

CONSIDERAÇÕES SOBRE A ECOTOXICOLOGIA E MUTAGENICIDADE DO SULFATO DE ALUMÍNIO FÉRRICO

Luciane Stenzel
Celso Foelkel
Vera R. B. Gallardo

Riocell S.A. - Guaíba - Brasil

SINOPSE

Este estudo teve como objetivo avaliar e discutir, quanto à ecotoxicidade e quanto ao potencial mutagênico, do sulfato de alumínio férrico (base anidra) e amostras do filtrado do lodo do tratamento de água de uma indústria de papel e celulose, no caso, da Riocell S.A, através de testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* e mutagenicidade com *Vibrio fischeri* cepa M169 (Sistema Mutatox) com e sem ativação metabólica. Observou-se que as amostras de sulfato de alumínio férrico (base anidra) apresentaram quanto à toxicidade crônica um efeito observado a partir de 1 ppm. Na avaliação aguda com *Ceriodaphnia dubia*, observou-se que 1 ppm também é a concentração efetiva que causa 50% de imobilidade aos organismos-teste. O sulfato de alumínio apresenta potencial mutagênico a partir de 8,75 ppm, na leitura de 16 horas, no meio Mutatox, sem enzima S-9 e na concentração de 2,19 ppm, leitura de 20 e 24 horas, nas mesmas condições. Com ativação metabólica, as amostras não apresentaram mutagenicidade. A amostragem coletada do resíduo da estação pulsator, na estação de tratamento de água, após a filtragem a vácuo, indicou um efeito observado, quanto a toxicidade crônica do filtrado na concentração referente a 4,2% de amostra (equivalente a 0,12 ppm de sulfato de alumínio base anidra). Apresentou toxicidade aguda o referente a EC50 = 3,5%, para *Ceriodaphnia dubia* e EC50 = 4,2%, para *Daphnia similis*. A toxicidade desse filtrado era um somatório da presença de compostos de alumínio e de hipoclorito de sódio, já que a água bruta sofre pré-cloração nesse sistema de tratamento.

1-INTRODUÇÃO

Com o crescente desenvolvimento tecnológico e urbano das sociedades humanas, faz-se necessário um controle preventivo das possíveis alterações que conseqüentemente possam ocorrer no meio ambiente.

O sulfato de alumínio é um insumo químico amplamente utilizado em tratamento de águas e efluentes. As indústrias de celulose e papel empregam abundantemente este

“Trabalho apresentado no 30º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, realizado em São Paulo - SP - Brasil, de 03 a 07 de novembro de 1997”

produto, no tratamento dos grandes volumes de água de que necessitam, na clarificação de seus efluentes e na colagem ácida de papéis (sulfato isento de ferro para esse caso). No caso, de uma estação de tratamento de água, utiliza-se entre 6 a 10 ppm de sulfato de alumínio férrico (base anidra) para tratamento de água. Esse tratamento é comum tanto em indústrias como em estações de tratamento de água municipais para fins de consumo humano.

O presente trabalho abordou a ecotoxicidade crônica, aguda e a mutagenicidade, presente ou não, no sulfato de alumínio férrico (base anidra) e no filtrado do resíduo decorrente do tratamento de água.

Os testes de toxicidade avaliam os efeitos causados aos representantes das espécies-teste e consistem em expor os organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo.

A avaliação da atividade mutagênica é de grande importância, considerando o dano que pode provocar ao material genético das futuras gerações e a existência de uma estreita correlação entre mutagênese e carcinogênese.

Os objetivos propostos para este estudo foram os seguintes:

- Detectar através da avaliação ecotoxicológica do sulfato de alumínio férrico (base anidra) e do filtrado do resíduo da estação de tratamento de água, os níveis de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, toxicidade aguda com *C. dubia* e *Daphnia similis*.

- Avaliar o nível de mutagenicidade do sulfato de alumínio férrico (base anidra) através do Teste de Mutatox, utilizando-se como organismo-teste, a cepa mutante M169 de *Vibrio fischeri*.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações sobre Sulfato de Alumínio

O sulfato de alumínio férrico líquido que chega até a Riocell apresenta aproximadamente os seguintes teores analisáveis:

- Óxidos de ferro (Fe_2O_3) = 1% (máx. 1,50)

- Óxido de alumínio (Al_2O_3) = 7,4% (mín.6,50)

- Sulfato de alumínio anidro ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) = 25% (mín.21,80)

- Sulfato férrico anidro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) = 2,6% (máx.3,75)

- Densidade = 1,33 g/cm³ (mín.1,315 g/cm³)

É um sal ácido, corrosivo para a maioria dos metais e a alguns concretos. Sua solubilidade é 86,9 partes por 100 partes de H₂O à 0°C.É necessário alcalinidade quando for aplicado a água para formar floco.A água coagulada com sulfato de alumínio pode conter compostos de alumínio em solução ou partículas específicas de óxido de alumínio hidratado. A natureza dos compostos é tão complexa que estes são registrados como óxido de alumínio ou de alúmen (Al_2O_3), determinando-se a concentração do íon alumínio (Al^{3+}) e convertendo em alumina equivalente multiplicando-se por 3.77.O sulfato de alumínio residual não pode ser registrado desta maneira, pois é incorreto admitir que o composto residual seja sulfato de alumínio. Como hidróxido de alumínio é solúvel na água até o limite de 0,3 a 0,5 mg por litro, deve-se prever alguma alumina residual, porém a quantidade não deve exceder cerca de 0,3 mg por litro.O sulfato de alumínio, comumente

denominado alúmen é, provavelmente, a substância química mais amplamente usada para coagulação dos suprimentos públicos de água, devido à excelente formação do floco, sua relativa economia e sua facilidade de manuseio. Os suprimentos de água tratados adequadamente com compostos de alumínio, tal como o sulfato de alumínio, podem conter menos alumínio do que a água não tratada, devido a insolubilidade dos compostos de alumínio formados e sua remoção por sedimentação e filtração. (BABBITT, DOLAND e CLEASBY, 1973)

2.2. Floculação no Tratamento de Água

A água bruta contém em suspensão partículas sólidas de pequenas dimensões e baixos pesos moleculares e partículas coloidais, principais responsáveis pela sua turbidez, que devem ser eliminadas. Esta eliminação é obtida por floculação, isto é, pela reunião das partículas em aglomerados volumosos, seguida pela decantação e filtração. A formação dos flóculos se processa ao redor das partículas de um precipitado absorvente, geralmente um hidróxido de alumínio. Este último, através de fenômenos físico-químicos diversos, atrai e fixa as partículas coloidais originando os flóculos que são adensados durante a floculação e eliminados na decantação e filtração. O hidróxido de alumínio é obtido pela adição à água bruta de dosagens convenientes de sulfato de alumínio e hidróxido de sódio. O sulfato de alumínio é o reagente coagulante, isto é, responsável direto pela formação dos núcleos iniciais dos flóculos. Quando adicionado a água, sofre hidrólise reagindo com a alcalinidade natural da água ou com a alcalinidade a ela adicionada, originando o hidróxido de alumínio. Para uma perfeita floculação e decantação é necessário que se faça uma neutralização, ou seja, uma correção de pH, fixado mais ou menos de 7,0 a 7,2 como alcalinidade suficiente para uma boa floculação (Riocell). Tratando-se de um composto bastante eficiente para flocular matéria orgânica, deve afetar os organismos testes nos ensaios de toxicidade. É objetivo desse estudo detectar a que nível isso ocorre.

2.3. Sistema Mutatox para Avaliação de Mutagenicidade

Os testes, empregando microrganismos para avaliar o efeito genotóxico de substâncias químicas, são utilizados com duas finalidades principais: distinguir compostos químicos capazes de induzir processos carcinogênicos, e avaliar a atividade mutagênica estudando o modo de ação dos agentes genotóxicos. O conhecimento destes mecanismos de interação com DNA fornece informações sobre a natureza da alteração primária na molécula, o tipo de mutação preferentemente induzida e a influência dos processos de reparação na atividade genotóxica. (Quillardet et alii, 1988). Para avaliação da genotoxicidade foi utilizado o Teste Mutatox, com *Vibrio fischeri*. É um sistema analítico de teste, o qual indica a presença de algum agente em uma substância que cause danos genéticos ao organismo-teste. Este sistema utiliza um cepa mutante, sem luminescência (*Vibrio fischeri*, cepa M169), para detectar agentes genotóxicos. A cepa-teste utilizada no Mutatox, mostra um aumento na produção de luz quando cresce na presença de concentrações sub-letais de agentes genotóxicos. Mutatox é um sensível e rápido teste para caracterização da genotoxicidade de águas, efluentes, sedimentos e resíduos perigosos. Detecta substâncias que tenham potencial para causar danos genéticos para os organismos. Além das já citadas vantagens, este teste estabelece uma correlação com o Teste de Ames, utiliza cepa padronizada de microrganismos não patogênicos que são

mantidos liofilizados, prontos para o uso imediato a qualquer momento por procedimentos também padronizados com ou sem S-9 (fração microssomal). Estes procedimentos são de simples operacionalização e empregam como único parâmetro para avaliação, a luz emitida pela bactéria. Contrariamente ao Teste Microtox, que serve para avaliar toxicidade crônica e aguda usando microrganismo que emite luz, o Teste Mutatox baseia-se numa cepa não luminescente. Se ela sofrer uma mutação e passar a gerar luz, essa luminescência é detectada e o composto testado é referido como mutagênico.

2.4 Controle Regulatório do Sistema-Lux da Bactéria *Vibrio fischeri* (MICROBICS, 1993)

O mecanismo de regulação do sistema de luminescência desta bactéria tem sido extensivamente estudado nos últimos quatorze anos. Englebracht et al. foi o primeiro a clonar e mapear o conjunto de sistema de luminescência da *Vibrio fischeri*. Os estudos mostram que o sistema luminescente da *V. fischeri* é organizado em dois divergentes transcritos óperons (P_L e P^R) separados por uma região regulatória comum. Óperon é um sistema de cistrons, sítios operador e promotor, pelos quais é regulada uma determinada atividade metabólica geneticamente controlada. O óperon da direita consiste de seis genes (*luxICDABE*), os quais codificam as enzimas requeridas para a formação auto-induzida (alfa (*luxA*) e beta (*luxB*)-sub-unidades), da enzima luciferase. Os genes *luxC*, *luxD* e *luxE* codificam as enzimas participantes na formação da longa cadeia diretamente pelo cAMP e a proteína ligante cAMP(CRP) e indiretamente pelas proteínas sigma-32 e GroESL. De acordo com o recente modelo proposto por Adar, a GroESL estabilizada interage com a proteína LuxR, para formar o LuxR-Complexo promotor. Este complexo é a molécula regulatória responsável para a indução do sistema luminescente. A transcrição do P^R começa sobre a ligação do LuxR-Complexo promotor com palíndromo (sequência de pares de bases do DNA) que tem a mesma leitura nos filamentos complementares do fragmento de DNA que separa os dois óperons. Presume-se que o LuxR-Complexo promotor desloca a proteína LexA (que atua como o repressor do óperon de luz), deste modo iniciando a transcrição do óperon da direita. Esta suposição é suportada pelas descobertas de Ulitzur et al. que mostrou que agentes induzidos SOS são ativos em mutantes RecA. Agentes SOS, todavia, desenvolveram o começo da luminescência ao natural e em espécies clonadas da bactéria luminescente. A cepa M169 é uma variante de *V. fischeri*. A lesão responsável pela baixa luminescência desta cepa não tem sido ainda completamente elucidada. Dados suportam a hipótese que a atividade de GroESL nas células de M169 é alterada. Esta suposição é devida as seguintes observações: As células de M169, enquanto submetidas a uma típica indução no sistema-lux, desenvolvem luminescência 10^5 para 10^6 vezes, abaixo da cepa selvagem. Demonstra que a lesão das células do M169 é originária de uma lesão no sistema regulatório, do que de uma mutação em um dos genes-lux estruturais. Esta premissa é firmada pela observação de que as células da M169 permaneceram escuras quando o conjunto de sistema-lux da *V. fischeri* foi introduzido nestas células pela ajuda de um plasmídeo RP4-lux. Novamente transferido do plasmídeo RP4, para dentro de uma cepa selvagem de *Escherichia coli*, produziu células luminescentes. Quando as células M169 são submetidas a falta de nitrogênio, elas sofrem uma total indução do sistema-lux. Um fenômeno similar ocorre em cepas de *E. coli* com o sistema-lux da *V. fischeri*. Isto foi atribuído ao efeito da carência na formação de proteínas HtpR (sigma-32) e GroESL. Baseando-se nestas observações podemos considerar como diferentes agentes genotóxicos podem restabelecer a luminescência na M169:

A-Ativação do sistema SOS, pelos agentes prejudiciais ao DNA, ou inibidores da síntese do DNA;

B-Formação de mutantes auxotróficos para aminoácidos os quais direcionam para o empobrecimento celular com subsequente indução dos genes *htrp* e *groESL*.

C-Produção do mutante *lexA* demonstrando baixa afinidade para a posição de ligação do DNA-lux.

D-Formação de mutantes-lux com uma alterada posição de ligação no DNA *lexA*.

E-Eventos mutacionais que aumentariam o “pool” celular das proteínas *HtpR* ou *GroESL*.

F-Um outro caminho para o controle regulatório de luz por agentes do DNA.

2.5. Bioensaios de Toxicidade

Bioensaios são técnicas de laboratório usadas para avaliar experimentalmente a toxicidade de uma amostra. Os organismos-teste são expostos a uma amostra e assim se determina uma resposta biológica, permitindo uma avaliação do efeito tóxico daquela amostra. Desta forma, biomonitoramento, é a observação direta dos organismos vivos autóctones de um determinado ecossistema, e estudo de sua evolução sob os efeitos da poluição. As alterações observadas durante um certo período de tempo, servem como indicadores de evolução do ecossistema em estado de maior ou menor contaminação. A toxicidade de substâncias químicas e resíduos deve ser determinada experimentalmente, usando ensaios biológicos, utilizando organismos vivos em laboratório. Esta é a melhor solução para obter diretamente dados de “primeira mão”, sobre os efeitos tóxicos de um produto e poder compará-lo com outros produtos (RIBÓ, 1992).

O teste de toxicidade é o método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios em organismos vivos, manifestados em toxicidade aguda e crônica. Efeito agudo é causado por agentes químicos aos organismos-teste, que manifesta-se rápida e severamente. Geralmente este efeito ocorre após curto período de exposição. No caso do efeito crônico, este normalmente manifesta-se após dias ou anos, dependendo do ciclo vital da espécie utilizada para o estudo. Esse efeito ocorre, em geral, após um prolongado período de exposição (CETESB, 1988).

2.6. Mutagenicidade

Uma mutação é uma alteração na informação contida no material genético que é propagada através das subsequentes gerações de células ou indivíduos. Mutações surgem espontaneamente ou podem ser induzidas por uma variedade de agentes físicos e químicos e podem ocorrer tanto em células somáticas como em germinativas. Estas alterações podem ser expressas por alterações na estrutura de proteínas que podem levar para alterações, ou exclusão de atividades enzimáticas. Apesar das diferentes espécies de metabolismo, a reparação do DNA e outros processos fisiológicos que afetam a indução de mutações por químicos, ocorre uma universalização do DNA como material genético, proporcionando uma razoável utilização de diversos testes com bactérias, insetos, células de mamíferos em cultura para prognosticar a mutagenicidade intrínseca dos produtos químicos. Adicional suporte para o uso em sistemas não humanos é provido pela observação que químicos causadores de efeitos genéticos em uma espécie-teste, frequentemente causam efeitos similares em outras espécies ou sistemas. Alterações no conteúdo ou combinação de

informações no DNA pode ocorrer em diversas formas e níveis, partindo desde de uma mudança em um único nucleotídeo dentro de um códon, para mudanças no número de cromossomos. As mutações nos genes são alterações na sequência de nucleotídeos. Ela pode ocorrer por substituição de base (onde uma base no DNA é substituída por outra), ou ainda a adição ou deleção de uma ou mais bases, alterando a sequência de bases no DNA, alterando a estrutura de leitura no RNA- mutação "frameshift". As mutações também podem ser cromossomal (estrutura do cromossoma) e no genoma (alterações no número de cromossomas no genoma). (OECD-Guidelines on Genetic Toxicology).

A célula eucariótica apresenta o sistema enzimático citocromo P-450, um dos mais complexos metabólicos, capaz de catalisar a ativação de pró-mutagênicos. Atua, principalmente, com a função de defesa dos organismos, degradando, fisiologicamente, substâncias químicas estranhas ao metabolismo celular. Também tem sido considerado importante o seu papel na desintoxicação de substâncias estranhas à célula, como os poluentes ambientais, perigosos em decorrência de sua potencialidade tóxica. Entretanto, as células bacterianas são deficientes em certos sistemas enzimáticos (citocromo P-450, por exemplo). Tais deficiências podem ser compensadas pelo uso de um sistema de indução, associado aos ensaios com organismos procarióticos, constituído de homogenato microsomal obtido a partir de fígados de rato, previamente tratado com agente indutor enzimático (MARON e AMES, 1983). Desta forma torna-se possível mimetizar a ativação *in vivo* do composto teste. Em alguns casos o sistema de metabolização pode inativar compostos mutagênicos tanto enzimaticamente como por ligações ao acaso entre espécies moleculares dos compostos com estas enzimas microsomais, tornando-os inativos ou menos ativos (KAMRA et al., 1983; VALENT, 1990).

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

Neste estudo foram avaliadas amostras de sulfato de alumínio férrico líquido (ecotoxicidade e potencial mutagênico) e filtrado do lodo da estação de tratamento de água (ecotoxicidade). O sulfato de alumínio adquirido para o tratamento da água chega a estação, em solução a 25% base anidra, transportado em caminhões com reservatórios especiais para o acondicionamento do produto e dispositivos para a entrada e saída da solução. Para a utilização desta solução ocorre uma diluição a 10% no tanque de armazenamento e posteriormente a 5% para o emprego no tratamento de água. A dosagem utilizada é alterada de acordo com as condições da água (partículas sólidas, algas presentes), mas geralmente é de aproximadamente 7,8 ppm na base anidra do produto. No resíduo do lodo do tratamento de água, filtrado a vácuo, está presente o equivalente a 2,85 ppm de sulfato de alumínio (base anidra).

3.2 Amostragem

As coletas das amostras foram realizadas com frascos de polietileno com capacidade de 500 ml para o sulfato de alumínio férrico e de 2.000 ml para o resíduo do tratamento de água. As amostras do resíduo foram filtradas a vácuo. Para os testes com

sulfato de alumínio, após a análise da densidade e concentração, todos os ensaios foram referenciados como sulfato de alumínio base anidra.

3.3. Teste de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia dubia*

O gênero *Ceriodaphnia* é um microcrustáceo encontrado em inúmeros ecossistemas aquáticos. A espécie *Ceriodaphnia dubia* tem uma ampla distribuição geográfica, inclusive no Estuário da Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul. Sua reprodução é partenogenética, ou seja, assexuada gerando somente fêmeas, em condições ambientais equilibradas. A utilização desta espécie para teste de toxicidade crônica é devido ao curto ciclo de vida, o que permite, num período de sete dias, obter-se três desovas, quando submetida ao teste. O método de avaliação da toxicidade crônica, consiste em expor fêmeas jovens, a várias concentrações da substância em estudo, durante um período em que ocorram três desovas (geração de jovens). Neste caso, o sulfato de alumínio férrico foi testado nas seguintes concentrações: 0,5 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,6 ; 3,25 e 6,5 ppm. O filtrado do resíduo da estação de tratamento de água, nas concentrações de: 0,7% ; 1,0% ; 1,5% ; 2,0% ; 3,0% e 4,2%. Ao final deste período se determina o número de jovens produzidos partenogeneticamente, por fêmea e o número de adultas sobreviventes. Com estes dados calcula-se o CENO (concentração de efeito não observado), ou seja, a maior concentração do agente tóxico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo, na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos-teste, num determinado período de exposição. O teste crônico deve ser iniciado com jovens (neonatas), com idade de no máximo oito horas. Estas jovens são colocados em béquer ou tubo de ensaio nas várias concentrações da solução-teste e o controle, sendo 10 réplicas para cada concentração, num volume de 15 ml por tubo. São mantidos sob controle: temperatura, fotoperíodo e alimento com suspensão algácea e uma ração balanceada. A cada troca de soluções, conta-se e registra-se a sobrevivência do adulto e o número de jovens. Para verificar a sensibilidade e a qualidade do ensaio, executa-se, na mesma condição, um teste controle, onde não se adiciona a substância que se avalia a toxicidade.

3.4. Teste de Toxicidade Aguda com *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia similis*

A *Daphnia similis* é um microcrustáceo de águas continentais, conhecida popularmente como pulga d'água, e é facilmente encontrada em vários ecossistemas aquáticos tais como: rios, represas, lagos, etc. A reprodução é partenogênica, isto é, assexuada. Os ovos são incubados na câmara embrionária e, após 3 a 4 dias em condições favoráveis, dá-se o nascimento somente de fêmeas que, após 5 a 9 dias se tornam adultas com as mesmas características da daphnia-mãe. Para a avaliação de toxicidade aguda do filtrado do resíduo do tratamento de água e sulfato de alumínio férrico (base anidra) utilizou-se o gênero *Ceriodaphnia*. *Daphnia similis* foi empregada como organismo-teste na avaliação aguda do filtrado do resíduo da estação de tratamento de água.

O método consiste na exposição de indivíduos jovens (6 a 24 horas de idade) obtidos de culturas mantidas sob controle em laboratório. Temperatura $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo controlado [16 h (luz), 8 h (escuro)], alimentação com suspensão algácea e ração balanceada. Para o filtrado do resíduo foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,7% ; 1,0% ; 1,5% ; 2,0% ; 3,0% e 4,2%. O sulfato de alumínio férrico foi testado nas concentrações de 0,5 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,6 ; 3,25 ; e 6,5 ppm. Assim, para cada concentração,

tem-se um total de 20 organismos, distribuídos em número de 5 em cada uma das 4 réplicas contendo 10 ml de solução-teste. O teste é incubado a temperatura igual ao das culturas, porém em ambiente escuro, por um período de 48 horas e no término desse período registra-se o número de organismos móveis e imóveis em cada tubo. Aqueles que não são capazes de nadar por um intervalo de 15 segundos são considerados imóveis. Qualquer modificação no comportamento dos organismos-teste deve ser registrada. Este procedimento permite determinar a concentração letal média-CE50 a 50 % dos organismos. Igualmente, executa-se um teste controle onde não se adiciona a substância em estudo.

3.5 Teste de Mutagenicidade-Sistema Mutatox com *Vibrio fischeri*

Alíquotas do reagente Mutatox re-hidratado são incubadas com diluições de amostras-teste em meio de cultura (com ou sem S-9). A luminosidade emitida da bactéria em controle-meio, controle-solvente, controle-positivo e diluições da amostra testada é medida no Microbics Model 500 Analyzer, depois de 16, 20 e 24 horas de incubação a 27°C. São detectados agentes genotóxicos, nas amostras que induzem o crescimento de níveis de luminescência de pelo menos duas vezes a média da leitura controle. Utiliza-se o reagente bacteriano liofilizado, especialmente selecionado da cepa mutante de *Vibrio fischeri*. Cada frasco de suspensão celular bacteriana deverá apresentar 1,1 ml de densidade celular após a hidratação com a Solução de Reconstituição Mutatox. O Reagente-Teste Mutatox, deve ser mantido a 20°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), hidratado com Solução de Reconstituição Mutatox a 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e usado imediatamente após a reconstituição.

A metodologia bem como a análise de resultados está descrito no Microbics Mutatox Manual.

4-RESULTADOS

Para o teste crônico, os dados foram reunidos e tabelados. Registrou-se o número de fêmeas sobreviventes e calculou-se o número de jovens produzidas por fêmea adulta. A esses dados aplicou-se o Teste Estatístico de Dunnett, que segue com uma comparação da média do efeito observado em cada concentração do produto-teste com a média do controle. Os resultados foram expressos em:

-CENO (concentração de efeito não observado): A maior concentração do agente tóxico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo, na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos-teste, num determinado período de exposição.

-CEO (concentração de efeito observado): A menor concentração de um agente tóxico que causa efeito deletério, estatisticamente significativo, na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos-teste, num determinado período de exposição.

-UT (unidade tóxica): unidade que exprime a transformação da relação inversa da toxicidade em relação direta, obtida através da equação: $100/\text{CENO}$.

Os resultados são aceitos quando a letalidade no controle não exceder a 20% das fêmeas adultas.

Para o teste de toxicidade aguda, com os dados de imobilidade obtidos no teste, determina-se a CE 50 (48 horas) e seu intervalo de confiança, através do método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber Analysis.

-CE 50 (48 horas):Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos-teste, num determinado período de exposição (48 horas).

O teste de Mutatox define como uma resposta positiva genotóxica, quando, pelo menos, duas diluições apresentem um valor de emissão luminosa duas vezes ou mais em relação à média dos valores do controle.

4.1 Ecotoxicidade do Sulfato de Alumínio Férrico (base anidra)

De acordo com os testes preliminares e definitivos realizados com diferentes amostras deste produto, constatou-se que:

Toxicidade Crônica	Toxicidade Aguda
CEO = 1,0 ppm	CE 50 = 1,0 ppm
CENO = 0,8 ppm	
UT = 125	UT = 100

*Organismo-teste: *Ceriodaphnia dubia*

4.2. Ecotoxicidade do Resíduo (filtrado) da Estação de Tratamento de Água

De acordo com os testes preliminares e definitivos realizados com as amostras, constatou-se que:

Toxicidade Crônica	Tox. Aguda c/ <i>C.dubia</i>	Tox. Aguda c/ <i>D.similis</i>
CEO = 4,2%	CE 50 = 3,55%	CE 50 = 4,2%
CENO = 3,0%		
UT = 33,33	UT = 28,17	UT = 23,81

Observou-se toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* quando a diluição do filtrado do lodo era de 4,2%. Ao se medir a concentração de alumínio nesse filtrado, e expressando-a como sulfato de alumínio base anidra, o resultado foi de 2,85 ppm. Essa concentração, trazida para as condições que conferiram toxicidade crônica à *C.dubia*, correspondeu a um valor de 0,12 ppm de sulfato de alumínio base anidra. Quanto ao CE50, com *Ceriodaphnia dubia*, equivale a 0,10 ppm e com *Daphnia similis* a 0,12 ppm.

No caso específico da Riocell, o processo de tratamento de água possui uma etapa de pré-cloração da água bruta que objetiva a esterilização para evitar problemas de crescimento microbológico na estação. São dosados 3 ppm de hipoclorito de sódio de forma a garantir um residual de 0,2 a 0,5 ppm de hipoclorito. Dessa forma, o filtrado do resíduo (lodo) da estação de tratamento de água tem toxicidade maior que a solução do sulfato de alumínio férrico em razão desse residual de hipoclorito. Devemos também recordar, que nesse líquido, o sulfato de alumínio já está presente numa forma variada de

compostos, cada qual apresentando efeitos biológicos distintos e não comparáveis ao sulfato de alumínio como tal.

De qualquer forma, esse filtrado mostra potencial de toxicidade. Recomenda-se que o lodo das estações de tratamento de água sejam igualmente tratados como efluentes. No caso da Riocell, o resíduo da estação de tratamento de água é destinado ao tratamento na estação de tratamento de efluentes.

4.3 Mutagenicidade do Sulfato de Alumínio Férrico (base anidra)

De acordo com os testes realizados, foram obtidos os seguintes resultados:

MUTAGENICIDADE-SULFATO DE ALUMÍNIO FÉRRICO (base anidra)			
Meio Mutatox Sem S-9			
ppm	16 h	20 h	24 h
1,09	negativo	negativo	negativo
2,19	negativo	positivo	positivo
4,38	negativo.	positivo	positivo
8,75	positivo	positivo	positivo
17,50	positivo	positivo	positivo
35,01	positivo	positivo	positivo
70,02	positivo	positivo	positivo
140,04	positivo	positivo	positivo

Observou-se que o sulfato de alumínio férrico (base anidra) apresenta potencial mutagênico, na cepa M169 da bactéria *Vibrio fischeri*, nas concentrações de 140,04 a 8,75 ppm, na leitura de 16 horas, no meio Mutatox sem enzima S-9 e nas concentrações de 140,04 a 2,19 ppm, nas leituras de 20 e 24 horas, nas mesmas condições. Quanto às mesmas concentrações, porém com a enzima S-9, não foi detectado potencial mutagênico com sulfato de alumínio férrico (base anidra).

5-CONCLUSÕES

O uso do sulfato de alumínio férrico é universalmente difundido como floculante em estações de tratamento de água. Como floculante eficaz, e possuindo íons alumínio que sabemos apresentaram efeitos biológicos, os resultados encontrados por essa pesquisa confirmam as previsões de que devemos estar atentos aos problemas toxicológicos que podem advir de um mal uso desse floculante.

Os efeitos crônicos e agudos com organismos testes ocorrem em concentrações próximas a 1 ppm base anidra. Sugere-se portanto, que as estações de tratamento de água evitem trabalhar com super-dosagens do floculante, que possam deixar residuais tóxicos elevados na água.

Fortunadamente, não foi observado potencial mutagênico quando testado em meio Mutatox com S-9, ou fração microssomal (enzima microssomal), presente em células eucarióticas.

6-AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Bahia Sul Celulose, na pessoa dos Senhores Luiz Juvêncio Cardoso Quaglia e Carlos Augusto Soares do Amaral Santos, pela colaboração prestada nas análises de mutagenicidade.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. Manutenção das culturas das espécies de *Ceriodaphnia dubia*. **Norma NBR 13373**.
- ABNT Teste de toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 13373**.
- AMES, B.N.; Durston, W.E.; E. Yamasaki; Lee, F.D.. "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection" **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 70, 2281-2285. 1973.
- APHA-American Public Health Association. Toxicity test methods for aquatic organisms. **In: Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 16th Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, DC., Part. 800, p.689-823. 1985.
- ASSUMPÇÃO, R.M.V.; Morita, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização, Preparação, Purificação**. Ed. Edgard Blücher Ltda., 627p. 1968.
- BABBITT, H.E.; Doland J.J.; Cleasby J.L. Abastecimento de água. MEC Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1973.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciência e Cultura**, 42 (374):271-7, 1990.
- BERTOLETTI, E. et alli. A precisão de testes de toxicidade com *Daphnia*. **Ambiente**, São Paulo, v.6, n.1, p.55-9, 1992.
- BERTOLETTI, E. et alli. Laboratório. Manual de Laboratório. PROCOP - **Programa de Controle de Poluição e Programa de Assistência Técnica**, s1., 15.022, P.1-10, 1988.
- CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento do Meio Ambiente. Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição. São Paulo **CETESB**, 140p. 1989.

- CETESB. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: **CETESB**, 17p.(Série Manuais, set.1990) 1990.
- FACCHIN,J.M.J.;Bringhenti M.L.; Oliveira L.R.de. Projeto de uma estação de tratamento de águas.(**Curso de Especialização**)-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.1994.
- GALLARDO, V.R.B. Teste de toxicidade aguda e crônica e teste genotóxico utilizados para o controle de efluentes e resíduos da Riocell. (**Riocell,Relatório Técnico**).
- GALLARDO, V.R.B. Características e dados biológicos dos gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia* - Organismos utilizados em teste de toxicidade aguda e crônica. Guaíba - RS.,8p.(**Riocell, Relatório Técnico**). 1992.
- HENRIQUES,J.A.P.;Valsa,J. de O.; Gomes,R.A.. Utilização de testes com microrganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: PINTO, S.O. de C. (ed.). **Genética molecular de microrganismos**. São Paulo Manole.p.330-350.1987.
- HOUK,V.S."The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review" - **Mutation Research**, 277.p.91-138.1992.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. 2 ed.Brasília,**IBAMA**. 351p. 1990.
- IPT-Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Celulose e Papel. **Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**.São Paulo .559p.1988.
- MARON,D.M.;Ames,B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam,v.113,p.173-215.1983.
- MICROBICS CORPORATION.**Microbics Mutatox Manual** Versão 29 de abril de 1993.
- MICROBICS CORPORATION. The mode of action of genotoxic agents in the restoration of light in the Mutatox System. 8 p. 1993.
- QUILLARDET, P.; Hofnung, M. The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests. **Mutation Research**, Amsterdam, v.205,p. 107-118. 1988.
- RAND, G.M.; Petrocelli, J.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Hemisphere Publishing Corporation, 666p. 1985.
- RIOCELL S.A. **Curso de Tratamento de Água**.Guaíba.S.d.
- ROLLA,H.C. Avaliação de testes para determinação da atividade mutagênica e/ou potencialmente oncogênica em sedimentos de efluentes industriais. **Dissertação**

(mestrado) - Faculdade de Agronomia, curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, UFRGS,1995.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati, 161p. 1985.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Salmonella Statistic Assay (**Environmental Monitoring Systems Laboratory, EPA - Software Versão 2.3** Abril de 1988.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fourth edition. Cincinnati, Ohio 293 p. 1991.

VARGAS,V.M.F. Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais. Porto Alegre. UFRGS.237p.**Tese de Doutorado em Ciências.**1992.