



# Propriedade mutagênica de efluentes de indústrias de celulose ou integradas - uma revisão

Jean Rosa\*

Eduardo Cleto Pires\*

**A**s indústrias de celulose e papel caracterizam-se ambientalmente pela geração de grandes quantidades de resíduos sólidos, efluentes hídricos e emissões gasosas, oriundos das várias etapas do processo de produção e que são lançados ao meio ambiente tratados ou não.

Dentre estes, a geração de efluentes vem recebendo especial atenção nas últimas décadas e, certamente, continuará recebendo devido ao questionamento da compatibilidade destas descargas hídricas com o ambiente aquático (Smith, 1992) e, conseqüentemente, ao homem (Houk, 1992; Kringstad, 1981). Os processos de produção de celulose e papel consomem grandes volumes de água, captados principalmente de fontes superficiais, mas também de fontes subterrâneas, sendo que, em contrapartida, estes volumes são devolvidos aos corpos d'água receptores sob a forma de efluentes com expressiva carga poluente (Rosa, 1990).

Estes efluentes vêm sendo bastante estudados através dos anos e são bem conhecidos pelos efeitos deletérios causados à biota dos corpos d'água receptores. Os testes biológicos (bioensaios) e

análises de resíduos gerados pelas indústrias de celulose e papel são considerados uma das maiores fontes de dados na literatura de efluentes industriais. Devido às atividades das indústrias de celulose e papel descarregarem consideráveis volumes de resíduos, existe uma grande relação quanto ao potencial destes efluentes causarem efeitos deletérios à saúde humana (Houk, 1992).

A carga poluente destas águas residuárias apresentam, entre outras características, uma significativa demanda de oxigênio, expressa na forma de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a presença de cor, a geração de compostos organoclorados, além de compostos que exibem toxicidade aguda e crônica frente a diversas formas de vida (Smith, 1992; Nestmann, 1979; Kringstad, 1981; Höglund, 1979; Walden, 1977; Monter, 1990; Rosa, 1990; Voss, 1980).

A partir de 1977, em um estudo pioneiro realizado por Ander e col. (1977), demonstrou-se que entre as propriedades toxicológicas apresentadas por efluentes de uma indústria de celulose tipo *kraft* utilizando madeira de coníferas (*softwood*) como fonte de matéria-prima, efluentes dos estágios de branqueamento da polpa celulósica também eram capazes de causar efeitos mutagênicos indicados através dos testes de mutagenicidade de Ames.

Esta propriedade de causar mutagenicidade merece especial atenção e estudos, visto que as mutações no genoma de células somáticas e germinativas dos

indivíduos expostos podem aumentar a incidência de câncer e doenças hereditárias nas populações (Cetesb, 1993).

A demonstração de que estes resíduos industriais podem induzir efeitos genotóxicos em espécies aquáticas e terrestres (incluindo o homem) tem estimulado pesquisadores na área da toxicologia genética (Houk, 1992).

Áreas, onde a água é captada para fins de abastecimento público (potabilidade), merecem especial atenção em termos de genotoxicidade, uma vez que o tratamento convencional parece não ser suficiente para reduzir a mutagenicidade pré-existente na água bruta e a adição de cloro promover, ainda, a geração de compostos clorados com atividade mutagênica (Valent, 1993).

Efluentes das plantas de branqueamento contêm um amplo espectro de substâncias orgânicas. Uma vez que o cloro e o hipoclorito são usados como agentes de branqueamento, compostos organoclorados estão comumente presentes no licor residuário. A maioria destes compostos é mutagênico e altamente tóxico para a flora e fauna aquática (Ionescu, 1989; Langi e Priha, 1988).

A partir dos últimos anos, tem-se observado um considerável crescimento relacionando os possíveis impactos ambientais dos compostos organoclorados (Rosa, 1993). Alterações genéticas são um dos possíveis danos a longo prazo (*long-term*), as quais são de extrema importância, uma vez que existe um alto grau de correlação entre efeitos genéticos-mutagênicos e o desenvolvimento de

\* Jean Rosa e Eduardo Cleto Pires, Escola de Engenharia de São Carlos - USP - Departamento de Hidráulica e Saneamento - São Carlos - Brasil.

Trabalho apresentado no 27º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, realizado em São Paulo-SP-Brasil, de 7 a 11 de novembro de 1994.

câncer (Ames, 1978, apud Kringstad, 1981; Ramel, 1978, apud Ander, 1979; Valent, 1990). Além disso, compostos organoclorados, formados durante o branqueamento da pasta celulósica, têm sido, geralmente, considerado os mais importantes agentes mutagênicos em efluentes de indústrias de celulose (Langi e Priha, 1988).

Por mutagênese, define-se como sendo a indução de alterações hereditárias no material genético de um organismo. Estudos de câncer humano têm estabelecido que o evento mutagênico é muito provavelmente o fator iniciante em alguns tipos de câncer. A maioria dos químicos carcinógenos e a radiação são também mutagênicos. Portanto, a demonstração da atividade mutagênica sugere que a substância pode ser (mas não necessariamente precisa ser) carcinogênica (Apha, 1992).

Existem várias maneiras para se detectar a atividade mutagênica em amostras líquidas, mas a utilização de bioensaios com microrganismos tem sido uma das melhores alternativas nos programas de monitoramento, por serem estes testes sensíveis e confiáveis, podendo ser realizados em curto período de tempo, com um custo relativamente baixo (Houk, 1992; Valent, 1993). Entre os bioensaios microbianos, o Teste de Ames é o ensaio mais amplamente utilizado para esta finalidade (Houk, 1992; Valent, 1993; Apha, 1992; Maron e Ames, 1983) e é o teste proposto pela U.S. Environmental Protection Agency - EPA (1989) através do Clean Water Act (Valent, 1993).

O ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* vem sendo aplicado desde a década de 70 como ferramenta na detecção da mutagenicidade para vários tipos de aplicações, que vão desde a avaliação de grande número de compostos químicos puros ou fracionados, no monitoramento de populações expostas a agentes químicos, na detecção de mutágenos em urina de fumantes ou de animais tratados com mutágenos, até a avaliação de alimentos contaminados com agentes químicos. O Teste de Ames tem sido também amplamente aplicado na detecção da mutagenicidade de amostras ambientais (água, ar, efluentes industriais, lixiviados de resíduos sólidos, produtos fracionados etc.) (Cetesb, 1993).

O ensaio em *Salmonella*/microsossomo\* de células de mamífero, também denominado de teste de Ames, mede a poten-

cialidade de amostras-teste em induzir alterações genéticas (mutações) em linhagens especialmente desenvolvidas da bactéria *Salmonella typhimurium* (Houk, 1992; Cetesb, 1993; Maron e Ames, 1983; Claxton, 1987), onde são utilizados linhagens (cepas) não virulentas desta bactéria, especialmente desenvolvidas para tal.

Alguns dos químicos mutagênicos (os promutágenos) requerem uma conversão metabólica por ativação enzimática para vir a tornarem-se geneticamente ativos. Entretanto, estas enzimas encontram-se ausentes na bactéria-teste, sendo necessária a adição de uma mistura exógena para a ativação metabólica.

Esta conversão metabólica de promutágenos para mutágenos ativos, a qual pode vir a ser detectável através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella*, é realizada adicionando-se uma preparação de enzimas de mamíferos, denominada de fração S9, que consiste em homogenato de fígado de rato induzido com Aroclor 1254 (Houk, 1992; Apha, 1992; Cetesb, 1993; Maron e Ames, 1983; Claxton, 1987).

Bioensaios genéticos de curta duração (*short-term*) estão tornando-se cada vez mais um importante teste para a identificação de compostos individuais ou misturas ambientais complexas, a qual podem apresentar um potencial risco à saúde (Zeiger, E. 1982, apud Holmbom, 1984).

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 têm 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).

O teste com *Salmonella* tem sido utilizado para determinar a mutagenicidade de amostras ambientais complexas e misturas biológicas. Vários dos componentes mutagênicos dessas misturas têm sido caracterizados quimicamente. Um considerável número de mutágenos, inicialmente detectado pelo teste com *Salmonella*, tem se mostrado, subsequente-

te, ser carcinogênico em testes com animais (Maron e Ames, 1983).

O Teste de Ames é relativamente simples, sensível e de baixo custo, fornecendo resultados em dois dias, e apresentando boa correlação entre mutagenicidade/não mutagenicidade e carcinogenicidade/não carcinogenicidade para com ensaios em roedores. Desvantagens deste teste são que alguns mutágenos ativados em células de mamíferos podem não ser detectados, e a potência relativa dos mutágenos no teste pode não ser necessariamente correlacionada com a potência carcinogênica nos mamíferos (Apha, 1992).

Embora o teste forneça informação "qualitativa" quanto aos mutágenos, ele apresenta grande variabilidade entre laboratórios em termos de quantitativos. Contudo, ele é de grande valor como teste preliminar de triagem (Apha, 1992).

As propriedades mutagênicas dos efluentes das indústrias de celulose e papel têm sido estudadas, testando-se principalmente descargas de águas residuárias tratadas ou não, ou testando-se compostos puros identificados no efluente (Langi e Priha, 1988).

Ander e col. (1977) e, posteriormente, Höglund e col. (1979), detectaram que o licor residual do estágio de cloração da seqüência de branqueamento da polpa celulósica de fábricas *kraft* exibia um significativo efeito mutagênico quando testado de acordo com o Teste de Ames.

Mais tarde, esta propriedade de causar mutagenicidade frente a organismos-teste foi confirmada para um número de fábricas de celulose, tanto para polpação *kraft* como também para sulfito, utilizando-se como fonte de matéria-prima madeira de folhosas (*hardwood*) e/ou de coníferas (*softwood*) para várias seqüências de branqueamento (Langi e Priha, 1988; Holmbom, 1984; Nestmann, 1979; Houk, 1992; Stockmann, 1980; Erickson, 1982; Holmbom, 1981; Bjorseth, 1979; Kringstad, 1981). A maior parte desses levantamentos

(\*) Segundo o Henderson's Dictionary of Biological Terms 9<sup>a</sup> Ed. - *Microssomes: a partícula de menor tamanho que fica abaixo na ultrafiltração do homogenato de células e incluem partes de outras frações, especialmente retículo endoplasmático com ribossomos relacionados com a síntese proteica; formalmente utilizado pela maioria dos citologistas para designar qualquer pequeno grânulo no citoplasma.*

referem-se às indústrias instaladas nos países Escandinavos, Canadá e Estados Unidos.

Progressos na área da toxicologia genética são devidos, em grande parte, ao desenvolvimento e ao uso comum dos bioensaios de curta duração (*short-term*). Sua simplicidade e sensibilidade para danos genéticos, a relativa rapidez e baixo custo de experimentação, além da pequena quantidade de amostra requerida para o ensaio, têm permitido que as pesquisas em toxicologia genética apresentassem êxito (Houk, 1992).

### Revisão bibliográfica Adversidade dos efeitos mutagênicos e importância de sua detecção

A detecção de mutágenos em amostras ambientais tem importância principalmente quanto a dois aspectos: em relação à carcinogênese e às doenças hereditárias (Valent, 1990).

Durante as últimas três décadas têm sido reunidas cada vez mais evidências de que o câncer é uma doença genética e que pode ser entendido como o resultado de várias mutações que se acumulam no

DNA de uma célula somática, levando à perda do controle de crescimento (Watson e col., 1987, apud Valent, 1990). Desta forma, pode-se inferir que quanto maior a exposição de uma população a agentes mutagênicos, maior a incidência de câncer nos indivíduos.

Outra consideração é que mutágenos agindo em células germinativas (basicamente óvulos e espermatozoides) causam modificações no material genético, ou seja, mutações que podem levar a maior incidência de doenças genéticas, sendo que as mais facilmente identificadas nas populações são as de caráter dominante e aquelas causadas por aberrações cromossômicas (Saxena, 1984; apud Valent, 1990).

Cientistas estimam que, baseados nos estudos epidemiológicos, mais de 90% de todos os cânceres são ambientalmente relacionados (*American Industrial Health Council*, 1978 apud Lee, 1981). Poluentes e químicos industriais são estimados serem responsáveis por algo em torno de 1 a 5% de todos os cânceres, sendo que alguns cientistas afirmam que este quadro pode ser tão crítico como algo em torno de 25% (Lee, 1981).

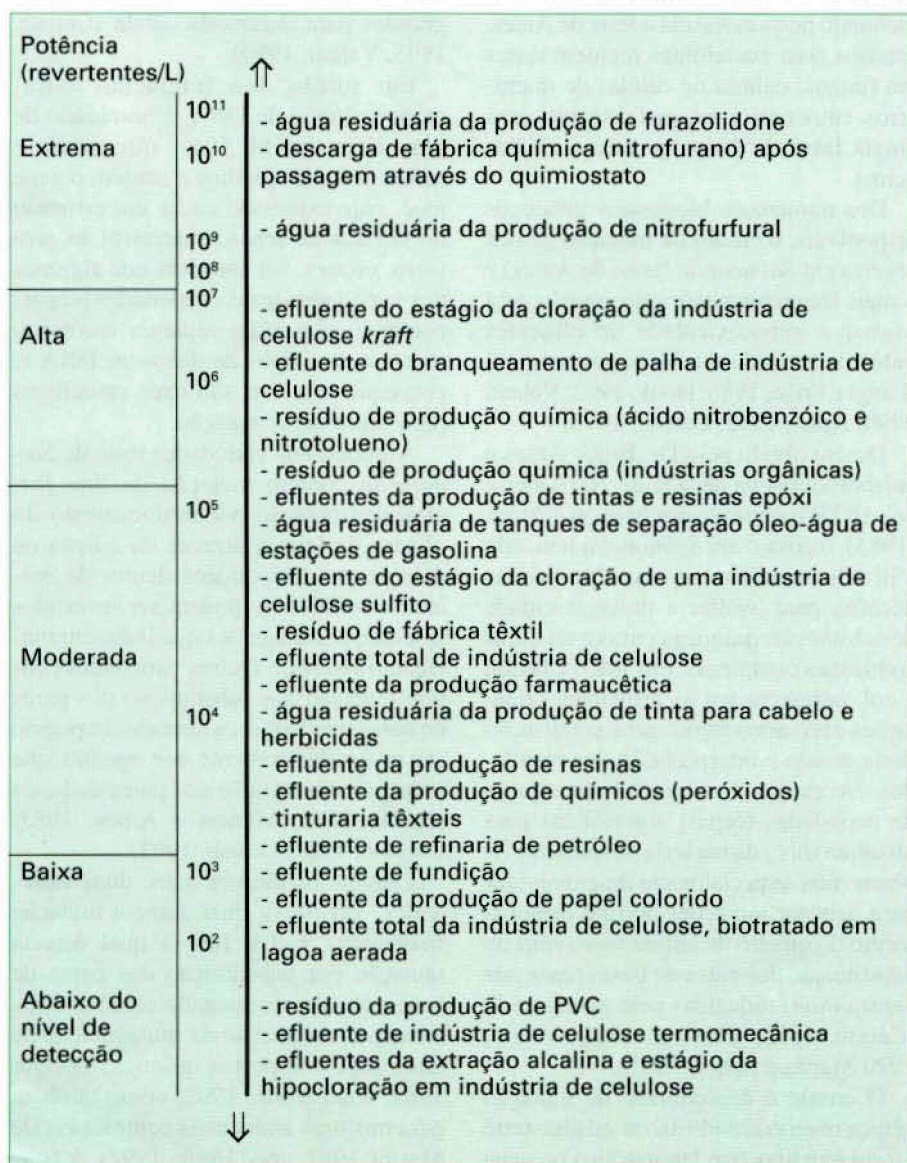
Associação comum entre atividade mutagênica e carcinogenicidade é a base para o uso dos testes de mutagenicidade de curta duração (*short-term*) com bactérias e cultura de células para se detectar a potencialidade dos carcinógenos (Apha, 1992).

Atualmente, os testes de mutagenicidade mais utilizados em amostras ambientais são os que utilizam as bactérias e, em especial, o teste de Ames ou teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*/microsomas de células de mamífero (Valent, 1990; Houk, 1992; Claxton, 1987).

O teste em *Salmonella* tem sido selecionado devido à sua facilidade de aplicação e sua correlação reportada entre mutagenicidade e carcinogenicidade dos químicos (Nestmann, 1979; Kringstad, 1981; Apha, 1992; Claxton, 1987). Ames e McCann (1981-apud Maron e Ames, 1983), em um levantamento sobre a correlação entre mutagenicidade/ carcinogenicidade, estimaram que esta relação está em torno de 83% para 300 químicos relacionados.

A validação do teste de Ames como instrumento confiável na avaliação de carcinógenos e/ou mutágenos foi exaustivamente realizada como pode ser observado nos trabalhos de Purchase e

**Figura 1: Distribuição do potencial mutagênico de efluentes industriais baseada na atividade por unidade de volume do efluente total**



- Resultados obtidos a partir do ensaio em *Salmonella* (TA 100, TA 98, TA 1535).  
- As demarcações para baixa, média, alta e extrema mutagenicidade representam potenciais limites para análise de avaliação de risco e são baseadas, em parte, nas informações fornecidas pelos estudos de compostos puros e misturas ambientais complexas.  
- Modificado do original no sentido de atender às necessidades deste trabalho

col. (1978), Dunkel e col. (195), Tennant e col. (1987) e Auleta e Ashby (1988) - (apud Valent, 1990).

Uma classificação (*ranking*) realizada por Houk (1992) apresenta em ordem de grandeza a potência de mutagenicidade verificada para vários tipos de descargas residuárias geradas por atividades diversas, avaliada através do ensaio em *Salmonella* (figura 1). Esta classificação é de significativa importância, uma vez que é considerada a carga de mutagenicidade lançada ao meio ambiente, ou seja, a mutagenicidade observada é multiplicada pela vazão do efluente em questão.

Segundo esta mesma autora, embora a mutagênese seja uma medida do potencial genotóxico, esta representa apenas um dos três tipos de danos estruturais ao DNA (como será citado mais adiante), e interpretações do risco relativo devem ser feitas com precaução quando baseados neste único *end point*. Contudo, tal sistema de classificação pode ajudar na medida de risco, centrando atenção nas indústrias cuja descarga de resíduos possam significar ameaça mutagênica para a saúde humana e do meio ambiente.

Vallent (1990) afirmou que os ensaios genotóxicos, de um modo geral, não são 100% precisos e que nenhum ensaio é capaz de detectar todos os carcinógenos conhecidos, o que faz do teste de Ames o principal ensaio de rotina devido à sua alta reprodutibilidade, baixo custo e uso generalizado, facilitando comparações entre resultados e permitindo análise de várias amostras em um curto espaço de tempo.

### **Considerações sobre o Teste de Ames e do uso de testes de genotoxicidade na detecção de mutágenos ambientais**

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).

Mais de 200 testes de curta e longa duração que utilizam microrganismos, insetos, plantas e animais foram desenvolvidos durante os últimos 20-25 anos para auxiliar na identificação de agentes que possuem ou apresentem risco genético para a população humana (Water e col. 1988, apud Houk, 1992). Estes testes podem ser separados em grupos maiores baseado no sistema biológico empregado (bioensaio em organismos precariontes e bioensaios em organismos eucariontes), e ao *end point* genético detectável (mutação gênica, danos e reparos ao DNA, danos aos cromossomos e aneuploidia).

Bioensaios com procariontes (bactérias) detectam agentes que induzem mutação gênica e danos primários ao DNA, incluindo nesta categoria o teste de Ames. Ensaios com eucariontes incluem testes em fungos, cultura de células de mamíferos, entre outros, na qual detectam uma ampla faixa de danos genéticos citados acima.

Dos numerosos bioensaios genéticos disponíveis, o ensaio de mutação gênica reversa em *Salmonella* (teste de Ames) é o mais freqüentemente selecionado para avaliar a genotoxicidade de efluentes industriais, resíduos e descargas em geral (Langi e Priha, 1988; Houk, 1992; Valent, 1990; Apha, 1992; Cetesb, 1993).

Desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 (Ames e col. 1973) e revisado por Marion e Ames (1983), o ensaio em *Salmonella* tem sido utilizado mundialmente nas últimas duas décadas para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas puras e misturas ambientais complexas. Em 1987, Claxton e col. apresentaram as principais orientações e recomendações para a realização deste ensaio e interpretação dos resultados. No ensaio, é utilizado um conjunto de variedades (cepas) autotróficas para histidina (*his*<sup>-</sup>) da bactéria *Salmonella typhimurium*, especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura *frameshift* ou substituição dos pares de bases (*base pair substitution*) induzidas pelo agente teste (Cetesb, 1993; Claxton, 1987; Valent, 1990 Maron e Ames, 1983).

O ensaio é denominado de mutação gênica reversa devido às variedades-teste serem mutadas (em laboratório) no gene *-operon-* para o caminho biosintético da histidina e, conseqüentemente, não podem produzir histidina, um aminoácido necessário para o crescimento da bactéria.

Uma mutação adicional é requerida para reverter a célula em prototrófica para histidina (*his*<sup>+</sup> - estado selvagem), provenientes de mutações provocadas pela amostra-teste ou originadas de mutações espontâneas (Marion e Ames, 1983; Houk, 1992; Cetesb, 1993; Claxton, 1987, Valent, 1990).

No sentido de aumentar a sensibilidade das variedades-teste de *Salmonella* frente aos mutágenos, várias modificações foram feitas para a variedade do tipo selvagem. Modificações incluem a remoção do sistema de reparação por excisão do DNA bacteriano (deleção do gene *uvr B*) e, também, perda parcial da estrutura de lipossacarídeos da parede da célula bacteriana (mutação denominada *rfa*), facilitando a difusão de moléculas grandes para dentro da célula (Cetesb, 1993, Valent, 1990).

Em adição, um fragmento extracromossômico de DNA denominado de plasmídeo (pKM 101), que confere resistência à ampicilina e contém o gene *muc*, cuja expressão causa um estímulo no sistema de reparo suscetível ao erro (*erro prone*), foi inserido em algumas das variedades-teste. Variedades (cepas) contendo plasmídeo reparam incorretamente certos tipos de danos ao DNA e, conseqüentemente, são mais suscetíveis para expressar a mutação.

Algumas das variedades teste de *Salmonella* contém mutação do tipo *frameshift* (mutação por deslocamento do quadro de leitura através da adição ou deleção de nucleotídeos dentro da molécula de DNA) e podem ser revertidos somente pelos agentes que induzem mutação *frameshift*. Outras variedades contêm mutação por substituição dos pares de bases (nucleotídeos alterados) e podem ser revertidas somente por agentes que induzem substituição dos pares de bases (Houk, 1992; Marion e Ames, 1983; Claxton, 1987; Cetesb, 1993).

Durante os últimos anos, duas variedades, TA 98 (a qual detecta mutação *frameshift*), e TA 100 (a qual detecta mutação por substituição dos pares de bases) têm-se apresentado como as mais sensíveis na análise da mutagenicidade tanto para compostos químicos (Zeiger 1985, apud Houk, 1992) como também para misturas ambientais complexas (De Marini, 1991, apud Houk, 1992). A Norma-Cetesb L5-620 prescreve que, para uma triagem de rotina, o uso das cepas TA 100 e TA 98 tem se mostrado eficiente na detecção de um grande número

de mutágenos ambientais; além disso, a literatura para mutagenicidade em efluentes de indústrias de celulose e papel tem descrito a utilização dessas duas cepas para a maioria dos trabalhos realizados.

Uma deficiência do ensaio em procariontes é que se encontram ausentes nas bactérias muitas das enzimas metabólicas presentes nos mamíferos. Neste sentido, o metabolismo dos mamíferos pode ser imitado *in vitro* através da adição de homogenato de fígado de roedor (denominado de fração S9) ao ensaio. As enzimas deste homogenato, juntamente com cofatores (por exemplo, NADP), podem ativar muitos dos compostos que, de outra forma, não seriam mutagênicos nos bioensaios *in vitro*, os chamados promutágenos.

Porém, em alguns casos, o sistema de metabolização pode inativar compostos mutagênicos tanto enzimaticamente como por ligações ao acaso entre espécies moleculares dos compostos com essas enzimas microssomais, tornando-se inativos ou menos ativos (Kamura 1983, apud Valent, 1990).

Para realizar o ensaio padrão de incorporação em placa, a variedade-teste de *Salmonella* é exposta a doses crescentes da substância-teste (na presença ou ausência de S9) em meio ágar de superfície. Os conteúdos são, então, vertidos em um meio ágar seletivo (ágar mínimo) o qual permite o crescimento apenas dos mutantes revertentes (além dos mutantes espontâneos característicos para cada cepa utilizada), ou seja, as células que se reverteram do estado auxotrófico (*his<sup>-</sup>*) para o estado prototrófico (*his<sup>+</sup>*) crescerão e formarão colônias. A resposta mutagênica pode ser quantificada calculando-se o aumento na dose relacionada e o número de colônias prototróficas para histidina (revertentes) que ocorre por unidade de volume da substância testada.

Os danos genéticos expressos pelo ensaio em *Salmonella* representam uma classe de danos ao DNA, chamados de mutação gênica ou mutação ponto. Outras duas maiores classes de danos ao DNA - clastogênese e aneuploidia - referem-se a alterações estruturais no cromossomo e no número de cromossomos, respectivamente, a qual são detectadas por outros tipos de ensaios e organismos, tais como fungos, plantas, cultura de células de mamíferos e animais (Houk, 1992).

O teste de Ames vem sendo o principal teste empregado na avaliação da muta-

genicidade de produtos químicos puros (McCann e col. 1975, Mortelmans e col. 1986) de amostras atmosféricas (Hughes e col., 1980) e de amostras ambientais líquidas, tanto para efluentes industriais como para os corpos d'água que os recebem (como rios, lagos etc.), além da água tratada para abastecimento público (apud Valent, 1993).

### **Constituintes da madeira relacionados aos efeitos mutagênicos**

Os licores residuários (efluentes) de branqueamento da polpa celulósica contém uma mistura complexa de lignina dissolvida, produtos da degradação da celulose e outros extrativos da madeira originários do processo de polpação, além dos compostos clorados derivados do processo de branqueamento (Nestmann, 1979); desta forma, constituem os licores residuários da cloração e da extração alcalina a maior porção, tanto em carga como em volume, de todo o efluente gerado pela indústria de celulose integrada ou não (Rosa, 1990).

Bjorseth e col. (1979) afirmam ainda que os efluentes das indústrias de celulose são fortemente relacionados com as condições de cozimento, tipos de madeira e métodos de cloração, variando, portanto, qualitativamente e quantitativamente de fábrica para fábrica.

Desta forma, surge o questionamento de quais dos constituintes presentes na madeira são os responsáveis pela mutagenicidade, ou seja, qual do(s) componente(s) da polpa não branqueada é a origem dos compostos geneticamente ativos?

Stockman e col. (1980) observaram que quando da cloração da celulose, holocelulose e de extrativos isolados da polpa não branqueada, tendo sido os efluentes testados de acordo com o teste de Ames, nenhum efeito mutagênico foi detectável em qualquer um destes componentes. Contudo, quando testou-se o efluente da lignina residual clorada e isolada de uma polpa *kraft* não branqueada, obteve-se uma resposta positiva.

Isto demonstra que os compostos geneticamente ativos originam-se ou são primariamente formados a partir da lignina residual isolada da polpa não branqueada (Stockmann, 1980; Nazar e Rapson, 1982; Houk, 1992; Kringstad, 1981).

### **Considerações sobre os efeitos genotóxicos descritos e fontes de geração de mutagenicidade nas**

### **indústrias de celulose**

Como citado anteriormente, a detecção do potencial mutagênico presente nos efluentes das indústrias de celulose e também nos efluentes preparados em laboratório, foi primeiramente avaliado por Ander e col. (1977), na qual observaram que os licores residuários do estágio da cloração de branqueamento da polpa *kraft softwood* apresentavam propriedades mutagênicas quando testados em *Salmonella* (cepas TA 1535 e TA 1537). Além disso, efluentes do estágio da hipocloração apresentaram, também, uma fraca atividade mutagênica, após concentração da amostra.

Esses autores observaram que o efeito mutagênico devia ser ocasionado por mais de um tipo ou grupo de compostos, uma vez que a detecção da mutagenicidade foi positiva para duas diferentes variedades de *Salmonella typhimurium* (TA 1535, que detecta mutação por substituição dos pares de bases e TA 1537, que detecta mutação por deslocamento do quadro de leitura-*frameshift*), inferindo-se mecanismos diferentes da ação mutagênica.

Ander e col. observaram, ainda, que nenhum dos outros efluentes da seqüência convencional de branqueamento (extração alcalina e dióxido de cloro) exibiram efeito mutagênico frente ao teste em *Salmonella*, da mesma forma que para os testes em *Escherichia coli*, na qual para esta espécie todos os efluentes testados apresentaram-se não mutagênicos, concluindo que este teste não apresentava sensibilidade para com os efluentes das indústrias de celulose. Além disso, o efeito mutagênico era reduzido quando a mistura de S9 foi adicionada ao ensaio em *Salmonella*.

O efluente da cloração foi, ainda, dividido, em relação ao peso molecular relativo, em maior e menor do que 1000, onde observou-se que os efeitos mutagênicos eram quase que exclusivamente restritos à fração de baixo peso molecular relativo e que tanto compostos éter solúveis como hidrossolúveis eram responsáveis pelo efeito genotóxico observado (com significativa predominância para a fase éter solúvel, como será visto mais adiante), concluindo que os efluentes do estágio da cloração continham várias substâncias mutagênicas.

Após estes resultados terem sido reportados, os estudos da genotoxicidade presente em efluentes de indústrias de celulose intensificaram-se significativamente

te. Questionamento quanto à avaliação de risco envolvida na descarga dos efluentes mutagênicos junto aos corpos receptores requeriam informações da natureza dos compostos mutagênicos, a potencialidade de se acumularem nos tecidos biológicos e sua estabilidade e biodegradabilidade sob as condições encontradas no ambiente. Além disso, se é mutagênico o efluente das plantas de branqueamento, qual a melhor maneira para se eliminar este efeito?

Um importante estudo veio, posteriormente, elucidar parte das questões relacionadas à mutagenicidade presente nos efluentes das indústrias de celulose e papel. Erickson e col. (1979), do mesmo grupo de trabalho (Laboratório de Pesquisas de Produtos Florestais da Suécia) do artigo acima citado, demonstraram que aproximadamente todos os efluentes do estágio da cloração de branqueamento da polpa *hardwood* e *softwood* tanto para o processo *kraft* como para o sulfito, apresentavam-se mutagênicos para as concentrações normais de processo, frente ao ensaio em *Salmonella*.

Este efeito mutagênico era ainda mais significativo para o efluente do estágio da cloração de branqueamento da polpa *kraft softwood*, e em ordem decrescente, *kraft hardwood*, sulfito *softwood* e sulfito *hardwood*, sendo que para este último o efeito foi considerado insignificante.

Um dado importante de processo obtido desse trabalho foi a observação de uma relação linear entre a diminuição do efeito mutagênico e o aumento da proporção de substituição de cloro por dióxido de cloro no primeiro estágio da seqüência de branqueamento. Proporções, tais como 0/100, 15/85, 30/70, 70/30, 100/0 %, de substituição de cloro por dióxido de cloro, foram avaliadas e, quando da utilização de 100% de dióxido de cloro no primeiro estágio de branqueamento, não foi detectada a formação de efluentes mutagênicos.

Para os demais efluentes da seqüência de branqueamento, não foi detectado efeito mutagênico frente ao ensaio em *Salmonella* para as concentrações de processo, ou seja, sem concentração da amostra.

Ainda neste trabalho, investigou-se formas para eliminação do potencial mutagênico utilizando-se como padrão o efluente do estágio da cloração de branqueamento da polpa *kraft softwood* e as conclusões são apresentadas no item redução/remoção do potencial mutagênico mais adiante.

A partir da constatação de que o efluente do estágio da cloração apresentava-se como o mais genotóxico de todas as descargas do processo e, até certo ponto, ao maior conhecimento quanto à formação e natureza dos compostos organoclorados gerados nas plantas de branqueamento, novos estudos vieram elucidar alguns dos pontos obscuros quanto à problemática da mutagenicidade presente nos efluentes das indústrias de celulose, além da subseqüente identificação de organoclorados mutagênicos específicos.

Neste sentido, os efluentes do estágio da cloração de branqueamento não somente causam mutação por substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura em *Salmonella* (Ander, 1979; Bjorseth, 1979; Rannug, 1980; Lee, 1981; Holmbolm, 1981, 1984; Kamra, 1983; Langi e Priha, 1988) como também causam mutação em células de mamíferos (CHO) (Rannug, 1981); aberrações cromossômicas também em células de mamíferos (CHO) (Douglas, 1985; Lee, 1981), conversão gênica e recombinação mitótica em levedura (Douglas, 1983; Kamra, 1983 apud Houk, 1992; Nestmann, 1985) e troca de cromátides irmãs (SCE) em células de ovário de *hamster* chinês (CHO) (Douglas, 1983, apud Houk, 1992; Langi e Priha, 1988).

Em contraste à significativa atividade genotóxica demonstrada pelo efluente do estágio da cloração, a qual foi detectada em seu estado bruto sem a necessidade de técnicas de extração/concentração, efluentes dos estágios de extração alcalina, hipocloração e dióxido de cloro da seqüência de branqueamento, apresentaram-se em geral menos mutagênicos ou até mesmo não mutagênicos para as concentrações normais de processo; dados positivos para estes efluentes foram obtidos apenas quando as amostras foram concentradas e/ou extraídas (Houk, 1992; Stockmann, 1980; Langi e Priha, 1988).

Quanto à mutagenicidade do efluente final de descarga para o corpo receptor, no mesmo estudo realizado por Lee e col. (1988), foram estudadas sete fábricas de celulose, sendo cinco do tipo *kraft*, uma sulfito e uma mecânica. O autor observou que, no efluente geral da fábrica não tratado e tratado biologicamente pelo processo de lagoa aerada, não foi detectado a presença de material mutagênico, supondo-se que a mutagenicidade apresentada pelo efluente da cloração ou era diluída pelas outras fontes não mutagênicas da fábrica ou era eliminada por meca-

nismos de reação desconhecidos. Estas conclusões foram observadas frente ao ensaio em *Salmonella* e também para o teste de aberração cromossômica em CHO, quando as amostras foram testadas para as mesmas concentrações de descarga ao corpo receptor.

Contudo, os autores verificaram inibição no processo de reparo ao DNA nos testes em células de fibroblasto humano, evidenciando, portanto, que ainda havia a presença de materiais que afetam o mecanismo genético da célula. Desta forma, parece que em adição às mutações em bactérias e danos cromossômicos em cultura de células de mamíferos causados por certos efluentes das indústrias de celulose, o mecanismo de reparo de dano ao DNA dos organismos pode também ser afetado.

Podemos citar ainda Höglund (1979) e Douglas (1980, apud Houk, 1992), que observaram que o efluente total de uma fábrica de celulose não apresentava-se mutagênico, porém, após significativa concentração da amostra, alguns valores positivos puderam ser observados e que este fato era decorrente da diluição do efluente do estágio da cloração por outras contribuições não mutagênicas da indústria de celulose, diluindo, portanto, o efeito desta fonte, mas também principalmente pela instabilidade química dos compostos mutagênicos presentes.

Porém, quando Nestmann (1984), apud Houk, 1992) usou uma versão mais sensível do ensaio em *Salmonella*, chamado de teste flutuante, ele encontrou uma relação dose/resposta quando o efluente total não tratado da fábrica foi testado. Além disso, diluições do efluente total das indústrias de celulose podem causar numerosos efeitos citológicos em plantas, por exemplo, em *Allium cepa*, além da indução de micronúcleos em eritrócitos de peixes (Das Nanda, 1986; Mohapatra e col., 1985; Shantlamurthy e Rangaswanay, 1979; apud Houk, 1992).

Quando Langi e Priha (1988) usaram diferentes métodos para a detecção de efeitos mutagênicos (mutação reversa, reparação ao DNA e aberração cromossômica) para três diferentes indústrias de celulose, sendo duas *kraft* e uma mecânica integrada com fábrica de papel, constataram também a presença de compostos mutagênicos (apenas através do ensaio de SCE) no efluente total da indústria de polpação mecânica a qual não utiliza o cloro ou seus derivados para o alveamento da polpa. Para as outras duas

indústrias avaliadas, mutação por SCE foi também observada para o efluente final da fábrica tratado através de lagoa aerada.

Segundo estes autores, a detecção de mutagenicidade no efluente de uma indústria de celulose do tipo mecânica indica a presença de compostos não clorados também causadores de efeito mutagênico e que, além disso, a detecção de efeito genotóxico frente a diferentes vias de detecção indica mais uma vez que estes efeitos devem ser causados pela ação de diferentes compostos.

Houk, em 1992, em uma importante revisão quanto, genotoxicidade de resíduos e efluentes industriais diversos, cita estudos realizados com plantas e animais selvagens em ambientes naturais próximos às indústrias de celulose e papel, onde foram observadas evidências dos efeitos genotóxicos fora dos limites das indústrias. Para uma população de samambaia (*Osmunda recalis*) crescendo à jusante de uma fábrica de celulose e papel, foi observada uma alta incidência de mutação cromossômica (Klekowski e Berger, 1976; Klekowski e Lewin, 1979), e que extratos de tecidos de várias espécies de peixes coletados de um rio contaminado com efluentes de uma indústria de polpa *kraft* branqueada integrada exibiam significativa atividade mutagênica quando testados de acordo com o teste de *Salmonella* (Blevins, 1991).

Nesta revisão, Houk conclui que, comparando com outras indústrias, o efluente do estágio da cloração gerado pela indústria *kraft* demonstra um alto potencial mutagênico baseado na atividade por unidade de volume de descarga (como foi observado na figura 1); contudo, o efluente total da fábrica na qual encontra-se diluído o efluente da cloração com outras descargas de processo apresenta-se apenas moderadamente mutagênico. No entanto, estudos quanto à biota, incluindo peixes e plantas que habitam as proximidades das descargas dos efluentes das indústrias de celulose, têm sugerido que o impacto desses lançamentos no ambiente é bastante significativo.

#### **Natureza e identificação de alguns dos compostos mutagênicos presente nos efluentes das indústrias de celulose**

Uma vez amplamente observada a potencialidade dos efluentes do estágio da cloração de branqueamento das

indústrias de celulose em causar efeitos genotóxicos, vários pesquisadores direcionaram esforços no sentido de se identificar quais são os compostos responsáveis por tais efeitos, qual é a natureza química destes e como se comportam sob as condições que prevalecem no ambiente.

Stockmann e col. (1980) relatam a presença de um diferente número de compostos já determinados como responsáveis pelo efeito mutagênico. Alguns deles apresentam-se relativamente instáveis e irão se decompor em produtos geneticamente inativos sob condições neutras e temperatura ambiente. Outros são estáveis durante relativamente longos períodos sob tais condições e que, por enquanto, parte dos materiais encontrados na qual apresentam-se geneticamente ativos são compostos clorados de natureza alifática.

Este autor, assim como Langi e Priha (1988), reportou ainda que a maior parte da mutagenicidade indicada pelo teste de Ames, ou seja, em torno de 85%, foi encontrada na fração contendo compostos com peso molecular menor do que 500. Do material com peso molecular maior do que 1.000, não foi observado qualquer efeito mutagênico.

Ander e col. (1977) já haviam relatado que os efeitos mutagênicos eram relacionados quase que completamente à fração de baixo peso molecular (<1.000) e que parte deste efeito era relacionado à fração éter solúvel.

Já com relação à solubilidade, os compostos geneticamente ativos são encontrados na maior parte da fração éter solúvel, sendo que 75% do efeito mutagênico está relacionado à fase lipofílica, a qual apresenta uma afinidade para concentrar-se nos tecidos gordurosos podendo, assim, acumular-se em vários organismos. Os outros 25% encontram-se distribuídos na fração hidrossolúvel (Stockmann, 1980; Kringstad, 1981).

Para o efluente do estágio da cloração da polpa *kraft softwood*, os compostos mutagênicos são predominantemente de natureza neutra. Por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/MS), 20 diferentes compostos neutros foram identificados, entre estes, 9 isômeros de acetonas cloradas, nas quais em alguns casos as propriedades mutagênicas e carcinogênicas estão descritas na literatura.

Kringstad e col. (1981), através de CG/MS, demonstraram a presença de

uma variedade de alcanos, alcenos, ésteres, cetonas cíclicas e acíclicas e aldeídos saturados e insaturados no licor residual da cloração. Alguns destes compostos são conhecidos ou foram encontrados serem mutagênicos. Entre estes incluem-se 1,3-dicloroacetona (um clorado derivado do MX) e 2-cloropropenal, a qual apresentaram particularmente elevada atividade mutagênica (Stockmann 1980, Höglund, 1979; McKague, 1988).

Holmbom e col. (1981), baseados em espectroscopia de massa de alta resolução e espectroscopia de Ultra Violeta (U.V.) e Infravermelho (I.R.), identificaram um outro potente composto mutagênico, o 3-cloro-4-diclorometil-5-hidróxi-2(5H)-furanona, um hidróxi-furanona também denominada de MX, a qual apresenta uma fórmula empírica de  $C_5H_3O_3Cl_3$ . A posição relativa do cloro e dos grupos diclorometil não foram seguramente estabelecidas.

A maioria dos compostos geneticamente ativos, a qual tem sido identificados nos efluentes dos estágios da cloração, estão presentes em baixas concentrações e, em alguns casos, em extremamente baixas concentrações (Stockmann, 1980). Embora nenhum dado esteja ainda seguramente disponível quanto às concentrações destes compostos mutagênicos, recentes estudos indicam um limite superior da ordem de aproximadamente 50 µg/l (50 ppb) para a maioria dos compostos puros testados sob concentração ou fracionados da amostra (Kringstad, 1981). Holmbom e col. (1981) reportaram que a concentração dos compostos mutagênicos está em torno de 5- 10 µg/l no efluente original do estágio da cloração.

Extrações por etil acetato e resina XAD-4 forneceram aproximadamente uma completa (70-90%) extração de toda a mutagenicidade do efluente do estágio da cloração de branqueamento de uma polpa *kraft softwood*. Estes resultados sugerem, segundo Holmbom e col. (1984), que a mutagenicidade desses efluentes é causada principalmente por compostos não voláteis e de polaridade intermediária. Em torno de 10 a 20% da mutagenicidade foi relacionada a compostos altamente hidrossolúveis, não extraíveis por solventes orgânicos.

Ainda segundo este autor, através de fracionamento dos extratos mutagênicos, conseguiu que do extrato da extração por etil acetato, tratado com solução a 2% de

NaHCO<sub>3</sub> fosse removida maior parte (entre 60 a 70%) da mutagenicidade a Ames. Porém, este material mutagênico poderia ser essencialmente recuperado após acidificação a pH=2,0 e ser reextraído com etil acetato.

McKagre e col. (1988), estudando a natureza e propriedades de alguns compostos orgânicos clorados lipofílicos isolados do licor residuário de branqueamento de uma polpa *kraft softwood*, identificaram, através de CG/MS, a presença de 20 compostos lipofílicos clorados, entre estes enol lactonas cloradas e enol dionas cloradas, as quais mostraram-se fracamente mutagênicas e quimicamente instáveis, presumindo-se decompor-se sob as condições encontradas nos corpos d'água receptores, porém, a propriedade lipofílica foi a estes relacionada e um potencial para bioacumulação deve ser considerado.

Nestmann e col. (1979), trabalhando com dez resinas ácidas naturais ou cloradas, identificadas como constituintes dos efluentes das indústrias de celulose e estudadas para a determinação do potencial mutagênico frente ao ensaio em *Salmonella*, encontraram que apenas o ácido neoabiético apresentou-se mutagênico, e que as resinas como um todo são usualmente biodegradáveis e não persistem nos corpos d'água receptores das descargas destes tipos de indústrias.

Os autores relataram ainda que, embora o ácido neoabiético seja um componente mutagênico do efluente, este composto ocorre naturalmente na madeira utilizada para a fabricação da celulose.

Uma importante observação foi relatada por Langi e Priha (1988) que, avaliando os efluentes de indústrias de polpação química e também de uma indústria mecânica integrada com fábrica

de papel, verificaram que o efluente desta última não apresentava mutagenicidade frente ao teste de Ames, mas quando o efluente foi testado em células de ovário de *hamster* chinês-CHO para indução SCE, efeito mutagênico positivo foi detectado, o qual indica a atividade de compostos não clorados também causadores de efeito genético, uma vez que o cloro não é utilizado como agente alvejante neste tipo de processo.

Houk (1992), em seu trabalho de revisão sobre a genotoxicidade de efluentes e resíduos industriais, relata a partir dos trabalhos acima citados que três compostos têm sido identificados como particularmente potentes mutágenos nos efluentes da polpa *kraft*: 3-cloro-4-dicloro-5-hidróxi-2(5H)-furanona (conhecido como MX, o qual também tem sido mostrado induzir aberrações cromossômicas em células de mamíferos), 1,3-dicloroacetona (um cloreto derivado do MX) e 2-cloropropenal.

Esta autora apresenta uma lista dos compostos já identificados como responsáveis pela atividade genotóxica a partir dos efluentes das indústrias de celulose integradas ou não. Destes, os relacionados em causar efeito frente ao teste em *Salmonella* são citados na figura 1.

Por fim, resume a autora, estes mutágenos são quase que exclusivamente compostos clorados de baixo peso molecular; que mutágenos hidrossolúveis (hidrofílicos) e éter solúveis (lipofílicos) têm sido isolados e identificados e que a maioria encontra-se na fração éter lipofílica. Os mais predominantes mutágenos lipofílicos são compostos neutros, incluindo as cloroacetonas e outros clorados alifáticos apresentados na figura 2. Mutágenos hidrofílicos incluem as resinas ácidas e compostos fenólicos, tais como clorocatecóis e cloroguaiacóis.

Devido à natureza clorada e lipofílica de muitos desses genotóxicos, existe uma relação de que estes podem ser resistentes à degradação e com isso ampliar-se na cadeia alimentar. Felizmente, muitos desses compostos são relativamente instáveis sob condições esperadas prevalecer nos corpos d'água receptores e decompõem-se rapidamente em subprodutos geneticamente inativos. Os dois compostos responsáveis pela maior parte da atividade mutagênica no licor residuário da cloração (MX e 2-cloropropenal) não são particularmente lipofílicos e, assim, apresentam baixo potencial para bioacumulação.

**Figura 2: Compostos genotóxicos identificados nos efluentes das indústrias de papel e celulose**

Composto	Organismo indicador
ácido neoabiético	<i>Salmonella typhimurium</i>
benzil cloreto	<i>Salmonella typhimurium</i>
bromocimeno	<i>Salmonella typhimurium</i>
bromodiclorometano	<i>Salmonella typhimurium</i>
3-cloro-4-diclorometil-5-hidróxi-2(5H)-furanona (MX)	<i>Salmonella typhimurium</i>
2-cloropropenal	<i>Salmonella typhimurium</i>
dibromoclorometano	<i>Salmonella typhimurium</i>
1,3-dicloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
diclorocatecol	<i>S. cerevisiae</i>
dicloroguaiacol	<i>S. cerevisiae</i>
dicloro- <i>p</i> -cimeno	<i>Salmonella typhimurium</i>
dicloroetano	<i>Salmonella typhimurium</i>
diclorometano	<i>Salmonella typhimurium</i>
hexacloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
monocloroacetaldeído	<i>Salmonella typhimurium</i>
1-oxa-6,7,10,10-tetraclorospiro(4,5)dec-6-en-8,9-dione	<i>Salmonella typhimurium</i>
1-oxa-6,10,10-triclorospiro(4,5)dec-6-en-8,9-dione	<i>Salmonella typhimurium</i>
pentacloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
pentacloropropeno	<i>Salmonella typhimurium</i>
1,1,3,3-tetracloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
1,1,2,2-tetracloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
tetracloroetileno	<i>Salmonella typhimurium</i>
tetracloropropeno	<i>Salmonella typhimurium</i>
1,1,3-tricloroacetona	<i>Salmonella typhimurium</i>
tricloroetano	<i>Salmonella typhimurium</i>
tricloroetileno	<i>Salmonella typhimurium</i>
1,2,3-trihidroxibenzeno	<i>Salmonella typhimurium</i>

Fonte: Houk (1992), a partir de várias referências; modificado do original por conter apenas os mutágenos frente ao teste de Ames, com exceção para diclorocatecol e dicloroguaiacol



Contudo, alguns compostos tóxicos presentes nos efluentes das indústrias de celulose não são facilmente degradáveis e podem persistir no ambiente e/ou bioacumularem-se. Ambos estudos de Stockmann e col. (1980) e Kringstad e col. (1984) têm demonstrado que uma pequena fração da mutagenicidade do efluente do estágio da cloração pode ser detectável após longos períodos de estocagem, sendo que esta atividade pode ser atribuída a compostos com alto grau de lipoficidade, tendo assim potencial de se acumularem na cadeia alimentar (Houk, 1992).

### **Redução/remoção do potencial mutagênico presente nos efluentes de indústrias de celulose**

Têm sido propostas na literatura diversas maneiras para se reduzir ou eliminar (pelo menos abaixo do limite de detecção) o potencial genotóxico presente nos efluentes de indústrias de celulose e papel e, concomitantemente, diminuir o risco de impacto destas descargas ao meio ambiente e ao homem.

Dentre estas, alternativas em planta (de processo), como substituição de cloro por dióxido de cloro para o primeiro estágio de branqueamento, e alternativas de tratamento externa, tais como tratamento biológico, elevação de pH do efluente para níveis alcalinos, troca iônica e tratamento com  $SO_2$ , estão entre as tecnologias mais avaliadas e as conclusões, de forma geral, são apresentadas a seguir.

Ander e col. (1977), citados anteriormente neste plano, reportaram que para cinco diferentes efluentes do estágio da cloração de branqueamento de polpa *kraft softwood*, o efeito mutagênico era reduzido quando microssomo de fígado (mistura S9) era adicionado ao sistema de ensaio com *Salmonella*, indicando uma detoxificação metabólica dos mutágenos responsáveis pelo efeito. Os autores testaram, ainda, a adição de S9 inativado (sem NADP), a qual também observou-se redução do efeito mutagênico e que isto devia ser, em parte, devido à absorção das substâncias mutagênicas pelo microssomo.

Lee e col. (1981) relataram que entre os processos envolvidos na redução da mutagenicidade através da mistura S9 incluem degradação ou transformação de substâncias mutagênicas pelas enzimas hepáticas ou adsorção dos mutágenos nas proteínas do fígado.

Outras conclusões sobre a avaliação do S9 foram apresentadas por Bjorseth e col. (1979), que obtiveram redução da mutagenicidade com a adição de S9 ao ensaio, com exceção para o efluente do estágio da cloração de uma planta sulfato.

Já Höglund e col. (1979) relataram que uma significativa redução da mutagenicidade foi obtida para o efluente da cloração com adição de S9 para a cepa TA 98, e que para a cepa TA 100 obteve-se apenas uma moderada redução quando a mesma amostra foi ensaiada com S9. Dos resultados experimentais, na qual a fração microssomal é incluída, é plausível ser esperado que organismos tendo sistema de metabolização comparável seriam capazes de reduzir substancialmente o efeito da atividade mutagênica das substâncias presente nos efluentes das plantas de branqueamento.

Ainda em 1979, Nestmann e col., trabalhando com quatro diferentes cepas de *Salmonella typhimutium* para resinas ácidas identificadas nos efluentes das indústrias de celulose, observaram apenas uma moderada redução da mutagenicidade para o ácido neoabiético (tendo sido apenas este identificado como mutagênico entre as resinas ácidas presentes) quando adicionada a mistura S9 ao ensaio.

Por fim, Houk (1992) afirma que o efeito mutagênico presente nos efluentes das indústrias de celulose, em geral, é dramaticamente reduzido quando um sistema exógeno de ativação metabólica é introduzido no sistema teste, sugerindo que o metabolismo *in vivo* pode influenciar na resposta mutagênica.

Quanto ao efeito do pH sobre o potencial mutagênico presente nos efluentes das indústrias de celulose, experimentos em laboratório têm demonstrado que a elevação do meio para níveis alcalinos (principalmente entre a faixa 10-11) destrói uma substancial fração da mutagenicidade quando testada frente ao ensaio de Ames (Erickson, 1979; Stockman, 1980; Lee, 1981 e Nazar e Rapson, 1982).

Citando novamente Erickson e col. (1979) que investigaram maneiras para se eliminar a mutagenicidade usando como padrão o efluente do estágio da cloração de branqueamento de uma polpa *kraft softwood*, por ter este se apresentado como o mais mutagênico dos efluentes estudados pelos autores, encontraram as seguintes condições:

- a mutagenicidade presente no

efluente pode ser reduzida pelo tratamento com lama de cal, porém, a redução é moderada mesmo com dosagens da ordem de 1 kg de lama de cal para cada 50 L de efluente;

- condições de estocagem considerando-se temperatura e valores de pH demonstraram claramente que os compostos mutagênicos presentes nestes efluentes são álcali sensitivos, principalmente considerando-se temperatura ambiente em torno de +20°C;

- diminuição da ordem de 1/3 foi obtida através do tratamento do efluente com solução aquosa de  $SO_2$  (sulfito), indicando que parte dos compostos mutagênicos reagem com o  $SO_2$ ;

- maior parte do efeito mutagênico é removido passando-se o efluente através de uma coluna de resina iônica trocadora, obtendo-se remoção máxima em número de mutantes na ordem de 90%;

- e por fim, eliminação da mutagenicidade do efluente da cloração (testado para as concentrações de processo) quando este foi tratado por 48h com uma microbiota adaptada para este tipo de substrato e com o pH corrigido para neutro para suportar o meio biológico e, posteriormente, mantido a +30°C sob condições aeróbias.

Porém, estes autores realizaram ensaio semelhante inoculando bactérias mortas e um controle sem adição de microrganismos, apenas com as mesmas condições de tratamento, obtendo-se para cada um destes casos uma parcial remoção do potencial mutagênico. Os autores concluíram que parte da remoção da mutagenicidade deveria ser atribuída aos processos de adsorção, parte pela instabilidade química dos compostos sob condições neutras e que considerável parte devia ser atribuída à degradação biológica das substâncias mutagênicas.

Portanto, concluem os autores, o tratamento biológico deve ser considerado como um método promissor para se evitar a contaminação ambiental por substâncias potencialmente mutagênicas originárias das plantas de branqueamento.

Höglund e col. (1979), trabalhando com efluentes de uma fábrica *kraft* com seqüência convencional de branqueamento (com 10% de substituição D/C no primeiro estágio), não detectaram efeito mutagênico para TA 100 e TA 98 no efluente total da fábrica antes do sistema de tratamento, sem concentração da amostra. Quando as amostras foram encontradas e extraídas, as frações dicloro-

metano e éter solúvel não apresentaram efeito para a cepa TA 98, mas apresentaram-se positivo para a cepa TA 100, embora o efeito tenha sido fraco.

Já para o efluente após o tratamento biológico, que consistia de lagoa aerada com tempo de detenção de cinco dias e com eficiência de remoção para DBO em torno de 70%, não foi observado efeito mutagênico tanto para TA 100 como para TA 98, nem mesmo para concentração de 100x da amostra.

Os autores comentam que a redução demonstrada da atividade mutagênica, provida pelos microrganismos do sistema biológico de tratamento e pelo sistema de metabolização de animais superiores, indica que é pouco provável que as substâncias responsáveis pelo efeito mutagênico possam ser persistente no ambiente.

Porém, Lee e col. (1981) relataram que, em geral, o tratamento, biológico substancialmente reduz e, em alguns casos, completamente remove a atividade mutagênica dos efluentes. Quando estes apresentam elevadas quantidades de organoclorados, por exemplo, os efluentes dos primeiros estágios da seqüência de branqueamento como o da cloração e extração alcalina, o tratamento biológico mostrou-se parcialmente efetivo, tendo-se verificado a permanência de significativa atividade mutagênica nestes efluentes após o biotratamento. Por fim, os autores comentam que há evidências de que certos compostos mutagênicos originários do efluente do estágio da cloração são recalcitrantes à biodegradação.

Langi e Priha (1988), trabalhando com diferentes indicadores de efeito genotóxico, observaram que o tratamento do efluente total de uma fábrica *kraft* através do sistema de lodos ativados era eficiente na remoção do efeito mutagênico tanto para o teste de Ames como também para o teste em células de ovário de *hamster* chinês-CHO (SCE), e que quando o efluente de uma outra fábrica *kraft* era tratado através de lagoa aerada, este ainda apresentava-se mutagênico frente ao teste em células CHO (SCE).

Lee e col. (1981) propõem que, de modo geral, três mecanismos em potencial podem ser descritos como envolvidos na redução/remoção da atividade mutagênica pelos sistemas de tratamentos biológicos: biodegradação das substâncias mutagênicas, adsorção dos materiais mutagênicos à biomassa e hidrólise dos organoclorados sob condições

neutras de pH necessárias para o tratamento biológico.

Nazar e Rapson (1982) reportaram uma importante observação quanto ao comportamento das substâncias mutagênicas presente nos efluentes das indústrias de celulose. Estes autores evidenciaram, frente a já conhecida instabilidade dos mutágenos em meio alcalino, que quando da elevação do pH do meio a quantidade de Cl<sup>-</sup> (íons cloreto) produzida atingia limites máximos, refletindo um aumento na decomposição dos mutágenos e que, seguramente, o mecanismo de destruição dos mutágenos envolve a formação de Cl<sup>-</sup> inorgânico, o qual pode ser linear nos estágios iniciais da reação. Porém, devem ser considerados produtos de reação não mutagênicos na formação de Cl<sup>-</sup>.

Por fim, os autores comentam que a reação de decomposição dos mutágenos contendo cloro, identificados nos efluentes das indústrias de celulose, procede via clivagem do cloro organicamente ligado pelo íon hidróxido.

Por outro lado, como alternativa em planta para redução do potencial mutagênico gerado pelas indústrias de celulose pode-se citar a substituição de cloro por dióxido de cloro no primeiro estágio da cloração de branqueamento. Uma relação linear foi obtida por Erickson e col. (1979), na qual quanto maior a porcentagem de substituição, menor é o potencial mutagênico verificado no efluente deste estágio, até 100% de ClO<sub>2</sub>, a qual não foi detectado efeito frente ao teste de *Salmonella*, para ensaios sem concentração das amostras. Esta abordagem já foi descrita anteriormente no primeiro item da revisão bibliográfica.

## Comentários

### Alternativas de gerenciamento

No Brasil, muito pouco tem sido estudado e menos ainda são os dados reportados na literatura quanto à avaliação do potencial genotóxico presente nos efluentes das indústrias de celulose e papel aqui instaladas. Esta situação demanda maior atenção e pesquisas, uma vez que o lançamento dessas descargas hídricas nos corpos receptores traz questionamentos quanto à compatibilidade desses efluentes com o ambiente aquático e, conseqüentemente, ao homem, uma vez que as águas desses corpos receptores são, na maioria das vezes, utilizadas para fins de captação e destinadas ao abas-

tecimento público.

Como citado anteriormente nesta revisão, estudos têm revelado que o tratamento convencional utilizado pelas Estações de Tratamento de Água (ETA) não se mostram eficientes na eliminação da mutagenicidade pré-existente na água bruta.

Contudo, para uma avaliação de risco desses lançamentos potencialmente genotóxicos, devem ser considerados diversos fatores, tais como: o comportamento e destino dos compostos responsáveis pelo efeito mutagênico sob as condições encontradas no ambiente, o coeficiente de diluição específico para cada descarga em questão e também a capacidade de mistura, além da estimativa do limite de risco permissível para o lançamento dos efluentes das indústrias papeleiras, uma vez que estes valores não foram ainda precisamente estabelecidos.

Além da referida estimativa de impacto de lançamento dos efluentes das indústrias de celulose, a quantificação e avaliação da mutagenicidade presente nestes efluentes é de considerável importância, uma vez que tem sido prática comum no mercado internacional na última década impor barreiras comerciais relacionando questões ambientais às indústrias do setor papeleiro destinadas à exportação, ocasionando muitas vezes a necessidade de tomada de medidas emergentes e quase sempre onerosas.

Neste sentido, o núcleo de estudos ambientais para o setor papeleiro do Depto. de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP vem desenvolvendo estudos quanto à avaliação do potencial mutagênico presente nos efluentes de algumas das maiores indústrias de celulose instaladas no Brasil. Essas pesquisas vão desde o domínio da tecnologia dos ensaios genotoxicológicos utilizados como ferramenta na detecção, até a correlação dos valores encontrados com os tipos de processos de polpação e seqüências de branqueamento adotadas, além, é claro, da avaliação da eficiência de remoção das Estações de Tratamento de Efluentes instaladas nas respectivas indústrias.

Um pequeno número de grandes indústrias instaladas no Brasil são responsáveis pela maior parte de toda a produção de celulose nacional. De forma geral, estas indústrias estão muito bem alinhadas tecnologicamente, tanto para o processo de produção como para o tratamento de resíduos. Neste sentido, visto

o histórico apresentado na literatura em nível mundial, é de se esperar algo muito semelhante na avaliação das indústrias que serão aqui estudadas. Dos métodos e processos citados como eficientes na diminuição da geração *in plant* e na remoção/redução dos compostos mutagênicos pelos métodos externos de tratamento, pode-se observar que estes são praticados na quase a totalidade das indústrias nacionais.

Cabe comentar que, assim como os dados referentes à toxicidade aguda e crônica, e também aos valores de organoclorados expressos na forma de AOX observados para as indústrias em questão, estão de acordo com os limites de lançamento mundialmente estipulados e praticados, a avaliação da mutagenicidade deve, da mesma forma, apresentar-se dentro do espectro esperado para tais tipos de lançamentos.

A mutagenicidade apresenta-se como um efeito em potencial inerente aos lançamentos das indústrias de celulose e e, por isso, deve ser corretamente estimada e diagnosticada, visto que se encontram instaladas nestas indústrias tecnologia suficiente tanto para prover menor geração, como para a eliminação dos compostos potencialmente mutagênicos. Desta forma, pode-se prevenir questões legais ou de mercado, nem sempre criteriosamente determinadas, apresentando-se a avaliação desta referida abordagem como um instrumento para atuais e futuras discussões.

Alguns dados preliminares, já obtidos para os efluentes de algumas fábricas avaliadas, confirmam tais estimativas, que reforça uma previsão de comportamento esperado para a questão da mutagenicidade.

Contudo, situações caso a caso devem ser suficientemente analisadas, no sentido de se traçar a melhor estratégia de gerenciamento quanto à previsão de impacto e na medida de risco envolvida para esta questão.

### Referências bibliográficas

APHA-American Public Health Association, 1992 "Mutagenesis- Salmonella Microsomal Mutagenicity Test" in: *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater - 18<sup>th</sup> Edition*. Washington, APHA, AWWA, WPCF., p.8.26-8.32.  
Ames, B.N.; Durston, W.E.; E. Yamasaki; Lee, F.D., 1973 "Carcinogens are Mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and

bacteria for detection" *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 70, 2281-2285.

Ander, P.; Erickson, H-E; Kolar, M.C.; Kringstad, K.P., 1977 "Studies on the Mutagenic Properties of Bleaching Effluents" *Svensk Papperstidning*, nº 14, p. 454-459.

Bjorseth, A.; Geroge, C.E.; Moller, M., 1979 "Determination of Halogenated Organic Compounds and Mutagenicity Testing of Spent Bleach Liquors" - *The Science of the Total Environment*, 11, p. 197-211.

Claxton, L.D.; Allen, J.; Auletta, A.; Mortelmans, K.; Nestmann, E.; Zeiger, E., 1987 "Guide for the Salmonella typhimurium/mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity" - *Mutation Research*, 189, p.83-91.

CETESB- Cia. de Tecnologia de Saneamento do Meio Ambiente, 1993 "Mutação Gênica Reversa em Salmonella typhimurium - Teste de Ames" São Paulo, 44p. (Norma Técnica, nº L5.620).

Erickson, K-E.; Kolar, M-C.; Kringstad, K., 1979 "Studies on the Mutagenic Properties of Bleaching Effluents-Part 2" *Svensk Papperstidning*, nr 4. p.95-104.

Erickson, K-E; Kringstad, K.P.; Sousa, F. de; Strömberg, L, 1982 "Studies on the Mutagenic Properties of Spent Bleaching Liquors" - *Svensk Papperstidning*, 85,nr9.

Höglund, C.; Allard, A-S.; Neilson, A.H.; Landner, L., 1979 "Is the Mutagenic Activity of Bleach Plant Effluents Persistent in the Environment?" - *Svensk Papperstidning*, nº 15, p.447-449.

Holmbom, B.R., Voss, R.H.; Mortimer, R.D.; Wong, A., 1981 "Isolation and identification of an Ames Mutagenic Compound Present in Kraft Chlorination Effluents" - *Tappy*, vol.64, nº 3, mar, p-172-174.

Holmbom, b.: Voss, R.H.; Mortimer, R.D.; Wong, A., 1984 "Fractionation, Isolation and Characterization of Ames Mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents" - *Environment Science Technology*, vol. 18, nº 5, p333-337.

Houk, V.S., 1992 "The Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents - A Review" - *Mutation Research*, 277, p91- 138.

Ionescu, L. G. e Moro, C.C., 1989 "Isolation and Identification of Toxic Chlorinated Organic Compounds Present in Black Liquor of Bleached Cellulose Pulp from Southern Brazil" - *Química Nova*, 12(1), p 108-110.

Kringstad, K.P.; Ljungquist, P.O.; Sousa, F. de; Strömberg, L., 1981 "Identification

and Mutagenic Properties of Some Chlorinated Aliphatic Compounds in the Spent Liquor from Kraft Pulp Chlorination" - *Environment Science Tecnology*, vol. 15, nº 5, may, p.562-566.

Kringstad, K.P.; Souza, F. de; Strömberg, L.M., 1984 "Evaluation of Lipophilic Properties of Mutagens Present in the Spent Chlorination Liquor from Pulp Bleaching" - *Environment Science Tecnology*, vol. 18, nº 3, p200-203.

Krinstrey, R.B., 1993 "An Review of Strategies for Reducing the Environmental Impact of Bleach-Plant Effluents" *Tappi Journal*, vol.76, nº 3, p.105-113.

Lee, E.G-H; Mueller, J.C.; Walden, C.C.; Stich, H., 1981 "Mutagen Properties of Pulp Mill Effluents" *Pulp & Paper Canada*, vol.82, nº 5 may, p T149-154.

Langi, A. e Priha, M., 1988 "Mutagenicity in Pulp Mill Effluents and in Recipient" - *Water Science Technology*, vol. 20, nº 2 p 143-152.

Maron, D.M. e Ames, B.M., 1983 "Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test" - *Mutation Research*, 113,p.173-215.

McKague, A.B.; Kolan, M-C.; Kringstad, K.P., 1988 "Nature and Properties of Some Chlorinated, Lipophilic, Organic Compounds in Spent Liquors from Pulp Bleaching - Liquors from Conventional Bleaching of Softwood Kraft Pulp" - *Environment Science Technology*, vol.22, n 5.

Mounter, A.H., 1990 "Caracterização da Carga Poluente do Efluente de branqueamento de Polpa Kraft" em: *Seminário de Branqueamento de Pastas Celulósicas - Assoc. Bras. Técnica de Celulose e Papel - ABTCP*. São Paulo.

Nestmann, E.R.; Lee, E. G-H.; Mueller, J.C.; Douglas, R.G., 1979 "Mutagenicity of Resin Acids Identified in Pulp and Paper Effluents using the Salmonella/mammalian Microsome Assay" - *Environmental Mutagenesis*, 1, p361-369.

Nazar, M.A.; Rapson, W.H., 1982 "pH Stability of some Mutagens Produced by Aquous Chlorination of Organics Compounds" *Environmental Mutagenesis*, 4: p-435-444.

Rannug, U.; Jenssen, D.; Ramel, C.; Erickson, K-E.; Krinstad, K., 1981 "Mutagenic Effects of Effluents from Chlorine Bleaching of Pulp Journal of Toxicology and Environmental Health, 7:", p.33-47.

Rosa, J.; Ortolano, M.R., Vitti, J. 1990 "Utilização de Ensaios Biológicos para

*Avaliação Toxicológica de Efluentes Industriais de Celulose e Papel* - Anais do 23º Congresso Anual de Celulose e Papel - ABTCP, São Paulo.

Rosa, J., 1993 "Formação e Natureza dos Organoclorados em Fábricas de Celulose, sua Quantificação Analítica Expressa na Forma de AOX e Conseqüências Ambientais Oriundas de seu Lançamento" Monografia entregue ao Depto. de Ciência Ambiental - USP. São Paulo-Brasil.

Smith, J.W. e Spraghe, J.B., 1992 "Compatibility of Pulp and Paper Effluents with the Aquatic Environment" - Pulp & Paper Canada, 93:6 p T157-161.

Solomon, K.; Bergman, H.; Hugget, R.;

Mackay, D.; McKague, B., 1993 "A Review and Assessment of the Ecological Risks Associated with the Use of Chlorine Dioxide for the Bleaching of pulp" Prepared for the Alliance for Environmental Technology by a Science Review Panel, Ontario-Canada, p.1-28.

Stockmann, L.; Strömberg, L.; Sousa, F. de, 1980 "Mutagenic Properties of Bleach Plant Effluents: present state of knowledge" - Cellulose Chemistry and Technology, 14, p.514-526.

Valent, G.U.; Sato, M.I.Z.; Coelho, M.C.L.S.; Coimbra, C.A.; Sanchez, P.S., 1993 "Monitoring São Paulo State Rivers in Brazil for Mutagenic Activity using the Ames Test" - Environmental Toxicology

and Water Quality, vol.8, p.371-381.

Valent, G.U., 1990 "Avaliação da Atividade Mutagênica de Extratos Orgânicos de Corpos d'água do Estado de São Paulo através do Teste de Ames" - Dissertação de Mestrado, Unicamp (Universidade Estadual de Campinas), S.P.

Voss, R.H.; Wearing, J.T.; Mortiner, R.D.; Kovacs, T.; Wong, A., 1980 "Chlorinated Organics in Kraft Bleachery Effluents" - Paperi ja Puu, nº 12, p. 809-814.

Walden, C.C.; Howard, T.E., 1977 "Toxicity of Pulp and Paper Mill Effluents" - Tappi, vol. 60, nº 1, jan. p.122-125 ▲

## DUPLA DA IMS QUE GANHA O JOGO PARA O BRASIL HÁ MAIS DE 30 ANOS



Válvula H



Válvula L

A IMS - Indústria Mecânica de Salvador está expandindo suas Válvulas Esfera junto aos mercados de gás, papel/celulose e indústrias químicas e petroquímicas, com a mesma qualidade de quem é a principal fornecedora da Petrobrás há mais de três décadas.



**IMS - INDÚSTRIA MECÂNICA DE SALVADOR S.A.**

Fábrica - Via Urbana, km 2 n. 1988 - Centro Industrial de Aratu

43700-000 - Simões Filho - Bahia - Tel.: 071-594-8577

Telex: 71.1033 - Fax 071-594-9137

Escritórios: 071-594-8577 - 021-262-4143 - 011-288-7720