazil

## Avaliação Ecotoxicológica do Ácido Hexadecanóico e do $\beta$ Sitosterol para *Daphnia similis* Claus 1876 (Cladocera, Crustacea)

R. GALVANI-SOBREIRA,<sup>1\*</sup> T. HEID-FURLEY,<sup>1</sup> J. I. EFFIGEN<sup>2</sup> & A. C. DE OLIVEIRA-FILHO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>APLYSIA Pesquisas Ambientais, Av. Américo Buaiz, 501 Praia do Suá, Vitória, ES

<sup>2</sup>Aracruz Celulose S.A., Rod. Aracruz s/n, Barra do Riacho, ES

### RESUMO

A madeira utilizada como matéria-prima pelas fábricas de celulose e papel possui altos teores de extrativos com elevado potencial tóxico, como os ácidos graxos e o *phytosterol*  $\beta$  sitosterol, que promovem efeitos tóxicos (masculinização das fêmeas, dentre outros) a organismos aquáticos como peixes e invertebrados. Em função da crescente preocupação com o meio ambiente no Brasil, fábricas como a Aracruz Celulose S.A. realizam rotineiramente testes ecotoxicológicos para avaliar os efeitos de seus efluentes no ambiente e antecipar possíveis problemas ambientais. O presente estudo foi realizado em duas etapas com o objetivo de relacionar a toxicidade do efluente misto da Aracruz Celulose com alguns dos extrativos mencionados. A primeira etapa consistiu na identificação e quantificação dos ácidos graxos e do  $\beta$  sitosterol, presentes nos efluentes setoriais através de análises cromatográficas. Na segunda etapa, foram realizadas análises ecotoxicológicas com dois dos extrativos mais abundantes e com o efluente misto (não tratado), para avaliar se a toxicidade aguda desse efluente para o organismo *Daphnia similis* está relacionada com as concentrações atuais dos extrativos testados. A quantificação dos extrativos presentes nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose mostrou que os efluentes da depuração, branqueamento ácido e evaporação contribuíram com as maiores concentrações desses compostos, ao passo que os efluentes do pátio de madeira e branqueamento alcalino contribuíram com os menores valores. Os ácidos graxos linoleico, hexadecanóico, hexacosanóico, octadecanóico e docosanóico foram os mais abundantes, e o  $\beta$  sitosterol foi identificado em todos os efluentes analisados, estando em maior concentração no efluente da depuração. Os extrativos escolhidos para os testes de toxicidade foram o ácido graxo hexadecanóico e o  $\beta$  sitosterol. Estes não apresentaram toxicidade aguda aos organismos-teste, mesmo em concentrações dez vezes maiores que as presentes nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose, entretanto, os resultados dos três testes de toxicidade do efluente misto para *D. similis* apresentaram toxicidade aguda, com EC50 iguais a 16,66%, 23,62% e 52,02%. Desta forma, concluiu-se que a toxicidade aguda exibida pelo efluente misto (não tratado) não está relacionada aos extrativos analisados.

*Palavras-chave:* testes de toxicidade, *Daphnia.similis*, extrativos, ácido hexadecanóico,  $\beta$  sitosterol.

### ABSTRACT

#### Toxicological evaluation of the hexadecanoic acid and $\beta$ sitosterol for *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladoceran, Crustacean)

The wood used as substance cousin for the plants of pulp and paper mill possesss high texts of extractives with raised potential toxic, as acid the greasy ones, and *phytosterol*  $\beta$  sitosterol, that they promote toxic effects (transform male into females, amongst others) to the aquatic organisms such as fish and invertebrates. In function of the increasing concern with the environment in Brazil, industries as Aracruz Celulose S.A. carry through ecotoxicologics tests routinely to evaluate the effect of its effluent ones in the environment and to anticipate possible ambient problems. The present study it was carried through in two stages with the objective to relate the toxicity of the effluent compound (not treated) of the Aracruz Cellulose with some of the mentioned extractives. The first stage consisted of the acid identification and quantification of greasy and the  $\beta$  sitosterol, effluent gifts in the sectorial ones of the plant, through chromatographic analyses. In the second stage, ecotoxicologics analyses with two of the extractives most abundant and with the effluent compound had

\*Corresponding author: Romena Galvani Sobreira, e-mail: romena@aplysia.com.br.

been carried through (not treated), to evaluate if the acute toxicity of these effluent for organism *Daphnia similis* this related with the current concentrations of the tested extractives. The quantification of the extractives effluent gifts in sectorial of the Aracruz the Cellulose showed that the effluent ones of the purification, acid bleaching and evaporation, had contributed with the biggest concentrations of these composites, to the step that effluent of the wooden patio and the alkaline bleaching, had contributed with the lesser values. Acid greasy the linoleic, hexadecanoic, hexacosanoic, octadecenoic and docosanoic had been most abundant, and the  $\beta$  sitosterol was identified in all the effluent ones analyzed, being in bigger concentration in the effluent one of the purification. The extractives chosen for the toxicity tests had been acid the greasy hexadecanoic and the  $\beta$  sitosterol. These had not presented acute toxicity to the organism-test, exactly in concentrations ten bigger times that the effluent gifts in sectorial of the Aracruz Cellulose, however, the results of the three tests of toxicity of the effluent compound for *D. similis* had presented acute toxicity, with EC50 equals to 16.66%; 23.62%; and 52.02%. Of this form, the acute toxicity shown by the effluent compound was concluded that (not treated) not this related to the analyzed extractives.

**Key words:** toxicity test, *Daphnia similis*, extractive, hexadecanoic acid,  $\beta$  sitosterol.

## INTRODUÇÃO

A madeira utilizada como matéria-prima pelas fábricas de celulose e papel possui altos teores de extrativos com elevado potencial tóxico, que podem promover alterações morfológicas, fisiológicas e mortalidade a organismos aquáticos, como peixes e invertebrados. Dentre esses compostos estão os extrativos, como os ácidos graxos, resínicos e *phytosterols*, encontrados nos efluentes gerados no processo industrial. O efluente gerado no polpeamento da madeira apresenta alta toxicidade (Dube & MacLachy, 2000), pois é rico em soda, sulfato, metanol, terpenos, acetona, produtos fenólicos e compostos naturais como lignina, ácidos graxos e resínicos e  $\beta$  sitosterol (Peng & Roberts, 2000; Furley *et al.*, 2003), como é o caso dos efluentes setoriais da evaporação (EVA) e depuração (DEP), em que acontece, respectivamente, a recuperação de produtos químicos do processo de produção, como, por exemplo, do licor negro, rico em lignina, e a separação de impurezas (nós, areia, pedras, etc.) da madeira após o processo de cozimento.

Já no branqueamento da polpa, realizado nos setores de branqueamento ácido e branqueamento alcalino, o efluente é rico em oxidantes como cloro, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio (Furley *et al.*, 2003; Perissoto *et al.*, 2003), além de fenóis, ácidos graxos, resínicos e *phytosterols* (Herstad *et al.*, 2003). As demais áreas da fábrica normalmente contribuem com ínfima quantidade de compostos tóxicos (Furley *et al.*, 2003), como é o caso do pátio de madeira (PM), caldeira (CALD), desmineralização (DESMI), secagem (SEC), onde, respectivamente, é realizada lavagem, descascamento e picagem da madeira; cozimento da mesma para transformá-la em polpa; retirada de sais minerais e impurezas da água que alimenta as caldeiras através dos processos de osmose reversa e troca iônica; e remoção de água da folha de celulose antes de passar à secagem por vapor.

Estudos com ácidos graxos e com o *phytosterol*  $\beta$  sitosterol mostram que esses compostos apresentam toxicidade para invertebrados (Kaplin *et al.*, 1997) e peixes, podendo

interferir no sistema hepático e hormonal, ou seja, causando redução da gônada, redução dos hormônios sexuais no fluxo sanguíneo, deterioração do embrião e masculinização das fêmeas (Gilman *et al.*, 2002).

Estudos realizados com o efluente misto (efluente não tratado, formado no tanque de mistura por todos os efluentes produzidos em cada setor de produção) da Aracruz Celulose nos anos 90 mostraram toxicidade aguda para *D. similis*. Entretanto, não foi verificado se a causa dessa toxicidade era decorrente da presença de altas concentrações de ácidos graxos e  $\beta$  sitosterol. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar se a toxicidade aguda exibida pelo efluente misto ao organismo *D. similis* está relacionada às concentrações do ácido graxo hexadecanoico e do *phytosterol*  $\beta$  sitosterol existentes nos efluentes setoriais (produzidos nos setores de produção da fábrica); e buscar controle interno desses efluentes, a fim de que os mesmos não cheguem com alta toxicidade à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), acarretando a redução da eficiência do tratamento biológico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira consistiu na extração, identificação e quantificação dos ácidos graxos e do  $\beta$  sitosterol presentes nos efluentes setoriais do pátio de madeira (PM), caldeira (CALD), desmineralização (DESMI), evaporação (EVA), depuração (DEP), branqueamento ácido (BA), branqueamento alcalino (BALC) e secagem (SEC).

A parte orgânica dos efluentes setoriais foi extraída utilizando diclorometano. Uma alíquota do efluente foi transferida para um funil de separação, onde foi adicionado diclorometano. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi recolhida em erlenmeyer de 250 ml com sulfato de sódio anidro, o qual depois foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, sendo filtrado em algodão previamente extraído com acetona.

Após a extração, o conteúdo foi concentrado utilizando o rotavapor modelo BUCHI 461 e então transferido para um

frasco de vidro previamente pesado e levado para estufa a  $\pm 60^\circ\text{C}$  até que ocorresse a evaporação completa dos solventes da alíquota concentrada.

Em seguida, o extrato concentrado foi analisado através do processo de separação, identificação e quantificação por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chamas (FID) e acoplado a um espectrômetro de massa.

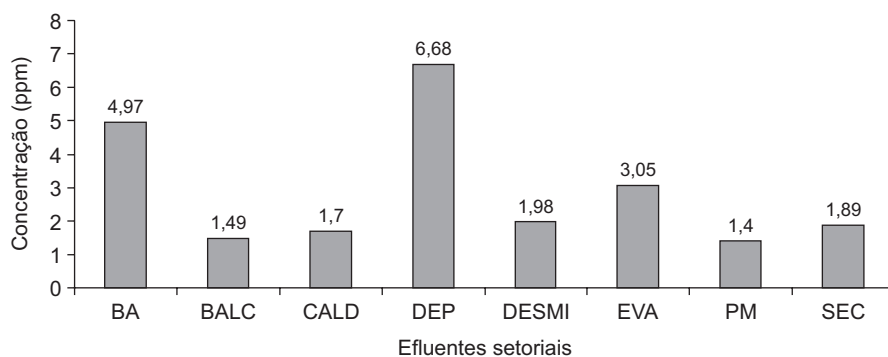
A segunda fase do trabalho consistiu na realização dos testes de toxicidade com o efluente misto, em três diferentes amostragens, com o ácido hexadecanóico e com o  $\beta$  sitosterol em concentrações até dez vezes maiores que as encontradas nos efluentes setoriais da fábrica. Para esse estudo foram realizados três testes com cada objeto de estudo, a fim de confirmar e obter boa reprodutibilidade dos resultados. Os testes de toxicidade foram realizados nas concentrações de 5%, 25%,

50% e 75% para o efluente misto e nas concentrações de 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L e 20,0 mg/L para o ácido hexadecanóico e para o  $\beta$  sitosterol de acordo com a norma CETESB L5.018.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efluentes da depuração, branqueamento ácido e evaporação apresentaram maiores quantidades de extrativos, como observado por Peng & Roberts (2000). Os demais efluentes contribuem com pequena quantidade desses compostos (Figura 1).

Os testes realizados com o efluente misto apresentaram toxicidade aguda para *D. similis* (Tabela 1), o que não foi observado nos testes com o ácido hexadecanóico e  $\beta$  sitosterol (Tabelas 2 e 3), mesmo em concentrações dez vezes maiores que as encontradas nos efluentes setoriais analisados.



**Figura 1** — Concentração total de extrativos nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose. Legenda: BA = branqueamento ácido, BALC = branqueamento alcalino, CALD = caldeira, DEP = depuração, DESMI = desmineralização, EVA = evaporação, PM = pátio de madeira e SEC = secagem.

**Tabela 1** — Valores de EC50 (%) do teste agudo com o efluente misto para o cladóceros *Daphnia similis*.

| Teste         | EC50 (%) | UT*  | Intervalo de confiança |
|---------------|----------|------|------------------------|
| 1ª amostragem | 16,66    | 0,06 | 11,88-23,39            |
| 2ª amostragem | 23,62    | 0,04 | 18,48-30,21            |
| 3ª amostragem | 52,02    | 0,01 | 45,67-59,27            |

\*Unidade tóxica.

**Tabela 2** — Porcentagem de organismos mortos ou imóveis por concentração de ácido hexadecanóico.

| Concentração (mg/L)                  | Porcentagem de organismos imóveis |         |         |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|
|                                      | Teste 1                           | Teste 2 | Teste 3 |
| Controle (H <sub>2</sub> O diluição) | 0                                 | 0       | 0       |
| 5                                    | 15                                | 0       | 0       |
| 10                                   | 10                                | 0       | 0       |
| 15                                   | 10                                | 5       | 0       |
| 20                                   | 20                                | 0       | 15      |

**Tabela 3** — Porcentagem de organismos mortos ou imóveis por concentração de  $\beta$  sitosterol.

| Concentração (mg/L)                  | Porcentagem de organismos imóveis |         |         |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|
|                                      | Teste 1                           | Teste 2 | Teste 3 |
| Controle (H <sub>2</sub> O diluição) | 0                                 | 0       | 0       |
| 5                                    | 15                                | 5       | 20      |
| 10                                   | 10                                | 10      | 5       |
| 15                                   | 40                                | 15      | 35      |
| 20                                   | 20                                | 0       | 30      |

Apesar de não ter causado efeito a 50% dos organismos, o  $\beta$  sitosterol mostrou-se com potencial tóxico mais elevado que o ácido hexadecanóico, já que a porcentagem de organismos imóveis foi maior que no teste com o ácido hexadecanóico.

De acordo com trabalhos realizados por Sayeed *et al.* (2000), esses extrativos causam toxicidade crônica em peixes e em *Ceriodaphnia dubia* (Markris & Banerjee, 2000) expostos a essas substâncias.

Desta forma, conclui-se que outros compostos podem estar sendo responsáveis pela atual toxicidade aguda do efluente misto da Aracruz Celulose à *D. similis*, como, por exemplo, compostos sulfurados, metanol, terpenos, acetonas, produtos fenólicos, cloro (Dube & MacLatchy, 2000; Furley *et al.*, 2003), dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio (Dalvi & Silva, 2002), não descartando também outros subprodutos da madeira que não foram testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CETESB L5.018, 1998, *Teste de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera; Crustacea)*. São Paulo, SP.
- DALVI, L. & SILVA, C. M., 2002, *Efeito do residual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do ClO<sub>2</sub> sobre o sistema de lodos ativados de indústria de celulose Kraft branqueado*. 35<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo SP.
- DUBE, M. G. & MACLATCHY, D. L., 2000, *Reverse Osmoses Treatment of condensates from a bleached Kraft pulp mill: effects on acute and chronic toxicity of process streams and final effluent*. 4<sup>th</sup> International Conference on Environmental Impacts of Pulp and Paper Industry. p. 270-276.
- FURLEY, T. H., OLIVEIRA, A. C. & EFFIGEN, J. I., 2003, *Balanço da toxicidade dos efluentes setoriais da Aracruz Celulose S/A*. 36<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo, SP.
- GILMAN, C. I., LEUSCH, F. D. L., BRECHENRIDGE, W. C. & MACLATCHY, D. L., 2002, Effects of phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450sc activity. *General and Comparative Endocrinology*, 130: 172-184.
- HERSTAD, S. S., RENBERG, L., BASTA, J., HOLTINGER, L. & WÄNE, G., 1997, *Chemical characterization of the organic content in bleached plan effluents*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. New Zealand, pp. 135-145.
- KAPLIN, C., HOLBOM, B. & HUHTINIEMI, N., 1997, *Removal and degradation of wood resin components in an activated sludge treatment plant*. 3<sup>rd</sup> International Conference on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents. New Zealand, pp. 146-152.
- MAKRIS, S. P. & BANERJEE, S., 2001, Fate of resin acids in pulp mill secondary treatment systems. *Water Research*, (36): 2878-2882.
- PENG, G. & ROBERTS, J. C. 2000. An improved method for analyzing resin acid in woods, pulp process water and effluent samples. *TAPPI Journal*, 82(12): 1-7.
- PERISSOTO, D., SALVADOR, E. & RAMOS, L. P., 2003, *Estudo comparativo da composição química de polpa kraft convencional e kraft MCC*. 36<sup>o</sup> Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP. São Paulo, SP.
- SAYEED, I., AHMAD, I., FÁTIMA, M., HAMID, T., ISLAM, F. & RAISUDDIN, S. 2000. Inhibition of brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPASE activity in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) exposed to paper mill effluent. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*.