



AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E MUTAGÊNICA DE EFLUENTES GERADOS NO BRANQUEAMENTO DA CELULOSE

ECOTOXICOLOGIC AND MUTAGENIC ASSESSMENT OF EFFLUENTS FROM PULP BLEACHING

Susana Maria Gonçalves
João A. Pêgas Henriques
Celso Foelkel

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

Português / Portuguese



AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA E MUTAGÊNICA DE EFLUENTES GERADOS NO BRANQUEAMENTO DA CELULOSE

Susana Maria Gonçalves, bióloga, mestre pela UFRGS, Porto Alegre, Brasil

João A. Pêgas Henriques, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Celso Foelkel, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil

RESUMO

Esse estudo avaliou a ecotoxicidade crônica (*Ceriodaphnia dubia*) e a atividade mutagênica (teste de Ames) de efluentes gerados no branqueamento de celulose kraft deslignificada com oxigênio obtida de eucalipto. Foram avaliados os efluentes de cada estágio de seqüência ECF (DEoD), de seqüência TCF (AZQP) e o efluente de estágio D/C com taxa de substituição de 50%.

Para os testes de toxicidade crônica, as amostras não mostraram problemas graves quanto às unidades tóxicas geradas, com exceção do efluente do estágio P-peroxidação. A avaliação da atividade mutagênica das amostras permitiu detectar agentes alvejantes que geram compostos indutores de mutagenicidade. A amostra do estágio D/C 50:50 apresentou resposta mutagênica para as duas linhagens testadas pelo teste de Ames, mostrando maior risco potencial ao ambiente. A seqüência de branqueamento ECF, mesmo apresentando índices de ecotoxicidade crônica mais altos, foi a mais recomendada, tanto em termos de qualidade do produto final, como em razão da menor atividade mutagênica dos efluentes dos estágios.

Palavras Chaves: Branqueamento, ecotoxicidade, mutagenicidade, efluentes

Abstract

ECOTOXICOLOGIC AND MUTAGENIC ASSESSMENT OF EFFLUENTS FROM PULP BLEACHING

This study has evaluated the chronic ecotoxicity (*Ceriodaphnia dubia*) and the mutagenic activity (Ames test) of effluents from eucalyptus pulp bleaching. The original pulp was an unbleached kraft pulp delignified with oxygen. The evaluations were performed for each of the stages of an ECF bleaching sequence (DEoD), a TCF sequence (AZQP) and an effluent generated in a D/C stage with 50% substitution rate. Chronic toxicity was proved not to be harmful, except for the peroxide stage effluent. The mutagenicity test indicated that potentially problematic compounds are generated in some of the bleaching stages. The effluent from D/C 50:50 had positive results for mutagenicity caused to both strains of microorganisms used in the Ames test. This stage was proved to show a potential risk to environment. The ECF bleaching sequence had the best performance, both in quality of the bleached pulp and in the lower mutagenic effects. However, the chronic ecotoxicity requires special attention, mainly considering the residuals of chlorine dioxide during bleaching.

Keywords: Pulp bleaching, ecotoxicity, mutagenicity, effluents

1. INTRODUÇÃO

Os efluentes gerados em processos de branqueamento de pastas celulósicas apresentam alta carga orgânica e produtos químicos capazes de conferir toxicidade aos mesmos. O processo de branqueamento consiste em uma seqüência de etapas, onde diversos produtos químicos são adicionados de forma a obter-se máximo ganho de alvura com mínimo consumo químico e mínimo efeito prejudicial à celulose. Com a crescente preocupação com o ambiente, tornaram-se necessárias novas pesquisas na área de processos de branqueamento de pastas celulósicas com a finalidade de encontrar adequadas combinações dos agentes branqueadores de forma a reduzir ainda mais os impactos ambientais.

A avaliação ecotoxicológica e mutagênica dos efluentes de cada etapa de diferentes combinações de estágios de branqueamento é algo que se faz importante para o perfeito entendimento das implicações ambientais desse processo e de buscar maneiras de minimizá-las. É possível, portanto, através do controle da toxicidade crônica e da atividade mutagênica do efluente líquido, compatibilizar seu lançamento com as características desejáveis dos corpos receptores, de tal forma que não cause efeitos tóxicos de natureza crônica ou mutagênica à biota aquática de uma determinada região, província ou área biogeográfica, principalmente quando seus principais usos se

referirem à proteção da fauna e flora e ao abastecimento e lazer da população.

Assim sendo, para este trabalho, seqüências de branqueamento foram previamente estabelecidas e os efluentes gerados em cada estágio dessas seqüências foram analisados quanto:

- à toxicidade crônica através dos ensaios crônicos utilizando-se o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*;
- à atividade mutagênica através do teste Salmonella/Microsoma (teste de Ames) usando-se a bactéria *Salmonella typhimurium*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processos de branqueamento de pastas celulósicas

O processo de branqueamento tem como objetivo obter, por processos econômicos e sem degradação dos carboidratos, uma pasta alva e de brancura estável. Para tornar a pasta celulósica branca, a lignina, resinas, materiais degradados, íons metálicos e outros, devem ser quimicamente modificados, a fim de reduzir suas características de absorção da luz, ou devem ser oxidados, reduzidos ou hidrolisados para tornarem-se solúveis em soluções aquosas, a fim de serem removidos da pasta.

O processo de branqueamento com multiestágios é mais usado atualmente por ser mais vantajoso do que o de único estágio, pois leva a um consumo menor de reagentes químicos, à obtenção de alvuras mais elevadas e uma pasta celulósica menos degradada (D'Almeida, 1978).

De acordo com Nelson *et al.* (1995), os processos de branqueamento de multiestágios podem também ocorrer sem a presença do cloro elementar ou totalmente livre de compostos de cloro, denominados respectivamente de ECF - (Elemental Chlorine Free) ou TCF - (Totally Chlorine Free).

2.2 Efluentes e ecotoxicidade

Os efluentes oriundos dos processos de branqueamento de pastas celulósicas estão recebendo atenção especial devido aos potenciais efeitos deletérios causados à biota dos corpos receptores (Houk, 1992; Rosa e Pires, 1994).

Os efluentes gerados nos processos de branqueamento convencionais das pastas celulósicas apresentam uma mistura complexa de lignina dissolvida, produtos da degradação da pasta, extrativos da madeira originários do processo de polpação e compostos clorados (Houk, 1992; Rolla e Henriques, 1996).

Rao *et al.* (1995) demonstraram que substâncias mutagênicas presentes em efluentes de branqueamento, adsorvidas através da resina XAD₄, mostraram resposta positiva significativa para a linhagem TA100, que detecta mutações por substituição de pares de base, de *Salmonella typhimurium*, sem sistema de ativação metabólica. Por outro lado, Ander *et al.* (1977) observaram que o efeito mutagênico deveria ser ocasionado por mais de um tipo ou grupo de compostos, uma vez que, a detecção da mutagenicidade foi positiva para duas diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* TA1535 (que detecta mutação por substituição de pares de base) e TA1537 (que detecta mutação por deslocamento do quadro de leitura).

O efluente gerado no estágio de deslignificação com oxigênio, apesar de ser escuro e rico em matéria orgânica, não apresenta problemas ao ambiente, já que uma de suas vantagens é poder ser totalmente recuperado dentro do sistema fabril (Soteland, 1988).

Com a utilização do cloro como agente alvejante, compostos organoclorados estão comumente presentes no licor residual. O efluente originado do estágio de cloração mostrou resposta mutagênica positiva para o teste Salmonella/Microsoma sempre que as amostras sofreram concentração orgânica com resinas XAD (Eriksson *et al.*, 1979; Boyle *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981; Rannug *et al.*, 1981; Donnini e Jankey, 1982; Donnini, 1983; Houk, 1992). Algumas alternativas são propostas na literatura para reduzir ou eliminar os efeitos genotóxicos do efluente do estágio com cloro elementar, entre estas, a substituição do cloro por dióxido de cloro para o primeiro estágio de branqueamento, tratamento externo com a elevação do pH para níveis alcalinos, troca iônica e tratamento biológico (Nazar e Rapson, 1980; Donnini, 1983; Houk, 1992; Rolla, 1995; Rolla e Henriques, 1996).

Pesquisas realizadas mostram que efluentes gerados no primeiro estágio de branqueamento, utilizando-se dióxido de cloro e cloro elementar, apresentaram atividade mutagênica. Entretanto, a mutagenicidade diminui linearmente, com o aumento da razão entre dióxido de cloro e cloro elementar (Eriksson *et al.*, 1979; Nazar e Rapson, 1980; Donnini, 1983; Rosa, 1997).

Em contraste à significativa atividade genotóxica demonstrada pelo efluente do estágio de cloração, a qual foi detectada em seu estado bruto sem a necessidade de técnicas de extração/concentração, os efluentes oriundos dos estágios da extração alcalina oxidativa e do dióxido de cloro, apresentaram-se em geral menos mutagênicos ou até mesmo sem atividade mutagênica para as concentrações normais do processo (Boyle *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981; Langi e Priha, 1988; Houk, 1992; Rolla, 1995; Rolla e Henriques, 1996). Durante o processo de extração alcalina predomina a ionização de grupos ácidos que foram formados durante o estágio de cloração como consequência da conversão dos grupos hidroxila e fenóis carboxilas para sais mais hidrofílicos, os quais facilitam a solubilização da lignina clorada. Assim sendo, em torno de 70% da ligação cloro-lignina é removida como cloreto pelo álcali, com simultânea liberação dos grupos fenólicos hidrofílicos (Sjöstrom, 1981; Kringstad e Lindström, 1984).

O peróxido de hidrogênio geralmente utilizado nos últimos estágios de branqueamento de seqüências TCF, confere aos efluentes atividade mutagênica e toxicidade crônica, devido à presença de residuais deste alvejante (Renberg, 1992; Nelson *et al.*, 1995).

Os efluentes produzidos através dos estágios com ozônio não apresentam unidade tóxica crônica elevada frente aos testes de toxicidade crônica, utilizando-se o organismo-ensaio *Ceriodaphnia dubia* (Nelson *et al.*, 1995). O ozônio produz um efluente isento de componentes acumulativos no sistema fabril, de forma que os efluentes decorrentes de um estágio com este alvejante podem ser reciclados no sistema químico de recuperação, não causando assim danos ao ambiente (Byrd Jr. *et al.*, 1993).

2.3 Avaliação da toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

O microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, pertencente à ordem *Cladocera*, é encontrado em inúmeros ecossistemas aquáticos e possui ampla distribuição geográfica. A reprodução desses organismos é partenogenética, ou seja, assexuada, gerando somente fêmeas, em condições ambientais equilibradas (CETESB, 1991).

O controle dos agentes tóxicos em efluentes líquidos é realizado através dos ensaios de toxicidade crônica utilizando-se os organismos-ensaio, *Ceriodaphnia dubia*, visando determinar os efeitos deletérios causados por estes efluentes. Para avaliação desses efeitos, os organismos são expostos a várias concentrações do efluente ou de outra substância por um período de aproximadamente sete dias, ou até obter-se três desovas (CETESB, 1991).

Estes ensaios são orientados a um objetivo prático bem definido, como o de subsidiar ações de controle da poluição, utilizando-se, preferencialmente, atividades biológicas tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, consideradas adequadas para estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade de seres vivos (Gallardo, 1993).

Para a análise dos dados utiliza-se o método estatístico "Dunnnett's Procedure", que determina a CENO e a CEO. CENO é a concentração de efeito deletério não observado, ou a maior concentração do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em sete dias de exposição nas condições do ensaio. CEO é a concentração de efeito deletério observado, ou a menor concentração do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em sete dias de exposição nas condições do ensaio (Rand e Petrocelli, 1985).

Os resultados dos ensaios da toxicidade crônica são expressos pela medida UT_C - Unidade Tóxica Crônica, obtida através da equação: $100/CENO$. Os resultados deste ensaio são aceitos quando a letalidade do controle não exceder a 20% (CETESB, 1991).

Os testes de toxicidade, também chamados de bioensaios, são aplicados com eficiência em efluentes oriundos de processos ECF (elemental chlorine free) e TCF (totally chlorine free), produzidos em laboratório (Nelson *et al.*, 1995). Entretanto, é recomendável, sempre que possível, avaliar o efeito de um determinado efluente com outros organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático, para que se possa estimar com maior segurança o impacto do efluente em um corpo receptor (Cabridenc apud Gherardi-Goldstein, 1990; EPA, 1991; Renberg, 1992; Cabridenc apud Gonçalves, 1994).

2.4 Teste Salmonella/Microsoma - Ensaio de mutação gênica reversa em linhagens de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

Os testes bacterianos são particularmente indicados para a triagem, detecção e identificação de agentes genotóxicos (Claxton *et al.*, 1987; Rabello-Gay *et al.*, 1991; Houk, 1992). Uma bateria de testes com diferentes linhagens pode fornecer informações sobre a natureza dos danos causados por agentes mutagênicos. O teste bacteriano mais utilizado e reconhecido mundialmente é o teste

Salmonella/Microsoma, devido a sua simplicidade, baixo custo e rapidez de execução (Quillardet e Hofnung, 1993).

O teste de mutagenicidade Salmonella/Microsoma foi desenvolvido por Ames e seus colaboradores (Ames *et al.*, 1975; Ames, 1979; Maron e Ames, 1983) e tem sido usado para identificar compostos mutagênicos e carcinogênicos (Claxton *et al.*, 1987; Rabello-Gay *et al.*, 1991; Houk, 1992). Este ensaio mede a indução de mutações reversas das linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina que reverterem para prototrofia (his^+) quando em presença de um agente mutagênico (Maron e Ames, 1983; Claxton *et al.*, 1987; Valent, 1990; Vargas, 1992; Rolla, 1995; Rolla e Henriques, 1996).

Estas linhagens não apresentam condições de crescer sem a presença de histidina, a menos que ocorra uma mutação reversa provocada pela amostra que cause a restauração da síntese do aminoácido em questão. A mutação reversa é medida pela contagem do número de colônias que crescem por placa após a exposição de determinada linhagem a um agente mutagênico. Para ser considerada mutagênica, uma substância deve aumentar significativamente o número de colônias revertentes, lembrando que cada linhagem apresenta uma taxa de reversão espontânea característica (Maron e Ames, 1983; Valent, 1990; Rabello-Gay *et al.*, 1991).

Várias linhagens podem ser empregadas para o teste de Ames. Entretanto, as linhagens mais utilizadas e recomendadas pela maioria dos autores, principalmente em estudos de triagem e monitoramento de amostras ambientais, são as linhagens TA98 (a qual detecta mutações que causam deslocamento no quadro de leitura) e TA100 (a qual detecta mutações por substituição de pares de bases), pois estas têm se mostrado eficientes na detecção de um grande número de compostos mutagênicos ambientais (Maron e Ames, 1983; Claxton *et al.*, 1987; Rabello-Gay *et al.*, 1991; CETESB, 1992; Houk, 1992; Vargas *et al.*, 1993; Rolla, 1995). Além disso, a utilização destas duas linhagens têm sido descrita na maioria dos trabalhos realizados em efluentes de indústria de papel e celulose (Houk, 1992).

O DNA é composto por duas cadeias helicoidais formadas por fosfatos, açúcares (pentoses), pares de bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas). No DNA, as purinas são adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas são timina (T) e citosina (C). Os únicos pares de bases possíveis ao nível de DNA, são AT e o CG (De Roberts e De Roberts, 1981).

As mutações por substituição de pares de bases ocorrem quando um par CG é trocado por AT e vice-versa, ou quando um par AT torna-se TC ou CG, sendo denominadas de transição e transversão respectivamente. Para as mutações por deslocamento do quadro de leitura (mutação *frameshift*), pares de bases são adicionados ou subtraídos do DNA (De Roberts e De Roberts, 1981).

As linhagens TA98 e TA100 apresentam outras mutações que aumentam suas capacidades de detectar substâncias mutagênicas: mutação *rfa*, a deleção do gene *uvrB* e o plasmídeo *pKM101* (ver item 3.7). As linhagens que apresentam este plasmídeo reparam incorretamente os danos no DNA, sendo mais suscetíveis para expressar as mutações (Maron e Ames, 1983; Claxton *et al.*, 1987; Houk, 1992).

2.5 Pró-mutágenos

Os pró-mutágenos ou mutágenos indiretos são substâncias que não têm ação direta sobre o DNA, mas após serem metabolizados no organismo, em especial de mamíferos, são convertidos em compostos eletrofílicos capazes de interagir com os centros nucleofílicos do DNA. Para tal, requerem uma conversão metabólica por ativação enzimática para tornarem-se geneticamente ativos. Como estas enzimas encontram-se ausentes na bactéria-teste, torna-se necessária a adição de uma mistura exógena para a ativação metabólica. Esta conversão metabólica dos pró-mutágenos, que pode ser detectável através do teste Salmonella/Microsoma, é realizada adicionando-se a fração S9 mix - sistema de metabolização exógena, a qual induz um conjunto de enzimas do sistema microsomal hepático (Maron e Ames, 1983). Assim, o teste é realizado com e sem ativação metabólica, que permite determinar tanto substâncias com ação direta sobre o material genético como monitorar a atividade positiva ou negativa dos metabólitos gerados pela biotransformação (Maron e Ames, 1983; Quillardet e Hofnung, 1988, 1993).

Esta biotransformação é um processo que inclui reações de oxi-reduções e hidrólises, que podem ativar algumas substâncias às moléculas eletrofílicas reativas capazes de interagir com os sítios nucleofílicos do DNA, provocando lesões (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

Nas células eucarióticas, o sistema enzimático citocromo P-450 está presente, catalisando a ativação de pró-mutagênicos, atuando na defesa dos organismos, degradando substâncias químicas inerentes ao metabolismo celular. Este sistema também é importante na detoxicação dos poluentes ambientais, perigosos em decorrência da sua potencialidade tóxica. Nas bactérias este sistema está ausente, sendo compensado pelo sistema de indução - S9 mix. Desta forma, é possível mimetizar a ativação *in vivo* do composto-teste (Maron e Ames, 1983).

Em alguns casos a fração S9 pode também ser responsável pela inativação total ou parcial dos mutágenos diretos, tanto enzimaticamente como por ligações ao acaso entre espécies moleculares dos compostos com essas enzimas microsossomais, tornando-os inativos ou menos ativos (Kamra *et al.*, 1983; Valent, 1990). Isto ocorre com alguns compostos clorados altamente mutagênicos, que tem sua mutagenicidade reduzida na presença desta fração (Maron e Ames, 1983; Houk, 1992; CETESB, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e armazenamento da pasta celulósica

Foram coletados, após o estágio de desdesignificação com oxigênio, no setor de branqueamento da área industrial da fábrica kraft de papel e celulose Riocell S.A., aproximadamente 124 kg de pasta celulósica úmida (produzida com 75% *Eucalyptus saligna* e 25% *Acacia mearnsii*). Após a coleta, a pasta foi lavada com água corrente, centrifugada (Secadora Centrífuga - Menegotti), acondicionada em sacos plásticos e armazenada em câmara fria a 4°C para posteriormente ser utilizada nos estágios de branqueamento deste estudo.

3.2 Amostras

Foram produzidos oito efluentes coletados no final de cada estágio de branqueamento, através da filtragem à vácuo da pasta celulósica, usando-se um funil Büchner com papel filtro qualitativo de 15,0 cm de diâmetro. As amostras foram acondicionadas em vidros de cor âmbar e armazenados em câmara fria a 4°C por dois meses, com o objetivo de obter-se a redução dos residuais dos agentes alvejantes utilizados nos processos de branqueamento. Os efluentes foram identificados com letras correspondentes ao agente branqueador ou ao tratamento utilizado nos estágios, como mostra a Tabela 1.

TABELA 1. Identificação dos efluentes.

PROCESSO DE BRANQUEAMENTO OU AGENTE BRANQUEADOR	IDENTIFICAÇÃO
Primeiro estágio com dióxido de cloro	D ₀
Extração alcalina oxidativa	E ₀
Segundo estágio com dióxido de cloro	D ₁
Estágio com dióxido de cloro e cloro elementar	D _C
Tratamento ácido	A
Estágio com ozônio	Z
Tratamento com quelante - DTPA	Q
Estágio com peróxido de hidrogênio	P

3.3 Processos de branqueamento

Os branqueamentos deste trabalho foram realizados nos Laboratórios do Centro Tecnológico da Riocell S/A. Cada estágio de branqueamento era realizado usando-se 300 g secas de pasta celulósica, sendo cada estágio de branqueamento realizado quantas vezes fossem necessárias para a obtenção do volume requerido das amostras (dez litros por amostra).

3.3.1 Seqüência de branqueamento - ECF (Elemental Chlorine Free)

Esta seqüência foi realizada com três estágios de branqueamento: D₀ - E₀ - D₁, conforme condições na Tabela 2.

3.3.2 Processo de branqueamento com apenas um estágio utilizando-se dióxido de cloro e cloro elementar - D_C

Neste estágio aplicaram-se na pasta celulósica não branqueada quantidades determinadas dos agentes branqueadores que foram utilizados em uma proporção de 50% de dióxido de cloro e 50% de cloro elementar - Cl₂, base cloro ativo (Tabela 3).

3.3.3 Seqüência - TCF (Totally Chlorine Free)

Esta seqüência de branqueamento foi realizada com quatro estágios: A - Z - Q - P, com condições apresentadas na Tabela 4.

TABELA 2. Condições de branqueamento da seqüência - ECF.

Estágios	Carga química aplicada (%) ^a		Consistência (%) ^d	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão O ₂ (kgf/cm ²)	pH inicial	pH final	Consumo total químicos (%) ^b
	ClO ₂	NaOH							
D ₀	1,49 (0,15x9,92) ^c	-	10	65	30	-	-	2,1	1,49
E ₀	-	1,60	10	90	60	3	12,5	12,0	-
D ₁	2,51	0,81	10	75	120	-	-	3,4	2,46

^a O valor da carga química aplicado foi expresso em relação ao peso seco da pasta celulósica utilizada no branqueamento.

^b Refere-se ao percentual da carga química consumida pela pasta celulósica ao término do estágio de branqueamento, base pasta celulósica seca.

^c Corresponde à carga química aplicada no primeiro estágio desta seqüência de branqueamento, sendo que a carga química a ser aplicada é calculada através do valor constante = 0,15 multiplicado pelo n° kappa (igual a 9,92).

^d Consistência: é definida como a relação percentual entre peso seco e peso úmido da pasta celulósica.

TABELA 3. Condições de branqueamento do estágio - D_C.

Estágio	Carga química aplicada (%) ^a		Consistência (%) ^d	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH final	Consumo total de químicos (%) ^b
	Cloro ativo (0,15x9,92) ^c	Relação ClO ₂ /Cl ₂					
D _C	1,49	50/50	10	65	30	2,4	1,49

^a O valor da carga química aplicado foi expresso em relação ao peso seco da pasta celulósica utilizada no branqueamento.

^b Refere-se ao percentual da carga química consumida pela pasta celulósica ao término do estágio de branqueamento, base pasta celulósica seca.

^c Corresponde à carga química aplicada no estágio de branqueamento, sendo que a carga química a ser aplicada é calculada através do valor constante = 0,15 multiplicado pelo n° kappa (igual a 9,92).

^d Consistência: é definida como a relação percentual entre peso seco e peso úmido da pasta celulósica.

TABELA 4. Condições de branqueamento da seqüência - TCF.

Estágios	Carga química aplicada (%) ^a						Consistência (%) ^d	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH inicial	pH final	Consumo total de químicos (%) ^b
	H ₂ SO ₄	O ₃	DTPA	H ₂ O ₂	MgSO ₄	NaOH						
A	1	-	-	-	-	-	10	40	15	-	2,7	-
Z	-	0,85	-	-	-	-	40 ^c	35	4	-	2,7	-
Q	-	-	0,15	-	-	-	10	60	90	8,0	-	-
P	-	-	-	1,25	0,5	1,39	10	75	120	11,5	-	0,55

^a O valor da carga química aplicado foi expresso em relação ao peso seco da pasta celulósica utilizada no branqueamento.

^b Refere-se ao percentual da carga química consumida pela pasta celulósica ao término do estágio de branqueamento, base pasta celulósica seca.

^d Consistência: é definida como a relação percentual entre peso seco e peso úmido da pasta celulósica.

^c A consistência foi trazida para 10% ao término do tempo do estágio.

3.4 Testes de caracterização da pasta celulósica

As celuloses tiveram sua qualidade avaliada conforme ensaios padronizados pela ISO, TAPPI e ABTCP. Foram analisados: viscosidade intrínseca, número kappa, alvura e reversão da alvura (número de cor posterior, ou NCP).

3.5 Avaliação da toxicidade crônica

Este ensaio é utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos crônicos, ou seja, efeitos deletérios causados aos organismos-ensaio, *Ceriodaphnia dubia*, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele (CETESB, 1991). Este ensaio consistiu-se na exposição de indivíduos jovens do gênero *Ceriodaphnia* a várias concentrações das amostras por um período de aproximadamente sete dias, onde foram avaliadas funções biológicas como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação.

A sensibilidade dos organismos-ensaio foi avaliada mensalmente através de um ensaio de toxicidade aguda, realizado conforme as normas da ABNT (1995), com a substância de referência, cloreto de sódio (NaCl). Esta avaliação consiste na exposição de jovens de *Ceriodaphnia dubia* de no máximo 8 horas de vida, em diluições pré-estabelecidas da substância de referência. Para cada diluição, preparavam-se quatro réplicas, colocando-se 10 ml da solução-teste em cada tubo de ensaio e cinco organismos jovens. Este teste permanecia por 48 horas em estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sem presença de luz e sem alimento. Após este período, era contado o número de organismos sobreviventes em cada tubo de ensaio.

Os organismos jovens para o ensaio foram obtidos a partir de fêmeas ovígeras separadas das culturas 4 a 8 horas antes do início do ensaio, utilizando-se para isso uma pipeta Pasteur com ponta arredondada. As fêmeas separadas foram colocadas em béqueres contendo água reconstituída e alimento. Foram utilizados nos ensaios, os organismos jovens nascidos com idade máxima de 8 horas.

Antes de se iniciar o ensaio, o pH da amostra era medido e anotado em uma planilha de controle. Para a realização dos ensaios de toxicidade crônica, todas as amostras tiveram seus pH corrigidos para 7,0 utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N e/ou ácido clorídrico (HCl) 0,1N. Quando necessário, filtrava-se a amostra com o mesmo procedimento descrito no item 3.2.

O ensaio foi executado em duas etapas:

- ensaio preliminar que permitiu estabelecer as concentrações próximas às que seriam utilizadas no ensaio definitivo;

- ensaio definitivo que permitiu determinar a CENO e a CEO, onde a CENO foi a concentração de efeito deletério não observado, e a CEO foi a concentração de efeito deletério observado.

No final dos ensaios definitivos, somavam-se os números totais de jovens reproduzidos por fêmea e os números de fêmeas adultas sobreviventes. Todos os indivíduos que morreram sem terem dado cria foram incluídos na contagem, considerando-se zero o número de jovens produzidos. Os resultados foram considerados válidos quando a mortalidade dos organismos adultos do controle não excedeu a 20%.

Para a análise dos dados foi utilizado o método estatístico "Dunnett's Procedure". O teste de Dunnett é utilizado para estimar os dados de reprodução nas concentrações em que a sobrevivência dos organismos-ensaio não tiver sido significativamente diferente do controle. Este teste inclui uma análise de variância (ANOVA), seguido de uma comparação do número médio de jovens produzidos em cada concentração com o número médio do controle, o que indicará a existência de diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre a reprodução obtida nas diferentes concentrações e no controle. Através dessa análise estatística, determina-se a CENO e a CEO.

Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica neste estudo estão expressos pela medida UT_C (Unidade Tóxica Crônica), onde a UT_C é obtida através da equação: $100/CENO$. A UT_C é expressa através de uma relação direta, ou seja, quanto menor o valor numérico menor a toxicidade crônica.

3.6 Preparo da amostra para o teste de Ames

Com o objetivo de detectar possíveis poluentes mutagênicos nos efluentes, foi utilizado neste trabalho o processo de extração e concentração através da adsorção em resina Amberlite XAD₄ (Rohm and Haas France S.A. - Laboratório Chauny, lote nº 62155 - D.E.: 25127).

3.7 Teste de Ames (Salmonella/Microsoma)

Este ensaio foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70, na Universidade de Berkeley, na Califórnia, sendo aperfeiçoado por Maron e Ames (1983).

O teste de Ames consiste em expor linhagens previamente escolhidas de *Salmonella typhimurium* a várias doses da amostra por um período de 48 horas em estufa a uma temperatura de 37°C. Este ensaio compreende um controle positivo onde é utilizada uma substância com atividade mutagênica conhecida, e um controle negativo onde é utilizado o solvente que usou-se na preparação da amostra. Ao final do teste são contados os números de colônias revertentes, sempre lembrando que cada linhagem apresenta uma taxa de reversão espontânea característica.

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens: TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* especialmente construídas e cedidas pelo Dr. Bruce Ames. As linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA98 e TA100, apresentam-se auxotróficas para o aminoácido histidina, sendo revertidas à prototrofia quando em contato com mutágenos (Ames *et al.*, 1975; Maron e Ames, 1983; Rolla, 1995; Rolla e Henriques, 1996).

A linhagem TA98 apresenta uma mutação no gene *his D3052* onde o alvo da mutação reversa é o par C-G. Esta linhagem é indicadora de mutagênicos que provocam defasagem do referencial de leitura do DNA.

A linhagem TA100 apresenta uma mutação no gene *his G46* onde o alvo da mutação reversa é o par C-G. Esta linhagem é indicadora de mutagênicos que causam mutações por substituição de pares de bases.

Em adição às diferentes mutações no operon da histidina, as linhagens apresentam características genéticas que aumentam as suas habilidades de detecção de substâncias mutagênicas (Maron e Ames 1983).

As linhagens apresentam:

- Mutação *rfa*: induz a perda parcial da barreira de lipossacarídeos da parede bacteriana que faz com que aumente a permeabilidade de moléculas grandes.

- Mutação *uvrB*: resulta na deleção de um gene responsável pelo sistema de reparo do DNA por excisão.

- Plasmídeo *pKM101*: este apresenta o gene *mucAB* que é responsável pelo aumento das mutagêneses espontânea e induzida, elevando a sensibilidade das linhagens a uma variedade de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos.

A taxa de mutação espontânea para a linhagem TA98 é de 25 a 75 revertentes por placa, e para a linhagem TA100 o número de revertentes por placa é de 75 a 225 (Maron e Ames, 1983).

A avaliação das características genéticas das linhagens foi realizada sempre que as características esperadas para cada cepa não se encontravam dentro dos padrões relatados na literatura por Maron e Ames (1983), ou no histórico de valores estabelecidos pelo laboratório GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade - Centro de Biotecnologia - UFRGS que se encontra no Apêndice 1.

- Requerimento de histidina: Para esta verificação foram usadas placas com meio mínimo com histidina 0,1M (0,1 ml) e biotina 0,5mM (0,1 ml) e placas-teste com meio mínimo e biotina 0,5mM (0,1 ml). A análise deste ensaio foi feita após a incubação a 37°C durante uma noite, onde não se deveria observar crescimento nas placas-teste.

- Mutação *rfa*: Este ensaio tem como objetivo confirmar a sensibilidade das cepas ao cristal violeta. Neste ensaio, 100 µl das linhagens foram semeadas em uma placa contendo NA - meio completo solidificado. Para as linhagens serem semeadas na placa se utilizou 2 ml de ágar de superfície aquecido em banho-maria a 45°C. No centro da placa colocou-se um pequeno disco de papel de filtro estéril onde foram adicionados 10 µl de cristal violeta de 1 mg/ml. A análise deste teste foi feita depois de 12 horas de incubação a uma temperatura de 37°C onde dever-se-ia observar uma zona de inibição do crescimento celular de cerca de 14 mm ao redor do disco de papel de filtro.

- Mutação *uvrB*: As linhagens que apresentam esta mutação são sensíveis à radiação ultravioleta sendo deficientes no processo de reparo por excisão do DNA. O ensaio se realizou utilizando as cepas que apresentavam esta mutação: TA98 e TA100, bem como uma linhagem que não apresentava esta mutação: TA102. Estas cepas foram semeadas em placas com meio NA. A irradiação com luz ultravioleta - UV (emitida por uma lâmpada Philips - HPW de mercúrio sob alta pressão - 15 W - germicida, apresentando a quase totalidade de emissão no comprimento de onda de 253,7 nm) foi realizada a uma distância de 33 cm por um período de 8 segundos apenas em uma metade da placa, sendo a outra metade da placa coberta. Após o período de incubação de 12 a 24 horas em incubadora a 37°C, dever-se-ia observar crescimento apenas na metade da placa que foi coberta onde encontravam-se as linhagens sensíveis à radiação ultravioleta.

- Presença do plasmídeo *pKM101*: Todas as linhagens portadoras deste plasmídeo apresentam resistência para ampicilina. Em uma placa contendo meio NA e ampicilina (750 µg/placa) semearam-se linhagens que continham o plasmídeo e uma linhagem sem o mesmo. Após a incubação a 37°C dever-se-ia observar o crescimento das linhagens portadoras do plasmídeo *pKM101*.

3.7.1 Sistema de ativação metabólica - fração microsomal S9 (S9-mix)

A S9 mix utilizada neste estudo foi adquirida do Molecular Toxicology Inc. (Moltox™), lote nº 0581, preparada a partir de fígados de ratos machos Sprague-Dawleys pré-tratados com Aroclor 1254 (mistura bifenil policlorinada - PCB) que induz um conjunto de enzimas do sistema microsomal hepático. A mistura foi preparada de acordo com a técnica descrita por Maron e Ames (1983), imediatamente antes de cada teste e mantida ao abrigo da luz. A mistura foi preparada com 4% de fração S9, 2% de MgCl₂-KCl (MgCl₂ 0,4M e KCl 1,6M), 0,5% de G-6-P 1M (glicose-6-fosfato, Sigma Chemical Company - St. Louis, EUA), 4% NADP bissódico 0,1M (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, Sigma Chemical Company - St. Louis, EUA), 50% de tampão fosfato de sódio 0,2M com pH 7,4 composto de 12% de di-hidrogênio fosfato de sódio monoidratado 0,2M e 88% de hidrogênio fosfato de sódio anidro 0,2M e 39,5% de água destilada estéril. O certificado do controle de qualidade da fração S9 encontra-se no Apêndice 2.

3.7.2 Procedimento do ensaio

Um dia anterior ao teste fazia-se a distribuição das placas para avaliação mutagênica utilizando-se meio mínimo, glicose e meio E, e colocava-se as cepas para crescer em banho-maria a 37°C sob sistema de aeração com 10 ml de NB e 100 l de ampicilina (solução 8 mg.ml⁻¹ em NaOH 0,02N). As linhagens utilizadas nos testes encontravam-se na fase exponencial, ou seja, em uma densidade de 1-2 x 10⁹ células.ml⁻¹. O tempo necessário para chegar à fase exponencial era de 10 horas, sendo este período controlado por um “timer” programável conectado a uma bomba de aeração. O crescimento das linhagens era medido por um espectrofotômetro (Espectrofotômetro modelo B395, Micronal), em uma faixa de absorbância entre 0,5 a 0,6 no comprimento de onda de 650 nm. Quando a leitura ocorria fora desta faixa, eram feitas diluições com meio NB até alcançar a turbidez esperada.

No dia do teste, nos tubos de ensaio estéreis, eram distribuídos os diferentes volumes das amostras e dos controles. Para os controles foi usado meio NB para controlar a toxicidade do solvente, DMSO 75/25 diluído com água destilada estéril como controle negativo, e o controle positivo onde usou-se substâncias mutagênicas. Para a cepa TA98 sem ativação metabólica utilizou-se como controle positivo 10 µl de 4-NQO - 4-óxido-1-nitroquinoleína (10 µl de uma solução 100 µg.ml⁻¹ em DMSO) e para a cepa TA100 sem ativação metabólica 10 µl de AZS - NaN₃ - azida sódica (10 µl de uma solução 1 mg.ml⁻¹ em água destilada estéril). Para os ensaios com S9 mix mantiveram-se os controles com meio NB e o controle DMSO 75/25, mudando apenas o controle positivo, onde usou-se para ambas as linhagens 10 µl de AFB1 – aflatoxina (10 µl de uma solução 1 mg.ml⁻¹ em DMSO).

Após a distribuição das amostras e dos controles nos tubos de ensaio em triplicata, adicionava-se aos mesmos 100 µl de cepa, sendo o conteúdo de cada tubo homogeneizado por um agitador tipo vortex. Logo após a homogeneização os tubos eram colocados em banho-maria a 37°C para incubação, onde permaneciam por 25 minutos para os testes sem ativação metabólica e 20 minutos para os testes com a presença de S9 mix. Ao término do período de incubação aos tubos-teste eram adicionados 2 ml de ágar de superfície previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 45°C e suplementado com 0,2 ml de uma solução de histidina e biotina, onde o conteúdo dos tubos-teste eram novamente homogeneizados no agitador e então plaqueados nas placas com meio mínimo - MM. Com o término do plaqueamento as placas eram colocadas em uma estufa a 37°C durante 48 horas. Após este período realizava-se a contagem do número de colônias de cada placa para posterior interpretação e avaliação dos resultados.

3.7.3 Interpretação e avaliação dos resultados

Os resultados dos testes foram obtidos através de dois métodos:

- Índice de mutagenicidade - IM: o IM representa a média do número de revertentes de cada dose utilizada no teste dividido pela média do número de revertentes do controle negativo do mesmo

teste. Uma amostra foi considerada positiva quando o IM foi igual ou maior que dois em pelo menos uma das doses testadas.

- Programa SALMONEL:

Este programa baseia-se em um fluxograma mostrado na Figura 1, onde os resultados das doses de uma amostra são analisados através de uma seqüência de etapas, buscando o modelo de regressão mais aceitável estatisticamente (Vargas *et al.*, 1993, 1995; Rolla e Henriques, 1996).

Este programa prevê que a relação dose-resposta, ou seja, a relação entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica, possa ser enquadrada em pelo menos quatro modelos de regressão: CONSTANTE $y=b$; LINEAR $y = bx+a$; LINTOX 1 (linear atenuado por toxicidade exponencial simples) $y = (bx+a) \cdot 1^{-T} X$; LINTOX 2 (linear atenuado por toxicidade exponencial elevada à segunda potência) $y = (ax + b) \cdot 2^{-T} X^2$; onde o (X) representa as doses testadas e (Y) a média do número de revertentes por placa.

Quando nenhum dos quatro modelos de regressão adaptou-se aos dados, o programa ainda utilizou como recurso, uma variação do modelo linear, tipo Bernstein (Bernstein *et al.*, 1982) que consiste em retirar uma ou mais doses, usando somente os resultados compatíveis com o modelo linear.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados dos testes de Salmonella/Microsossoma (testes de Ames) para os efluentes gerados nos estágios de branqueamento

Os critérios utilizados neste trabalho para a interpretação e avaliação dos resultados foram os seguintes:

- resultado: positivo (amostras mutagênicas) - quando a média de revertentes de pelo menos uma das doses do produto era no mínimo o dobro da média dos revertentes observada no controle negativo ($IM \geq 2$) e a avaliação estatística demonstrava resposta significativa ($P \leq 5\%$) na análise da variância e na correlação dose-resposta positiva ($P \leq 5\%$).

- resultado: indícios (amostras portadoras de indícios de mutagenicidade) - quando a média de revertentes em todas as doses do produto não atingia o dobro da observada no controle negativo ($IM < 2$), mas que apresentavam resposta significativa ($P \leq 5\%$) na análise da variância e na correlação dose-resposta positiva ($P \leq 5\%$), ou quando a média de revertentes de pelo menos uma das doses do produto era no mínimo o dobro da média dos revertentes observada no controle negativo ($IM \geq 2$) mas não apresentavam resposta significativa ($P \leq 5\%$) na análise da variância e na correlação dose-resposta positiva ($P \leq 5\%$).

- resultado: negativo (amostras não mutagênicas) - quando não foram satisfeitos os critérios descritos para os resultados acima.

Algumas amostras apresentaram citotoxicidade, ou seja, atividade tóxica. Esta atividade pode ser detectada pelo declínio no crescimento do tapete celular na placa de avaliação mutagênica e/ou pela queda da indução do número de revertentes abaixo dos níveis espontâneos esperados. A citotoxicidade ocasiona a morte celular, seja por um dano primário na molécula do DNA ou de um efeito tóxico mais generalizado.

4.1.1 Avaliação mutagênica da seqüência de branqueamento -ECF

4.1.1.1 Avaliação mutagênica do estágio - D₀

A amostra não apresentou atividade mutagênica frente às linhagens TA98 e TA100 em presença e ausência da ativação metabólica .

4.1.1.2 Avaliação mutagênica do estágio - E₀

O efluente E₀ mostra indícios de mutagenicidade frente à linhagem TA98 com a presença de ativação metabólica. Isto indica que esta amostra contém substâncias que causam defasagem no quadro de leitura *frameshift*. Para as linhagens TA98 e TA100 sem metabolização e para TA100 com sistema microsossoma a amostra E₀ não apresentou atividade mutagênica .

4.1.1.3 Avaliação mutagênica do estágio - D₁

O efluente D₁ expressou resposta positiva significativa para a linhagem TA100 na ausência de metabolização, o que indica a presença de mutágenos que causam substituição nos pares de bases. A mesma amostra apresentou resposta mutagênica significativa para as linhagens TA98 sem e com ativação metabólica. Este resultado indica a existência de compostos mutagênicos que causam mutações do tipo *frameshift* .

4.1.2 Avaliação mutagênica do estágio - D_c

O efluente oriundo deste estágio de branqueamento apresentou resposta positiva significativa frente às linhagens TA98 e TA100 com e sem sistema de metabolização. Estes resultados indicam que a amostra apresenta mutágenos que causam defasagem no quadro de leitura e substituição dos pares de base.

4.1.3 Avaliação mutagênica da seqüência - TCF

4.1.3.1 Avaliação mutagênica do estágio - A

O efluente A, apresentou resposta positiva significativa para a linhagem TA98 sem ativação metabólica, o que indica a presença de mutágenos que causam mutação do tipo *frameshift*. Para a mesma amostra, o teste de Ames detectou indícios de mutagenicidade para a linhagem testadora TA100 com metabolização. Isto indica presença de substâncias mutagênicas que causam substituição nos pares de base.

4.1.3.2 Avaliação mutagênica do estágio - Z

A amostra Z, oriunda deste estágio de branqueamento, mostrou resposta positiva significativa para as linhagens TA98 em presença e ausência do sistema microssomal, o que indica mutágenos que causam erro no quadro de leitura. Para a linhagem TA100 sem ativação metabólica a amostra apresentou resposta mutagênica significativa, indicando a presença de substâncias mutagênicas que causam substituição de pares de base, bem como indicou citotoxicidade na última dose.

4.1.3.3 Avaliação mutagênica do estágio - Q

Com a análise do efluente Q, verificou-se resposta significativa positiva para a linhagem TA98 com o sistema de metabolização, mostrando a presença de mutágenos que causam defasagem no quadro de leitura. Este resultado também indica que a atividade mutagênica pode ter sido levemente intensificada pelo sistema metabólico, bem como outros mutágenos indiretos terem sido ativados pela presença do sistema microssomal. A mesma amostra apresentou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98 sem sistema microssomal.

4.1.3.4 Avaliação mutagênica do estágio - P

O efluente oriundo deste estágio mostrou resposta significativa positiva para a linhagem TA98 sem ativação metabólica, o que indica a presença de mutágenos que causam mutação do tipo *frameshift*. Entretanto, a amostra não apresentou resposta significativa positiva para a mesma linhagem, com o sistema de metabolização. Este resultado indica que possivelmente os compostos mutagênicos foram inativados pelo sistema microssomal. Para a linhagem TA100 sem metabolização, o efluente P, expressou indícios de mutagenicidade, sugerindo a presença de agentes que causam mutações por defasagem no quadro de leitura, bem como apresentou efeito citotóxico para a última dose.

O modelo mais aceitável para as amostras, foi o modelo linear com sentido positivo nas amostras mutagênicas, bem como o modelo de Bernstein. O modelo Bernstein, consiste em retirar da análise uma mais doses, usando somente os resultados compatíveis com o modelo linear. Ainda observou-se a presença de curva dose-resposta com o modelo de regressão lintox-2.

A Tabela 5 apresenta os resultados da avaliação mutagênica das amostras, frente a todas as linhagens testadoras.

TABELA 5. Resultados da avaliação mutagênica dos efluentes quanto à presença de mutação induzida com as linhagens TA98 e TA100 em presença (+S9) e ausência (-S9) de sistema de ativação microssomal.

EFLUENTES	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
D ₀ - Dióxido de cloro	-	-	-	-
E ₀ - Extração alcalina oxidativa	-	±	-	-
D ₁ - Dióxido de cloro	+	+	+	-
D _c - Dióxido de cloro mais cloro elementar	+	+	+	+
A - Tratamento ácido	+	-	-	±
Z - Ozônio	+	+	+	-
Q - Quelante	±	+	-	-
P - Peróxido de hidrogênio	+	-	±	-

(+) mutagênica

(±) indícios de mutagenicidade

(-) não-mutagênica

4.2 Resultados da avaliação ecotoxicológica dos efluentes gerados nos estágios de branqueamento

Para a avaliação da toxicidade crônica, os resultados foram expressos através da unidade tóxica crônica - UT_C obtida através da equação: $100/CENO$, onde a CENO é a maior concentração da amostra que não causou efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos ensaio, em um determinado período de exposição.

4.2.1 Avaliação da toxicidade crônica para a seqüência - ECF

Analisando-se a Tabela 6, verifica-se uma maior toxicidade para o estágio E_0 frente ao teste de avaliação da toxicidade crônica com *C. dubia*. Para os outros estágios, onde se utilizou o mesmo agente alvejante, pode ser constatada uma maior ação tóxica para o estágio D_1 , indicando possivelmente a presença de residuais de dióxido de cloro no último estágio.

TABELA 6. Resultados da toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para a seqüência - ECF.

ESTÁGIOS	UT_C
D_0	16,7
E_0	100
D_1	33,3

4.2.2 Avaliação da toxicidade crônica para o estágio - D_C

Este efluente - D_C , mostrou um índice médio de toxicidade crônica para o ensaio biológico com o organismo *C. dubia*. A toxicidade crônica para o efluente do estágio D_C pode ser considerada eqüivalente à do estágio D_0 . Isso significa, do ponto de vista da toxicidade crônica, que a presença do dióxido de cloro neste estágio de branqueamento, não acarretou mudança na toxicidade. (Tabela 7)

TABELA 7. Resultados da toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o estágio - D_C .

ESTÁGIO	UT_C
D_C	13,3

4.2.3 Avaliação da toxicidade crônica para a seqüência - TCF

A ação tóxica maior para o ensaio com *C. dubia*, encontra-se no estágio onde foi utilizado peróxido de hidrogênio, já que este alvejante apresenta residuais, mesmo em dosagens pequenas. Para esta seqüência de branqueamento, o estágio onde utilizou-se ozônio, foi o estágio a apresentar menor toxicidade crônica (Tabela 8).

TABELA 8. Resultados da toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para a seqüência - TCF.

ESTÁGIOS	UT_C
A	33,3
Z	4,0
Q	33,3
P	3225,9

4.3 Resultados dos testes de caracterização das pastas celulósicas branqueadas

Analisando-se a Tabela 9, verifica-se uma boa qualidade do produto celulósico branqueado pela seqüência ECF.

TABELA 9. Resultados dos testes de caracterização da pasta celulósica da seqüência de branqueamento com dióxido de cloro - ECF.

Alvura, % ISO	89,5
Alvura revertida, %ISO	85,0
Viscosidade intrínseca, cm^3/g	789
NCP – número de cor posterior	0,6

Verificando-se a Tabela 10, constata-se que o resultados obtidos para a celulose TCF indicam uma boa qualidade para a pasta, à exceção da viscosidade, que era menor em relação à seqüência ECF.

TABELA 10. Resultados dos testes de caracterização da pasta celulósica da seqüência - TCF

Alvura, % ISO	89,2
Alvura revertida, % ISO	85,1
Viscosidade intrínseca, cm ³ /g	477
NCP – número de cor posterior	0,6

Analisando-se as Tabelas 9 e 10, verifica-se que os melhores resultados para os testes de caracterização da pasta celulósica são obtidos com os processos de branqueamento ECF. Esta afirmação baseia-se nos resultados encontrados na determinação da viscosidade intrínseca.

5. DISCUSSÃO

5.1 Atividade mutagênica da seqüência - ECF

O efluente do estágio de branqueamento D₀ não apresentou mutagenicidade frente às linhagens testadoras. A utilização do dióxido de cloro no primeiro estágio dos processos de branqueamento nem sempre confere aos efluentes atividade mutagênica, sendo esta avaliação confirmada na literatura (Eriksson *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981; Smeds e Holmbom, 1990). Entretanto, o efluente gerado, quando o mesmo agente alvejante é utilizado no último estágio de branqueamento, mostrou resposta positiva significativa para as linhagens TA98 e TA100. A atividade mutagênica encontrada no efluente deste estágio (D₁), pode eventualmente ser explicada pela presença de residuais de dióxido de cloro nos mesmos. Os residuais de dióxido de cloro, no último estágio, ocorrem pelo fato de se aplicar maior quantidade de carga química deste alvejante, com o objetivo de obter-se um maior ganho na alvura, inobstante, do teor de lignina ser menor. A adição do sistema de metabolização promoveu a redução da mutagenicidade para a linhagem TA100, indicando uma possível detoxicação metabólica dos mutágenos responsáveis por este efeito. Esta inativação ou diminuição da atividade mutagênica pelo sistema de metabolização foi observada por vários autores (Ander *et al.*, 1977; Björseth *et al.*, 1979; Höglund *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1981; Vargas *et al.*, 1993; Rolla, 1995; Rosa, 1997). Para Lee *et al.* (1981), os processos envolvidos neste efeito incluem degradação ou transformação das substâncias mutagênicas pelas enzimas hepáticas ou a adsorção dos mutágenos pelas proteínas do fígado contidas no sistema microsossomal. Houk (1992) sugere que o metabolismo *in vivo* pode influenciar na resposta mutagênica. É até possível que a causa dessa detoxificação seja o consumo do residual de dióxido de cloro pela solução orgânica de S9.

Pesquisas realizadas por Boyle *et al.* (1980) e Lee *et al.* (1981), demonstraram que os efluentes gerados nos estágios com extração alcalina, concentrados com resina tipo Amberlite XAD, não mostraram resposta mutagênica frente ao teste Salmonella/Microsossoma. Contudo, o efluente gerado na extração alcalina oxidativa deste estudo, apresentou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98 com ativação metabólica. Este resultado pode estar relacionado com a extração de lignina-clorada formada no estágio anterior - D₀ (Hardell e Souza, 1977). Segundo Kringstad e Lindström (1984) em torno de 70% desta ligação cloro-lignina é removida como cloreto pelo álcali com simultânea liberação dos grupos fenólicos hidrofílicos que são carregados ao efluente.

5.2 Atividade mutagênica do estágio – D_c

O efluente oriundo do estágio que utiliza dióxido de cloro e cloro elementar, apresentou resposta positiva significativa, frente a todas as linhagens testadoras. Nos estágios iniciais de branqueamento, onde se utiliza como agente alvejante o dióxido de cloro e cloro elementar, maiores quantidades de compostos organoclorados são gerados. A maior produção desses compostos, deve-se ao alto teor de lignina presente nos primeiros estágios, que reage com os agentes alvejantes resultando na formação dos compostos em questão. A presença dos organoclorados em quantidades elevadas pode conferir maior toxicidade e atividade mutagênica aos efluentes desses estágios iniciais. Estudos realizados demonstraram a diminuição linear da mutagenicidade com o aumento da razão entre o dióxido de cloro e o cloro elementar (Eriksson *et al.*, 1979; Nazar e Rapson, 1980; Donnini, 1983; Rosa, 1997). Avaliações mutagênicas positivas, frente às linhagens TA98 e TA100,

para efluentes deste estágio, indicam a presença de mutágenos que causam deslocamento no quadro de leitura e substituição de pares de base (Nazar e Rapson, 1980; Boyle *et al.*, 1980).

Mesmo considerando essas evidências, ainda existem muitas instalações industriais no mundo utilizando relação cloro/dióxido de cloro no primeiro estágio de branqueamento, com boa performance ambiental.

5. 3 Atividade mutagênica da seqüência – TCF

O efluente do estágio com tratamento ácido, mostrou resposta significativa positiva para a linhagem TA98 sem ativação metabólica e indícios de mutagenicidade para a TA100 com sistema de metabolização. O sistema de ativação metabólica pode inativar compostos mutagênicos tanto enzimaticamente como por ligações ao acaso entre espécies moleculares dos compostos com estas enzimas microssomais (Kamra *et al.*, 1983), ou ativar substâncias a moléculas eletrofílicas reativas que podem interagir com sítios nucleofílicos do DNA provocando lesões (Kappas e Alvares, 1975; Lee *et al.*, 1981).

A amostra referente ao estágio com ozônio apresentou resposta mutagênica negativa para a linhagem TA100 com sistema microssomal. Porém, mostrou resposta positiva significativa para a linhagem TA98 com e sem metabolização e para TA100 sem sistema de ativação metabólica. A detecção da mutagenicidade no efluente do estágio com ozônio, indicou a presença de compostos não clorados também causadores de efeito mutagênico. No entanto, o ozônio produz um efluente isento de compostos acumulativos no sistema fabril, sendo que todo o efluente oriundo deste estágio pode ser reciclado no sistema químico de recuperação não causando danos ao ambiente (Byrd Jr. *et al.*, 1993).

O efluente gerado no estágio com quelante - Q, indicou indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98 sem metabolização e resposta positiva significativa para a mesma linhagem com sistema de ativação metabólica. Esses resultados sugerem que a atividade mutagênica encontrada neste efluente seja decorrente do produto utilizado como quelante, ou proveniente das etapas de branqueamento que precedem a este estágio. Entretanto, o dietileno triamina, estrutura básica deste quelante, não é mutagênico para as linhagens TA98, TA100, TA1535 e TA1537 com e sem sistema microssomal. Este composto também não apresentou resposta mutagênica positiva para culturas de células eucarióticas *in vivo* (Richardson e Gangolli, 1993). Essas informações por analogia nos levam a propor que o quelante, ao qual se encontra na forma de sal sódico, não deveria apresentar atividade mutagênica. Portanto, sugere-se a avaliação deste produto frente ao teste Salmonella/Microssoma para confirma esta hipótese.

O efluente produzido no estágio de branqueamento com peróxido de hidrogênio, apresentou para a linhagem TA98 resposta mutagênica positiva e para a TA100 indícios de mutagenicidade, ambas sem metabolização. Estes resultados indicam a presença de compostos mutágenos que causam mutações do tipo *frameshift* e substituição dos pares de base. A utilização de um estágio com peróxido de hidrogênio, confere às seqüências TCF, uma resposta mutagênica significativa devido à presença de residuais de peróxido de hidrogênio presentes nos efluentes originados destes estágios (Nelson *et al.*, 1995). Convém ressaltar que em sistemas biológicos o peróxido de hidrogênio em presença de metais de transição (Fe^{++} ou Cu^{++}) produz a formação de radicais oxidrila (OH°), os quais induzem quebras no DNA e mutações, inclusive levando ao desenvolvimento de câncer (Meneghini, 1989; Crystal e Bast, 1991). Esta hipótese poderia ser testada, avaliando a resposta mutagênica do efluente gerado pelo estágio com peróxido com as linhagens TA102 e TA104 de *Salmonella typhimurium* (Maron e Ames, 1983).

Estas constatações são certamente de suma importância, uma vez que muito tem sido pesquisado para tentar eliminar o uso do cloro e seus derivados das seqüências de branqueamento, já que sua utilização está relacionada com a geração de mutágenos potenciais. Entretanto, não é apenas com a substituição do cloro por reagentes alternativos dos processos de branqueamento que será eliminada a potencialidade destes efluentes de causarem efeito mutagênico adverso, talvez devido ao fato, que a lignina continuará a ser oxidada por qualquer outro elemento, a qual provavelmente, seja uma das principais causas relacionadas à geração de compostos mutagênicos nos processos de branqueamento (Rosa, 1997). Há também que se considerar o efeito de outros constituintes da madeira, como os extrativos, muitos deles polifenóis de comprovada ação tóxica (Carlberg *et al.*, 1993).

5.4 Avaliação da toxicidade crônica da seqüência – ECF

Os resultados para os efluentes com dióxido de cloro para esta seqüência, mostram para o último estágio, uma toxicidade crônica maior. Este resultado ocorre devido a presença de residuais de dióxido de cloro nos últimos estágios. Este agente alvejante, é um eficiente oxidante e bactericida, e possui ação microbiológica eficaz para tratamento de água. O estágio correspondente à extração alcalina indicou uma unidade crônica relativamente elevada, indicando que esta amostra pode influenciar na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação dos organismos-ensaio *C. dubia*. Este resultado pode ser ocasionado em parte pela presença do cloreto de sódio formado pela reação entre a soda cáustica e o ácido clorídrico utilizado neste teste para neutralizar o pH. Com isso, aumenta a salinidade que poderá afetar o metabolismo dos organismos-ensaios (Gallardo, 1993). Há também que se considerar a extração de compostos tóxicos do interior da parede celular pelo estágio E₀.

5.5 Avaliação da toxicidade crônica do estágio – D_C

Esta amostra apresentou valor de unidade tóxica ligeiramente inferior à do estágio D₀. Isso indica que a presença do cloro elementar, substituindo parte do dióxido de cloro, não trouxe danos adicionais ao organismo-ensaio.

Análise com efluentes de indústrias kraft com branqueamento, demonstram que os efluentes provenientes do processo de cloração ou branqueamento ácido são os que apresentam maior toxicidade dentro das seqüências convencionais de branqueamento (CETESB, 1986).

5.6 Avaliação da toxicidade crônica para a seqüência – TCF

Para esta seqüência, o tratamento ácido e o estágio com quelante apresentaram uma unidade tóxica relativamente alta. No entanto, a amostra ozônio - Z, mostrou baixa toxicidade crônica. Trimble *et al.* (1993) demonstraram em estudos realizados em seqüências de branqueamento com ozônio que os efluentes do estágio com o agente branqueador em questão não apresenta unidade tóxica crônica elevada frente aos testes de toxicidade crônica. Para o efluente oriundo do estágio com peróxido de hidrogênio, a ação tóxica foi bastante alta, indicando residuais desse agente branqueador, bem como o seu alto poder desinfetante, mesmo quando usado em pequenas dosagens (Renberg, 1992; Nelson *et al.*, 1995).

O processo TCF apresentou-se com maior ação tóxica frente aos testes de bioensaios, sendo conveniente relatar, que esta afirmação não se baseia-se apenas para os testes com *C. dubia*. O fato do peróxido de hidrogênio apresentar residuais aos efluentes, é também, um fator relevante no alto valor da unidade tóxica. Os processos de branqueamento com ozônio podem apresentar baixos índices de toxicidade crônica em relação aos processos ECF, quando o estágio com peróxido de hidrogênio é substituído por dióxido de cloro (Nelson *et al.*, 1995; Trimble *et al.*, 1993; Chirat e Lachenal, 1993a,b). Com isso, a seqüência TCF passa a ECF. Já há consenso dentro do setor celulósico, que as seqüências TCF não são necessariamente menos impactantes no meio ambiente que as seqüências ECF.

6. CONCLUSÕES

A avaliação da atividade mutagênica para os efluentes oriundos de todos os estágios testados de branqueamento permitiu detectar agentes alvejantes que geram compostos com atividade mutagênica frente ao teste Salmonella/Microsoma.

As amostras de efluentes de seqüências de branqueamento ECF, TCF e estágio - D_C, extraída com resina XAD, apresentam compostos mutagênicos que causam deslocamento no quadro de leitura, bem como substituição de pares de base.

As duas seqüências de branqueamento ECF e TCF por apresentarem resposta positiva significativa para o teste Salmonella/Microsoma, indicam que , tanto compostos clorados como não clorados, estão relacionados com a atividade mutagênica observada.

A resposta mutagênica mostrada pelo efluente gerado pelo estágio - D_C, representa um risco potencial ao ambiente.

O efluente oriundo do estágio com ozônio, apresentou resposta mutagênica significativa, devendo por isto ser reciclado internamente no processo industrial , o que é uma de suas vantagens. Entretanto, para a toxicidade crônica, a mesma amostra não expressou ação tóxica.

A seqüência ECF que utiliza o dióxido de cloro, embora apresente índices de toxicidade relativamente altos, foi a mais recomendada, em termos de qualidade de produto final e dos efluentes, em relação à seqüência TCF estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. **Science**, Washington, v.204, p.587-593, 1979.
- AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, p. 347-364, 1975.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E.; KOLAR, M.C. *et al.* Studies on the mutagenic properties of bleaching effluents. **Svensk Papperstidning**, Stockholm, v.80, p.454-459, 1977.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Água - avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT, 1995. 14p.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J. *et al.* An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 97, p. 267-281, 1982.
- BJÖRSETH, A.; GEORGE, C.E.; MOLLER, M. Determination of halogenated organic compounds and mutagenicity testing of spent bleach liquors. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 11, p.197-211, 1979.
- BOYLE, V.J.; LARDNER, C.A.; FRANKLE, W.E. Evaluation of pulping and bleaching by-products for their mutagenic potential. **TAPPI**, Atlanta, v. 63, n.12. p. 59-62, 1980.
- BYRD Jr., MEDWICK, V.; GRATZL, S. *et al.* Branqueamento com ozônio-deslignificação e branqueamento de polpas químicas com ozônio: um retrospecto. **O Papel**, São Paulo, v. 54, n.2, p.40-47, 1993.
- CARLBERG, G.; HOEL, H.; AARSAND, R. *et al.* Chemical-biological characterization of discharges from integrated newsprint mills. In: INTERNATIONAL MECHANICAL PULPING CONFERENCE, 18., 1993, Oslo: TAPPI. p.418-427, 1993.
- CETESB. **Avaliação da toxicidade de efluentes de indústrias de papel e celulose**. São Paulo: PROCOP, 1986. 99p. (Relatório Técnico Final 23 - parte 2/2).
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Manual Técnico**. São Paulo: PROCOP, 1991. L5.022.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Bioensaios microbianos aplicados no controle de contaminantes tóxicos ambientais**. São Paulo: PROCOP, 1992. p.1-17.
- CHIRAT, C.; LACHENAL, D. Ozone bleaching is the key to alternative bleaching technology. In: INTERNATIONAL ENVIRONMENTAL SYMPOSIUM, 1993, Paris: [S.n.]. p.175-184, 1993a.
- CHIRAT, C.; LACHENAL, D. Non degrading TCF bleaching sequences including an ozone stage for hardwood and softwood kraft pulps, and characterization of the effluents. In: PULPING CONFERENCE, 1993, Atlanta: Pulping Conference. p. 717-723, 1993b.
- CLAXTON, L.D.; ALLEN, J.; AULETTA, A. *et al.* Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, p. 83-91, 1987.
- CRYSTAL, R.G.; BAST, A. Oxidants and antioxidants: pathophysiologic determinants and therapeutic agents. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p.3s-13s, 1991.
- D'ALMEIDA, M.L.O. **Branqueamento de pastas celulósicas**. São Paulo: Centro Técnico em Celulose e Papel, 1978. 66p. (Publicações Especiais, 3. IPT).
- De ROBERTS, E.D.P.; De ROBERTS, Jr., E.M.F. **Bases da biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. 332p.
- DONNINI, G.P. Bleach plant effluents: chemical control of some environmental problems. **Pulp & Paper Canada**, Quebec, v. 84, n.4, p.44-49, 1983.
- DONNINI, G.P.; JANKEY, S.G. Reduction of the environmental impact of pulp bleaching effluents. In: RESEARCH AND DEVELOPMENT DIVISION CONFERENCE, 1982, Asherville: TAPPI. p. 201-207, 1982.
- EPA. Guidelines for preparing environmental and waste samples for mutagenicity (AMES) testing. In: INTERIM PROCEDURES AND PANEL MEETING, 1985, Las Vegas: [EPA]. **Proceedings...** 1985, p.155. (EPA600/07/88-03-3136).
- EPA. **Methods for measuring acute toxicity of effluents and receiving waters freshwater and marine organisms**. Cincinnati, Ohio: [S.n.], 1991. Não paginada. (600/4-90-027).

- ERIKSSON, K.E.; KOLAR, M.-C.; KRINGSTAD, K. Studies on the mutagenic properties of bleaching effluents. Part 2. **Svensk Papperstidning**, Stockholm, n.4, p. 95-104, 1979.
- GALLARDO, V.R.B. **Aspectos ecotoxicológicos do impacto de uma fábrica de celulose kraft branqueada**. Guaíba: Riocell. 1993. 14p. (Relatório Técnico).
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. *et al.* **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. 17p.
- GONÇALVES, S.M. Avaliação ecotoxicológica de efluentes gerados em processos de branqueamento de celulose. Guaíba: RIOCELL, 1994. 31p. Trabalho não publicado.
- HARDELL, H.L.; SOUZA, F. de. Characterization of spent bleaching liquors. **Svensk Papperstidning**, Stockholm, n. 4, p.110-120, 1977.
- HÖGLUND, C.; ALLARD, A.-S.; NEILSON, A.H. *et al.* Is the mutagenic activity of bleach plant effluents persistent in the environment? **Svensk Papperstidning**, Stockholm, n.15, p.447-449, 1979.
- HOLMBOM, B.R.; VOSS, R.H.; MORTNER, R.D. *et al.* Isolation and identification of an Ames mutagenic compound present in kraft chlorination effluents. **TAPPI**, Atlanta, v. 64, n. 3, p.172-174, 1981.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 277, p.91-138, 1992.
- INTERNATIONAL FOR STANDARDIZATION ORGANIZATION. Paper and board: measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness). Genève: ISO, 1977. 4p. (ISO 2470: 1977).
- _____. Pulps: determination of Kappa number. Genève, 1981. 4p. (ISO 302: 1981).
- _____. Cellulose in dilute solutions: determination of limiting viscosity number. Part 1: Methods in Cupriethylene-diamine (CED) solution. Genève, 1981. 11p. (ISO 5351/1: 1981).
- KAMRA, O.P.; NESTMANN, E.R.; DOUGLAS, G.R. *et al.* Genotoxic activity of pulp mill effluent in *Salmonella* and *Saccharomyces cerevisiae* assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 118, p.269-276, 1983.
- KAPPAS, A.; ALVARES, P. How the liver metabolizes foreign substances. **Scientific American**, New York, v. 2332, n. 6, p.22-31, 1975.
- KRINGSTAD, K.P.; LINDSTRÖM, K. Spent liquors from pulp bleaching. **Environment Science Technology**, [S.I.], v. 18, n.8, p.236A-248A, 1984.
- LANGI, A.; PRIHA, M. Mutagenicity in pulp and paper mill effluent and in recipient. **Water Science Technology**, Oxford, v. 20, p.143-152, 1988.
- LEE, E.G.; MUELLER, J.C.; WALDEN, C.C. *et al.* Mutagenic properties of pulp mill effluents. **Pulp Paper of Canada**, Montreal, v. 82, p.69-77, 1981.
- LORAS, V. Bleaching. In: CASEY, J.P. **Pulp and paper: chemistry and chemical technology**. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1980. p. 633-734.
- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MENEZHINI, R. Oxigênio dá Câncer? **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 9, n. 54, p.10-11, 1989.
- NAZAR, A.M.; RAPSON, W.H. Elimination of the mutagenicity of bleach plant effluents. **Pulp & Paper Canada**, Quebec, v. 81, n.8, p. 75-82, 1980.
- NELSON, P.J.; STAUBER, J.L.; GUNTHORPE, L. *et al.* Toxicity testing of effluents from ECF and TCF bleaching of eucalypt kraft pulps. In: INTERNATIONAL NON-CHLORINE BLEACHING CONFERENCE, 1995, San Francisco: [S.n.]. p.5-1 a 5-2, 1995.
- 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.
- QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS chromotest: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 297, p. 235-279, 1993.
- 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, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. [S.I.]: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 666p.
- RANNUG, U.; JENSSEN, D.; RAMEL, C. Mutagenic effects of effluents from chlorine bleaching of pulp. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, New York, v. 7, p.33-47, 1981.
- RAO, S.S.; QUINN, B.A.; BURNISON, B.K. *et al.* Assessment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. **Chemosphere**, London, v. 31, n. 6, p.3553-3566, 1995.
- RENBERG, L. **The use of cost-effective chemical and biological tests for the estimation of the environmental impact of bleaching plant effluents**. In: ENVIRONMENTAL CONFERENCE, 1992, Sweden: [S.n.]. p.317-329, 1992.

- RICHARDSON, M.L.; GANGOLLI, S. **The dictionary of substances and their effects.** [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 1993. v. 3. 760p.
- RIOCELL. Branqueamento em laboratórios. Guaíba: Riocell, 1997. p.1-37. (Boletim Técnico, C.C. 8040. E.S. 07. Seq. 004. T.D.3).
- RIOCELL. Branqueamento em laboratórios. Guaíba: Riocell, 1997. p.1-37. (Boletim Técnico, C.C. 8040. E.S. 07. Seq. 004. T.D.3).
- ROLLA, H.C. **Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e do lodo proveniente da indústria de papel e celulose.** Porto Alegre, 1995. 114f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- ROLLA, H.C.; HENRIQUES, J.A.P. **Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo proveniente da indústria de papel e celulose.** In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 29., 1996, São Paulo: ABTCP. p. 485-495, 1996.
- ROSA, J. **Avaliação da atividade mutagênica de efluentes de indústria de celulose determinada por ensaio de curta duração com *Salmonella typhimurium*** - teste de Ames. São Carlos: USP, 1997. 215f. Dissertação (Mestrado em Concentração Hidráulica e Saneamento). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade de São Paulo/São Carlos, 1997.
- ROSA, J.; PIRES, E.C. 1994. **Propriedade mutagênica de efluentes de indústrias de celulose ou integradas: uma revisão.** In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 27., 1994, São Paulo: ABTCP. 15p., 1994.
- SJÖSTROM, E. **Wood chemistry.** Orlando: [S.n.], 1981. Não paginado. Caps. 3, 4, 8: Fundamentals and applications.
- SMEDS, A.; HOLMBOM, B. Formation and degradation of mutagens in kraft pulp mill water systems. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, Stockholm, n. 3, p. 142-147, 1990.
- SOTELAND, N. Pretreatment of pulps with chlorine before oxygen delignification. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, Stockholm, n. 3, p. 124-127, 1988.
- TRIMBLE, D.S.; REEVES, S.E.; McMAHON, S.E. *et al.* Environmental benefits of ozone-based bleaching. In: ENVIRONMENTAL CONFERENCE, 1993, Atlanta: TAPPI. p.583-590, 1993.
- VALENT, G.U. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames.** Campinas: UNICAMP, 134f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 1990.
- VARGAS, V.M.F. 1992. **Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais.** Porto Alegre, 1992. 237f. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.
- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 319, p. 31-45, 1993.
- VARGAS, V.M.F.; GUIDOBONO, R.R.; JORDÃO, C. *et al.* Genetic toxicology testing - use of two short term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 31-52, 1995.