

# Avaliação Ecotoxicológica e da Genotoxicidade de Produtos Químicos Frequentemente Utilizados nos Processos de Cozimento e Branqueamento de Celulose Kraft.

Luciane Stenzel\*  
Celso Foelkel\*  
Vera R. B. Gallardo\*

\*Riocell S.A., Guaíba, RS, Brasil

Luiz Quaglia

Bahia Sul Celulose S.A., Mucuri, BA, Brasil

## SINOPSE

Os objetivos deste estudo foram a avaliação ecotoxicológica e de genotoxicidade de dez produtos químicos frequentemente utilizados nos processos de cozimento e branqueamento de indústrias de celulose Kraft. Para a avaliação de toxicidade crônica, foram realizados testes com microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados quanto à genotoxicidade, foram obtidos através do Sistema Mutatox, com e sem ativação metabólica, utilizando a bactéria *Vibrio fischeri* como organismo-ensaio. Observou-se uma acentuada toxicidade crônica do dióxido de cloro e hipoclorito de sódio frente aos demais produtos. Nas menores concentrações testadas, 0,031 e 0,003 ppm respectivamente, apresentaram efeito observado. No dióxido de cloro também foi detectado potencial genotóxico referente a 4,44ppm no meio Mutatox, com ativação metabólica. O peróxido de hidrogênio, a partir da concentração de 0,03ppm, com S-9 e na concentração de 2,42ppm nas leituras de 16 e 20 horas, sem ativação enzimática, caracterizou-se por ser genotóxico. Isto significa que produtos químicos altamente oxidantes, independentemente de serem compostos de cloro ou de oxigênio, possuem capacidade de afetar a biologia de seres vivos, o que é perfeitamente entendível. Tanto dióxido de cloro como peróxido de hidrogênio são eficazes oxidantes, bactericidas e antissépticos. Como recomendação à indústria, sugere-se evitar residuais desses oxidantes em seus efluentes, além de cuidados especiais na utilização e manuseio industrial.

**Palavras-chave:** produtos químicos, genotoxicidade, Mutatox, *Vibrio fischeri*, bioensaios de toxicidade, *Ceriodaphnia dubia*.

## 1-INTRODUÇÃO

A indústria de celulose e papel vem se adequando rapidamente às crescentes demandas por medidas de proteção ambiental. Essa indústria tem como matéria-prima, a madeira, está formada de fibras e também pela lignina que age como ligante. Para a separação destas fibras, unidas por forças coesivas, intermoleculares, é necessário despender uma certa quantidade de energia. Através do processo de polpação ocorre a separação destas fibras da madeira, mediante a utilização de energia em processos químicos e/ou mecânicos. Esta separação é conseguida pela dissolução ou fragmentação da lamela média, composta de lignina e de material péctico. O processo de polpação tipo Kraft, o mais comum, tem como agentes ativos de cozimento o hidróxido de sódio e o sulfeto de

Trabalho apresentado no 31º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, realizado em São Paulo – SP – Brasil, de 19 a 23 de outubro de 1998.

sódio. A aplicação sequencial dos reagentes de branqueamento, conjugada a extrações e lavagens intermediárias, permite a obtenção de pastas celulósicas branqueadas. Existem vários reagentes que podem ser empregados, o número de combinações é amplo e variado. A seleção de uma sequência de branqueamento é determinada, além de outros fatores, pela matéria-prima utilizada, o processo de polpação e a finalidade da pasta celulósica.

O presente estudo visou conhecer a toxicidade crônica e genotoxicidade, presente ou não, em reagentes químicos utilizados e/ou gerados nas reações dos processos de polpação, deslignificação e branqueamento da celulose. Os reagentes químicos selecionados para este estudo foram: hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, clorato de sódio, cloreto de sódio, carbonato de sódio, sulfato de magnésio, silicato de sódio, DTPA, e EDTA. Todos são produtos encontrados nos processos de cozimento, branqueamento e plantas químicas

Anteriormente, com dezesseis destes produtos foram realizados testes de toxicidade aguda com microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 e com a bactéria *Photobacterium phosphoreum* Cohn, 1878 - Sistema MICROTOX (Foelkel et alii, 1996). Para complementar esta avaliação ecotoxicológica foram aplicados métodos já padronizados nacional e internacionalmente e que são utilizados para avaliar os efluentes hídricos. Através da avaliação ecotoxicológica dos reagentes químicos foi possível detectar o nível de toxicidade crônica utilizando-se como organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*. Estes testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa-Centro Tecnológico, Riocell S.A.

Para avaliação da genotoxicidade foi utilizado o Teste Mutatox, este 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 uma cepa mutante (*Vibrio fischeri*, cepa M169), de bactéria luminescente, para detectar efeitos genotóxicos. Esta etapa do presente trabalho, foi realizada nos laboratórios da Bahia-Sul Celulose S.A..

## 2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.Considerações sobre Produtos Químicos

Um grande número de químicos de diversas estruturas moleculares e propriedades físicas tem sido relacionado com a indução de tumores em animais-teste e muitos destes são carcinogênicos ao homem. O mecanismo de indução destes tumores continua desconhecido. Todavia, evidências mostram que a iniciação do câncer humano envolve eventos mutacionais. ( McCann, J. and Ames, B.N. citados por Ulitzur, S.)

Segundo Devoret citado por Ulitzur, um químico é um carcinogênico em potencial se este é um agente danificador de DNA (genotóxico) e não simplesmente porque causa mutações. A correlação entre a ação mutagênica na bactéria e a carcinogênese em mamíferos (homem) é primeiramente manifestada através de uma mutação indireta, o qual resulta de um DNA danificado. Vê-se, portanto, a crucial importância da avaliação destes produtos tão necessários à produção nas diversas áreas industriais.

Durante o branqueamento com oxigênio ocorrem simultaneamente a deslignificação e a degradação de carboidratos. Esta degradação pode ser minimizada por protetores dos carboidratos, tendo os compostos de magnésio um efeito especialmente favorável a esse respeito (Loras, 1980 citado por Gonçalves, 1997).

O **sulfato de magnésio** é consumido, empregado nos mais diversos propósitos. Na indústria farmacêutica, química e também na fabricação de papéis e fertilizantes. Quanto a toxicidade aguda-TDLo (menor dose tóxica divulgada) observada em homens, o sulfato de magnésio ocasiona uma debilidade muscular e também efeitos tóxicos nos pulmões, tórax, atingindo a ação respiratória. Isto com uma administração oral de 428 mg/kg (Japanese Journal of Toxicology, 1989 citado no Tomes Plus, 1997). Nas mulheres, a TDLo observada com uma administração intraespinhal, dose de 20 mg/kg, ocasionou efeitos tóxicos no nervo periférico com sensação de uma branda paralisia (South African Medical Journal, 1985 citado no Tomes Plus, 1997). A ação catártica (purgativa) também observada, resulta do fato, que o sulfato de magnésio não é absorvido pelo trato intestinal, deste modo retém água suficiente dentro do lúmen do intestino, podendo ocasionar uma ação desidratativa

(Osol & Hoover et al, 1975 citados no Tomes Plus, 1997). O mecanismo exato de ação depressiva no sistema nervoso central, não é totalmente conhecido. Todavia com excesso de magnésio pode surgir um decréscimo de acetilcolina liberada pelo impulso do nervo motor (American Society of Hospital Pharmacists, 1984 citados no Tomes Plus, 1997).

O **peróxido de hidrogênio** é utilizado em estágios finais de seqüências de branqueamento, com o objetivo de obter um alto grau de alvura (D'Almeida, 1981 citado por Goncalves, 1997). Hoje tem se tornado reagente importante tanto em seqüências ECF como TCF de branqueamento de celulose.

Algumas das formas de utilização do peróxido de hidrogênio são: na indústria de plásticos, branqueamento de seda, cabelos, palha, ossos, gelatina, farinha, na indústria têxtil, produtos farmacêuticos, em indústrias de celulose, no tratamento de água, entre outros. Para humanos, concentrações acima de 10% podem ser consideradas potencialmente, muito tóxicas. Quanto a bioacumulação, não se espera que o peróxido de hidrogênio seja acumulativo na cadeia alimentar (OHM/TADS, 1996 citados no Tomes Plus, 1997). Aplicadas no tecido, soluções de peróxido de hidrogênio têm pouca penetrabilidade. Quando o peróxido de hidrogênio entra em contato com a catalase, uma enzima encontrada no sangue e na maioria dos tecidos, é rapidamente decomposto em oxigênio e água, principalmente em ferimentos e mucos (American Medical Association, 1992 citados no Tomes Plus, 1997). A atividade farmacológica da droga, depende da liberação do oxigênio originado, o qual tem um forte efeito oxidante que destrói alguns microrganismos e altera quimicamente algumas substâncias orgânicas (American Society of Hospital Pharmacists, 1993 citado no Tomes Plus, 1997). Quanto a genotoxicidade do peróxido de hidrogênio, foi detectado em linfócitos humanos e de ratos, danos ao DNA sob uma concentração de 30%. Inibição do DNA, em fibroblastos e células pulmonares de humanos, sob 90% de peróxido de hidrogênio (RTECS, 1991). Mutações foram observadas em bactérias, células pulmonares de mamíferos e células embrionárias de humanos, com concentrações de 30% de peróxido de hidrogênio (RTECS, 1991). Aberrações cromossômicas, através de análise citogenética em células de embriões humanos, foram detectadas (RTECS, 1991).

Muitas vezes o peróxido de hidrogênio é utilizado junto com o sulfato de magnésio. Esse é aplicado ao estágio com peróxido de hidrogênio e age como um estabilizador, provavelmente formando flocos insolúveis que adsorvem ou precipitam íons de transição indesejáveis (Peróxidos do Brasil, s.d. citado por Goncalves, 1997).

O tratamento de pasta com quelantes é importante para a estabilização das soluções de peróxido e ozônio, pois contribuem para a inativação dos íons metálicos, que catalisam a decomposição dos mesmos, provocando um maior consumo destes reagentes sem aumento de alvura (Peróxidos do Brasil s.d. citado por Goncalves, 1997). Para evitar essa ação negativa dos íons metálicos, principalmente do ferro e do manganês, é usado um agente sequestrante, sendo o mais indicado o **DTPA** (pentassódio dietileno triamina pentacetato). Uma rápida decomposição do peróxido sugere a necessidade do uso do DTPA, e a quantidade necessária está relacionada com a análise dos metais presentes (Peróxidos do Brasil s.d. citado por Goncalves, 1997).

O **EDTA**, é comumente utilizado nas mais diversas áreas industriais. Como antioxidante, em alimentos. Como agente quelante no aquecimento e resfriamento da água; na fabricação de detergentes para uso doméstico e têxtil; no processo de polpação da madeira; industrialização de produtos farmacêuticos e cosméticos. Também é usado como componente de anticoagulantes sanguíneos, sendo neste caso por sua propriedade de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular. É importante citar que alguns efeitos na reprodução e efeitos genéticos, observados em ratos, são caracterizados por anormalidades no desenvolvimento dos olhos, ouvidos e demais órgãos localizados na região crânio-facial. Efeitos nos sistemas músculo-esquelético, cardiovascular, urogenital e respiratório, entre outros, problemas na fertilidade também são evidenciados (Toxicology and Applied Pharmacology, 1977 citado no Tomes Plus, 1997). Quanto aos efeitos genéticos, foram observados: danos ao DNA em linfócitos (Mutation Research, 1988), mutações em células somáticas (Mutagenesis, 1988), troca de cromátides irmãs, etc (Shigaku Ondotology, 1987). O EDTA influencia a ruptura cromossômica, por agentes mutagenos. Quando combinado com mutagenos químicos, aumenta a frequência de aberrações induzidas por estes

agentes. Ele também interfere com o processo de reparação do DNA, após a exposição ao mutageno (Mutation Research, 1983). O EDTA não é metabolizado pelo corpo humano, sendo rapidamente excretado pela urina. Cerca de 50% do EDTA administrado, é excretado dentro de uma hora e 90%, em sete horas. Significativamente ele não ultrapassa a membrana celular, permanecendo no fluido extracelular até ser eliminado pela urina (International Labour Office, 1983 citado no Tomes Plus, 1997). Porém este composto, causa um aumento da permeabilidade da membrana celular, ocasionando uma maior absorção de outros produtos (bases, ácidos e compostos neutros) (Casarett and Doull's Toxicology, 1986 citados no Tomes Plus, 1997). Talvez o EDTA altere a permeabilidade, pelo aumento do tamanho dos poros da membrana ou por dilatação dos espaços entre as células epiteliais (Fundamentals of Drug Metabolism and Disposition, 1971 citado no Tomes Plus, 1997).

O **hipoclorito de sódio** é utilizado no processo de branqueamento de indústrias de celulose e papel; na purificação da água; na medicina; como desinfetante de piscinas; como reagente; como germicida e fungicida (Sax & Lewis, 1987; Budavari, 1989 citados no Tomes Plus, 1997). Quanto à sintomatologia em humanos após a exposição ao hipoclorito de sódio, podemos citar: dor e inflamação na boca, faringe, esôfago e estômago; erosão das membranas das mucosas; vômitos; hemorragias; colapso circulatório; cianose; respiração superficial; delírios; coma; edema de glote; perfuração do esôfago e estômago, entre outros. Quanto a bioacumulação, o hipoclorito de sódio não apresenta um significativo potencial de bioacumulação. Porém, é extremamente tóxico para peixes. Alguns dos efeitos genéticos observados, em células de embriões humanos foi referente a troca das cromátides irmãs, com uma dose de 149 ppm (Chromosome, 1980). Em *Salmonella typhimurium*, a mutação ocorre com uma dose de 1mg/placa, em meio sem S-9 (Applied Methods in Oncology, 1980 citados no Tomes Plus, 1997). O mecanismo toxicológico ocorre porque o hipoclorito de sódio, quando entra em contato com as membranas das mucosas, como solução acidífera, produz ácido hipocloroso, gerando irritação, podendo ser corrosivo.

Industrialmente, o **carbonato de sódio** pode ser empregado para os mais diversos fins. Na manufatura de vidros e sabões, branqueamento de linho ou algodão, como controlador de pH, em fotografia, ácido farmacêutico, reagente em química analítica, intermediário em reações termoquímicas, desinfetante, etc. Alguns dos efeitos clínicos observados, podem ser causados pela ingestão de grandes quantidades do produto, causando corrosão do trato gastrointestinal, vômitos, diarreia, colapso circulatório e até mesmo a morte. Carbonato de sódio é alcalino o suficiente para danificar o epitélio da córnea, quando ocorrer exposição ocular. Em soluções concentradas, pode causar opacidade permanente da córnea. Efeitos crônicos observados foram enfermidades respiratórias, na pele e gastrointestinais (Kamaldinova et al., 1987 citado no Tomes Plus, 1997).

O **silicato de sódio** quando foi testado em ratos, apresentou LD50 (dose letal a 50% dos organismos expostos) equivalente a 1153mg/kg, com administração oral. Os efeitos tóxicos neste mesmo organismo-ensaio, foram no trato gastrointestinal, tais como: ulceração no estômago, duodeno e intestino (Toxicology Letters, 1986 citado no Tomes Plus, 1997). Os efeitos em humanos, quanto à irritabilidade para a pele, foram severas. Observadas com administração de 250 mg/24h (Toxicology and Applied Pharmacology, 1975 citado no Tomes Plus, 1997).

**Cloreto de sódio** é naturalmente originário do cloro e sódio. É usado na medicina, no tratamento de depleção do volume extracelular, desidratação e depleção de sódio. É também utilizado na indústria em vários processos químicos. Quanto à absorção do cloreto de sódio, pelo organismo de mamíferos, podemos caracterizá-lo como facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal. A glicose, facilita esta absorção (Reynolds, 1989 citado no Tomes Plus, 1997). A excreção, ocorre nos rins, sendo eliminada via glomérulos e após reabsorvido no túbulo proximal (Hey & Hickling, 1982 citado no Tomes Plus, 1997). Junto com a água, o cloreto de sódio se constitui no básico meio interno dos mamíferos. Um colaborador para estabilidade extracelular e deste modo para a osmolaridade intracelular. O íon sódio é distribuído exclusivamente no compartimento extracelular. Referindo-se ao mecanismo de toxicologia, a intoxicação aguda pelo sal, produz danos ao sistema nervoso central, quando células nervosas começam a desidratar, seguindo a troca aguda osmótica do fluido intracelular para o compartimento extracelular (Habbick et al., 1984 citado no Tomes Plus, 1997).

O **dióxido de cloro** tem sido empregado para a maioria das pastas celulósicas em que a

alvura elevada e boas propriedades físico-mecânicas são exigidas. A quantidade empregada deste alvejante dependerá do tipo de madeira, do tipo de pasta celulósica e do teor de lignina da pasta não branqueada. O dióxido de cloro é um ótimo branqueador que oxida a lignina e as resinas até substâncias incolores com pouca degradação dos carboidratos (D'Almeida, 1981 citado por Gonçalves, 1997).

Dióxido de cloro é usado no branqueamento da celulose, papel, farinha, couros, óleos e gorduras; na purificação da água, controle do gosto e odor da água. É também usado como um agente oxidante, bactericida e antisséptico (Budavari, 1989 citado no Tomes Plus, 1997). O gás dióxido de cloro causa severas irritações respiratórias e nos olhos. Pode causar edema pulmonar. O mecanismo de ação consiste quando o gás cloro é convertido para HCl e oxigênio ativo no parênquima pulmonar, ocasionando danos ao tecido pela ação direta do oxigênio (Tomes Plus, 1997).

Os cloratos são fortes agentes oxidantes. A toxicidade do **clorato de sódio** origina-se da forte reação oxidante nos tecidos do corpo, particularmente uma ação destrutiva nas células vermelhas do sangue (Clayton & Clayton, 1981 citado no Tomes Plus, 1997). Agente oxidante e branqueador, especialmente para fazer dióxido de cloro para indústria de celulose e papel, ou processados para fazer percloratos. Cloratos são principalmente tóxicos por ingestão e inalação. São nefrotóxicos; causam hemólise no sangue; causam hipotensão e danos ao músculo cardíaco. Problemas neurológicos tais como: letargia e coma têm sido registrados (Tomes Plus, 1997).

## 2.2. Sistema Mutatox para Avaliação de Genotoxicidade

O Sistema Mutatox 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 teste utiliza cepas mutantes de *Vibrio fischeri* que tiveram sua habilidade de produzir luz afetada pela repressão do óperon responsável pela luminescência. Estudos mostram que o sistema luminescente da *V. fischeri* é organizado em dois divergentes transcritos óperons (PL e P<sup>R</sup>) 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 teste bacteriano luminescente, mede a habilidade de amostras-teste, no caso produtos químicos, de restaurar a luminescência, provavelmente pela liberação deste óperon que estava reprimido. A desrepressão pode ocorrer por vários mecanismos (Ulitzur, 1986). O primeiro destes é uma inativação pela direta interação com o repressor. Isto poderia ser o resultado de uma tóxica ligação, alterando o repressor e interferindo com o local de ligação do gene luciferase. Agentes alquilantes, determinadas proteínas e luz UV são agentes os quais atuam nestes mecanismos. Outro, seria uma interferência com a síntese do repressor. A inibição da síntese do repressor pode resultar da interação com agentes que atuam no DNA ou RNA. Estes agentes incluem: Agentes DNA-intercalantes (químicos que são hábeis para inserir eles mesmos entre as bases da fita dupla de DNA, causando uma extensão no mesmo), agentes que danificam o DNA ou qualquer outro que pode afetar a expressão do gene (Ulitzur et al., 1980 citados por Elmore and Fitzgerald, 1990).

A resposta genotóxica é indicada quando o químico testado restaura o estado de luminescência na bactéria: o aumento do nível de luminosidade identifica a relativa genotoxicidade da amostra.

Mutatox é um sensível e rápido teste para caracterização da genotoxicidade de águas, efluentes, sedimentos e resíduos perigosos. 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).

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, S-9 mix, associado aos ensaios com organismos procarióticos, constituído de

homogenato microsomal obtido a partir de fígados de rato, previamente tratado com agente indutor enzimático. Assim, o teste é realizado com e sem ativação metabólica, que permite detectar tanto substâncias com ação direta sobre o DNA como monitorar a atividade positiva ou negativa dos metabolitos gerados pela biotransformação (Maron e Ames, 1983). Esta biotransformação é um processo que inclui reações de oxidação-redução e hidrólises, que podem ativar algumas substâncias a moléculas eletrofílicas reativas capazes de interagir com os sítios nucleofílicos do DNA provocando lesões (Rabello-Gay et al., 1991).

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 o 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).

### **2.3. 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. 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).

Recentemente, os testes de toxicidade de curta duração começaram a fazer parte das análises requisitadas para caracterizar um efluente líquido, sendo que tais testes são capazes de detectar os efeitos tóxicos resultantes das interações das substâncias presentes na amostra como um todo (Bertoletti et alii, 1992). Outros fatores muito significativos para a utilização dos testes de toxicidade são: os baixos custos de implantação; a relativa facilidade de execução; a confiabilidade nos resultados obtidos e um considerável número de organismos mundialmente padronizados.

Os testes de toxicidade podem ser definidos como o estudo dos efeitos de produtos químicos e de outros agentes como temperatura e pH, sobre os organismos aquáticos com especial ênfase nos efeitos prejudiciais (Rand & Petrocelli, 1985).

Estes testes 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 (CETESB, 1990).

### **2.4. Importância da Avaliação de Genotoxicidade**

Bioensaios genéticos tomam-se cada dia mais importantes para a identificação de compostos individuais ou misturas, que possam apresentar um potencial risco à saúde. Seus resultados são relevantes para a saúde humana uma vez que o alvo toxicológico é o DNA, o qual existe em todas as formas de vida celular. Assim, pode ser extrapolado que compostos que se mostram reativos com o DNA em uma espécie, tem o potencial de produzir similar efeito em outra espécie. Em geral, perturbações do material genético são deletérios para organismos e podem conduzir a conseqüências severas e irreversíveis à saúde. Efeitos à saúde humana, comumente associados com exposição a compostos genotóxicos incluem câncer, anomalias congênitas e doenças do coração (Houk, 1992).

Danos genéticos são mais precisamente definidos como sendo lesões específicas estruturais que ocorrem ao longo do DNA. Três maiores classificações de danos podem ser descritas: a) mutagênese, refere-se a mutação do gene ou mutação ponto, a qual são alterações na seqüência do DNA dentro do gene; b) clastogênese, a qual refere-se à alteração na estrutura do cromossomo, usualmente resultando em ganho, perda ou rearranjo de partes do cromossomo; e c) aneuploidia, a qual refere-se ao ganho ou perda de cromossomos intactos (Houk, 1992).

Mutação é uma alteração na informação contida no material genético que é propagada através das subseqüentes 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. Em geral, a grande maioria das mutações, espontâneas ou induzidas, são separadas pelos organismos. Outras células mutantes acabam morrendo, pois ficam deficientes metabolicamente. Somente muito poucas mutações acabam por resultar em danos graves ao organismo. A observação que químicos causadores de efeitos genéticos em uma espécie-teste, freqüentemente causam efeitos similares em outras espécies ou sistemas. (OECD-Guidelines on Genetic Toxicology), serve de base para os ensaios de mutagênese como o Mutatox.

### 3-MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

Neste estudo foram avaliadas amostras de dez produtos químicos utilizados nos processos de fabricação da celulose Kraft, quanto à ecotoxicidade crônica e genotoxicidade. Os produtos testados foram hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, clorato de sódio, cloreto de sódio, carbonato de sódio, sulfato de magnésio, silicato de sódio, DTPA e EDTA.

#### 3.2. Amostragens

As amostras dos produtos foram preparadas em diversas diluições nos Laboratórios de Soluções, de Pesquisa e de Meio Ambiente, do Centro Tecnológico - Riocell S.A., de acordo com "Manual de soluções, reagentes e solventes", da empresa.

#### 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). 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 colocadas 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 razão 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.

Para o presente estudo, os produtos químicos foram testados previamente para se conhecer as faixas de diluições mais adequadas. A partir daí, os ensaios definitivos foram realizados para as seguintes concentrações:

**Oxidantes:**

-Hipoclorito de Sódio -	0,003 / 0,006 / 0,012 / 0,025 / 0,05 / 0,1 ppm
-Dióxido de Cloro -	0,031 / 0,062 / 0,125 / 0,25 / 0,5 / 1 ppm
-Peróxido de Hidrogênio -	0,312 / 0,625 / 1,25 / 2,5 / 5 / 10 ppm
-Clorato de Sódio -	0,16 / 0,31 / 0,63 / 1,25 / 2,5 / 5 ppm

**Sais:**

-Cloreto de Sódio -	2,03 / 4,06 / 8,12 / 16,25 / 32,5 / 65 ppm
-Carbonato de Sódio -	0,47 / 0,93 / 1,87 / 3,75 / 7,5 ppm
-Sulfato de Magnésio -	0,28 / 0,57 / 1,14 / 2,28 / 4,55 / 9,1 ppm
-Silicato de Sódio -	0,35 / 0,70 / 1,4 / 2,81 / 5,63 / 11,25 ppm

**Quelantes:**

-DTPA -	0,375 / 0,75 / 1,5 / 3 / 6 ppm
-EDTA -	0,05 / 0,11 / 0,22 / 0,44 / 0,87 / 1,75 ppm

### 3.5 Teste de Genotoxicidade-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 (5°C), hidratado com Solução de Reconstituição Mutatox a 4°C (3°C) e usado imediatamente após a reconstituição.

A metodologia bem como a análise de resultados está descrito no Microbics Mutatox Manual. As seguintes concentrações foram avaliadas:

**Oxidantes:**

-Hipoclorito de Sódio -	4 / 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,063 / 0,031 / 0,016 / 0,008ppm
-Dióxido de Cloro -	142 / 71 / 35,5 / 17,75 / 8,88 / 4,44 / 2,22 / 1,11 / 0,55 / 0,28ppm
-Peróxido de Hidrogênio-	19,36 / 9,68 / 4,84 / 2,42 / 1,21 / 0,60 / 0,30 / 0,15 / 0,07 / 0,03ppm
-Clorato de Sódio -	2.400 / 1.200 / 600 / 300 / 150 / 75 / 37,5 / 18,75 / 9,375 / 4,68ppm

**Sais:**

-Cloreto de Sódio -	8.000 / 4.000 / 2.000 / 1.000 / 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,25 / 15,62ppm
-Carbonato de Sódio -	4.000 / 2.000 / 1.000 / 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8ppm
-Sulfato de Magnésio -	4.000 / 2.000 / 1.000 / 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8ppm
-Silicato de Sódio -	4.000 / 2.000 / 1.000 / 500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8ppm

**Quelantes:**

-DTPA -	250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8 / 3,9 / 1,95 / 0,975 / 0,488ppm
-EDTA -	500 / 250 / 125 / 62,5 / 31,2 / 15,6 / 7,8 / 3,9 / 1,95 / 0,975ppm

## 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:  $100/CENO$ .

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

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 Crônica dos Produtos Químicos Testados

De acordo com os testes preliminares e definitivos realizados com referidos produtos químicos testados, observam-se os resultados apresentados na Tabela 1:

**Tabela 1 - Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia dubia***

Produto Químico	CENO (ppm*)	CEO (ppm*)	UT
Cloreto de Sódio	4,06	8,12	24,63
Carbonato de Sódio	0,93	1,87	107,52
Sulfato de Magnésio	2,28	4,55	43,85
Silicato de Sódio	0,35	0,70	285,71
Hipoclorito de Sódio	-x-	0,003	-AT
Dióxido de Cloro	-x-	0,031	-AT
Peróxido de Hidrogênio	1,25	2,5	80
Clorato de Sódio	0,31	0,63	322,58
EDTA	0,22	0,44	454,54
DTPA	0,375	0,75	266,66

\*unidade de concentração: ppm

AT: altamente tóxico, mostrado efeito mesmo nas menores concentrações analisadas

Observou-se toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* acentuada quando foram testadas amostras de hipoclorito de sódio e dióxido de cloro. As menores concentrações testadas apresentaram efeito observado. Cloreto de sódio apresentou o menor grau de toxicidade crônica observada quando comparado aos demais produtos.

### 4.3. Genotoxicidade dos Produtos Químicos Testados

De acordo com os testes preliminares e definitivos realizados com referidos produtos químicos testados, foram encontrados os resultados da Tabela 2:

**Tabela 2 - Genotoxicidade com *Vibrio fischeri***

Produto Químico	com S-9	sem S-9
Cloreto de Sódio	negativo	negativo
Carbonato de Sódio	negativo	negativo
Sulfato de Magnésio	negativo	negativo
Silicato de Sódio	negativo	negativo
Hipoclorito de Sódio	negativo	negativo
Dióxido de Cloro	4,44ppm (16,20 e 24h)	negativo
Peróxido de Hidrogênio	0,03ppm (16,20 e 24h)	2,42ppm (16 e 20h)
Clorato de Sódio	negativo	negativo
EDTA	negativo	negativo
DTPA	negativo	negativo

Observou-se que dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio apresentaram potencial genotóxico. Peróxido de hidrogênio em todas concentrações testadas com fração microsomal S-9 evidenciou genotoxicidade, porém sem ativação metabólica o efeito genotóxico foi observado somente a partir de 2,42 ppm nas leituras de 16 e 20 horas. Após 24 horas foi possível verificar um efeito letal a partir de 0,60 ppm. Com o dióxido de cloro, foi detectado potencial genotóxico com a concentração de 4,44 ppm em todas as leituras, com ativação metabólica.

### 5-CONCLUSÕES

A toxicidade crônica foi bastante alta para os dois oxidantes clorados, o dióxido de cloro e o hipoclorito de sódio. É reconhecida a ação desses compostos como antissépticos poderosos. A genotoxicidade mais evidenciada do dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio com a conversão metabólica por ativação enzimática, pela fração S-9, provavelmente deve-se ao fato da ocorrência de uma biotransformação destes compostos, gerando assim metabolitos danosos e ativos geneticamente. Ou seja, esta biotransformação é um processo que inclui reações de oxi-reduções e hidrólises, que podem ativar ou liberar moléculas eletrofilicas capazes de interagir com o DNA, danificando-o. Isto significa que produtos químicos altamente oxidantes, independentemente de serem compostos de cloro ou de oxigênio, possuem capacidade de afetar a biologia de seres vivos, o que é perfeitamente entendível. Tanto dióxido de cloro como peróxido de hidrogênio são eficazes oxidantes, bactericidas e antissépticos. Como recomendação à indústria, sugere-se evitar residuais desses oxidantes em seus efluentes, além de cuidados especiais na utilização e manuseio industrial.

## 6-AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a secretária Marlene Silva Cardoso-Riocell S.A. pelo seu valioso e prestimoso auxílio na redação final deste trabalho e também aos técnicos responsáveis pelo preparo das soluções da Riocell; à Bahia Sul Celulose e aos funcionários da mesma, pela colaboração prestada nas análises de genotoxicidade.

## 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.
- ASSUMPTO, 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 biológico 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.
- ELMORE E. & Fitzgerald M.P. Evaluation of the bioluminescence assays as screens for genotoxic chemicals. **Mutation and the Environment**, Part D, p.379-387. 1990.
- FACCHIN, J.M.J.; Brighenti 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.

- GONCALVES, S.M. "Avaliação ecotoxicológica e mutagênica de efluentes gerados em processos de branqueamento de celulose". Porto Alegre. UFRGS. 74p. **Dissertação de Mestrado**, 1997.
- 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.
- JOHNSON B.T. Potential genotoxicity of sediments from the Great Lakes'. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**. USA. Vol.7 p.373-390.1992.
- 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.
- RABELLO-GAY, M.N.; Rodrigues, M.A. LA R.; Monteleone Neto, R. "Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação". **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.1, 246p, 1991.
- 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.
- ROSA J.; Pires E.C. "Propriedade mutagênica de efluentes de indústrias de celulose ou integradas - Uma revisão". **ABTCP**. Sao Paulo. 1994.
- ULITZUR S. "A bioluminescence test for genotoxic agents". **Trends in Analytical Chemistry**. vol.1. no.14.1982.
- 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.