

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**ANDRESSA TWORKOWSKI MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EFLUENTE DO TERMINAL  
PETROQUÍMICO ALMIRANTE SOARES DUTRA (OSÓRIO-RS-BRASIL)  
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa***

**IMBÉ  
2013**

**ANDRESSA TWORKOWSKI MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EFLUENTE DO TERMINAL  
PETROQUÍMICO ALMIRANTE SOARES DUTRA (OSÓRIO-RS-BRASIL)  
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali**

**Coorientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso Casali**

**IMBÉ**

**2013**

M149a Machado, Andressa Tworkowski

Avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa* / Andressa Tworkowski Machado. – Imbé, 2013.

45 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas com ênfase em gestão ambiental marinha e costeira, Imbé/Osório, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali  
Coorientador: Valesca Veiga Cardoso Casali

1. Indústria Petroquímica. 2 Mutagenicidade. 3. Sistema Teste de *Allium cepa*. I. Casali, Emerson André, orient. II. Casali, Valesca Veiga Cardoso, coorient.. III. Título.

**ANDRESSA TWORKOWSKI MACHADO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EFLUENTE DO TERMINAL  
PETROQUÍMICO ALMIRANTE SOARES DUTRA (OSÓRIO-RS-BRASIL)  
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovada em ...../...../.....

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira  
Centro de Estudos em Estresse  
Oxidativo. Depto. de Bioquímica, ICBS,  
UFRGS

---

Profa. Dra. Carmen C. R. Saavedra  
Depto. de Genética, IB, UFRGS

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Ott  
Coordenador da atividade de TCC 2

## AGRADECIMENTOS

À minha guia espiritual *Yemanjá* por me conceder saúde, força e persistência para vencer os momentos de desânimo;

À empresa onde trabalho, Petrobrás Transporte S/A, em especial ao Coordenador de Operação, Sandro Muller, pela flexibilização nos horários de trabalho para que eu pudesse assistir às aulas na faculdade;

Ao meu supervisor e colegas de grupo por entenderem minha ausência e apoiarem minha luta;

Ao colega Heleno pelas permutas de turno para que eu pudesse comparecer às aulas;

Aos colegas de classe pelos bons momentos que passamos juntos e pelas amizades que cultivei;

Aos professores que me deram a oportunidade de crescer intelectualmente a cada dia;

Aos orientadores deste trabalho, Emerson e Valesca, pelo apoio técnico e amizade;

À bibliotecária Stella, pelo apoio imprescindível na finalização deste trabalho e, igualmente ao Ângelo, por toda ajuda e orientação ao longo do curso.

Ao meu esposo, Maicon, por compreender minha falta em alguns momentos e por manifestar admiração pela minha luta em conciliar casa, trabalho e faculdade.

## RESUMO

Os recursos hídricos relacionados com as atividades das indústrias petroquímicas merecem especial atenção devido ao possível potencial mutagênico e carcinogênico dos resíduos contidos nos seus efluentes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra, localizado no município de Osório, RS, através do sistema teste de *Allium cepa* (cebola). As amostras do efluente foram coletadas na saída do Separador de Água e Óleo do terminal e 12 exemplares de *Allium cepa* foram utilizados para o Teste de Mutagenicidade através do método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI *et al.* O potencial genotóxico foi avaliado pela quantificação de micronúcleos e outras aberrações cromossômicas. O potencial citotóxico foi estimado pelo cálculo do índice mitótico. Os resultados apontam que o efluente proveniente do Separador de Água e Óleo do TEDUT é potencialmente mutagênico. Esse efeito pode ser evidenciado pela sua capacidade em promover alterações em células meristemáticas de *Allium cepa*, tais como, células portadoras de brotos nucleares, micronúcleos e células binucleadas. Constatou-se também um aumento no índice de proliferação celular das raízes de *Allium cepa* tratadas com efluente quando comparadas ao controle negativo, o que confere ao efluente potencial citotóxico. Tais resultados levam a conclusão que ensaios de toxicidade refletem o efeito da interação de todos os constituintes do efluente sobre os organismos-teste, sendo que, mesmo efluentes perfeitamente enquadrados nos padrões químicos de emissão estabelecidos pela legislação, podem apresentar toxicidade. Sendo assim, embora as análises e os ensaios não garantam a confirmação das causas da toxicidade, podem permitir um ponto de partida para a sua minimização.

**Palavras chave:** Aberrações Cromossômicas. Índice Mitótico. Indústria Petroquímica. Micronúcleo. Mutagenicidade. Sistema Teste de *Allium cepa*.

## ABSTRACT

Water resources related to the petrochemical industries activities deserve special attention due to possible mutagenic and carcinogenic potential of the residue contained in their effluents. This study aimed to evaluate the mutagenic potential of the Petrochemical Terminal Almirante Soares Dutra effluent, located in the city of Osório, RS, by using the test of *Allium cepa* (onion). Samples of the effluent were collected at the exit of Oil and Water Separator terminal's and 12 units of *Allium cepa* were used for mutagenicity test by the method proposed by FISKESJÖ with the adjustment suggested by MENEGUETTI *et al.* The genotoxic potential was evaluated by quantification of micronuclei and chromosomal alterations. The cytotoxic potential was estimated by calculating the mitotic index. The results indicate that the effluent from the Oil and Water Separator of TEDUT is potentially mutagenic. This effect can be attributed to its ability to promote changes in meristematic cells of *Allium cepa*, such as cells carrying nuclear buds, micronuclei and binucleate cells. It was also found an increase in the cellular proliferation index of *Allium cepa* roots treated with the effluent compared to the negative control, which gives the effluent cytotoxic potential. These results lead to the conclusion that toxicity tests reflect the effect of the interaction of all effluent constituents on the test organisms, and that even effluents perfectly framed in chemical emission standards established by legislation, can cause toxicity. Thus, although analyzes and tests do not guarantee confirmation of the causes of toxicity they may be a starting point, may allow a starting point for its minimization.

**Keywords:** Chromosomal Aberrations. Mitotic Index. Petrochemical Industry. Micronucleus. Mutagenicity. *Allium cepa* Test System.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Mapa 1 - Lagunas possivelmente afetadas.....	12
Mapa 2 – [Localização do Terminal Almirante Soares Dutra].....	20
Fotografia 1 - Imagem aérea da área industrial do TEDUT.....	21
Fotografia 2 - Fotografia do Separador de Água e Óleo do TEDUT.....	23
Fotografia 4 - Fotografia do cultivo de <i>Allium cepa</i> em efluente e água deionizada.	27
Fotografia 5 - Preparação das lâminas para análise microscópica.....	28
Fotografia 6 - Alterações interfásicas encontradas em células do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> .....	31
Gráfico 1 - Índice mitótico, alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> em amostras de efluente e sistema controle.....	32
Fotografia 7 - Alterações mitóticas encontradas em células do meristema radicular de <i>Allium cepa</i> .....	32



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros ambientais monitorados e limites de emissão.....	24
Tabela 2 - Índice mitótico, alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> em amostras de efluente e sistema controle.....	30
Tabela 3 – Tipos de alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> em amostras de efluente e sistema controle.....	30
Tabela 4 - Número médio de células em interfase e células em mitose por 1000 células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> analisadas em amostras de efluente e sistema controle.....	33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 O SISTEMA LAGUNAR TRAMANDAÍ-ARMAZÉM.....	12
2.2 O PETRÓLEO COMO AGENTE MUTAGÊNICO.....	13
2.3 BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE AMBIENTAL.....	14
2.4 <i>Allium cepa</i> COMO ORGANISMO TESTE.....	15
2.5 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE EM ESTUDOS AMBIENTAIS.....	16
<b>2.5.1 Teste de micronúcleo (MN).....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.2 Índice de alterações cromossômicas.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.3 Índice mitótico (IM).....</b>	<b>19</b>
<b>3 ÁREA DE ESTUDO .....</b>	<b>20</b>
3.1 O TERMINAL ALMIRANTE SOARES DUTRA – TEDUT.....	21
<b>3.1.1 O Separador de Água e Óleo – SÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2 Parâmetros ambientais monitorados.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
4.2 AMOSTRAGENS.....	26
4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA.....	27
<b>4.3.1 Alterações Interfásicas (AI).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Alterações Mitóticas (AM).....</b>	<b>29</b>
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os meios bióticos, o meio aquático é um dos mais preocupantes em relação aos impactos causados pela indústria petrolífera em decorrência de vazamentos acidentais de óleos, seus derivados e efluentes das refinarias de petróleo. Sabe-se que vazamentos de óleo podem levar a um sério comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, bem como conferir sérios riscos à vida dos organismos expostos. A detecção destes produtos e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal, vegetal e humana. Este trabalho tem como tema a avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra, (Osório, RS, Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa*.

O conhecimento do potencial mutagênico deste efluente é de suma importância, considerando o fato de seu lançamento ser feito na Lagoa Armazém, corpo d'água pertencente ao complexo lagunar estuarino Tramandaí-Armazém, cujas águas se comunicam com o Oceano Atlântico através de um canal. Esta ligação entre as lagoas costeiras do RS, estabelecida por canais naturais, pode facilitar a disseminação de contaminantes por diversos ambientes.

Apesar dos cuidados da empresa responsável em atender os parâmetros de emissão de efluentes estabelecidos pela legislação vigente, até o presente momento, a avaliação da toxicidade aguda é único estudo biológico realizado com o efluente que é direcionado a Lagoa do Armazém. Assim, a análise do potencial mutagênico através do sistema teste de *Allium cepa* pode ser de suma importância na adequação dos sistemas de controle de efluentes. Posteriormente, os resultados obtidos podem gerar um panorama atual do sistema de monitoramento ambiental utilizado pela empresa e suscitar novas intervenções no sentido de minimizar os riscos para a natureza e a população do entorno.

O presente trabalho caracteriza o petróleo com especial foco para potencial mutagênico deste produto, deixando clara a importância do uso de bioindicadores de qualidade ambiental e como o organismo *Allium cepa* pode ser utilizado para o controle de riscos relacionados à contaminação de recursos hídricos por hidrocarbonetos. Posteriormente, através da caracterização da área de estudo e da apresentação das medidas já adotadas relacionadas ao controle do efluente gerado

pelo terminal petroquímico em questão, é possível definir um panorama atual do sistema de monitoramento ambiental utilizado pela empresa. Por fim, frente a este grupo de práticas, é realizada uma análise do potencial mutagênico do efluente através do teste de micronúcleo em *Allium cepa* indicando os resultados obtidos nos ensaios com amostra do efluente e amostra controle.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de possíveis danos celulares e genéticos, decorrentes da exposição a doses residuais de hidrocarbonetos no organismo teste *Allium cepa* (cebola) e contribuir com informações sobre os potenciais efeitos do petróleo e derivados sobre o meio ambiente local, além de fornecer subsídios que possam servir de alerta para possíveis efeitos sobre o homem.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

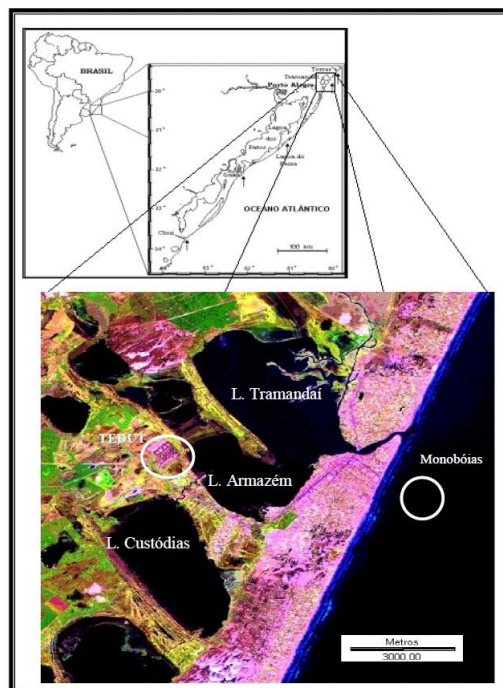
- Determinar o índice de alterações interfásicas por 1000 células dos meristemas radiculares de *Allium cepa* germinados nas amostras do efluente;
- avaliar possíveis variações no índice mitótico em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- identificar e quantificar alterações mitóticas em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- verificar se há significância estatística entre as amostras analisadas e o sistema controle.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os tópicos que seguem apresentam o embasamento bibliográfico necessário ao entendimento e execução deste trabalho.

### 2.1 O SISTEMA LAGUNAR TRAMANDAÍ-ARMAZÉM

O Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT) está situado na margem oeste da Lagoa Armazém. Morfologicamente, um pontal arenoso de orientação NW/SE separa, parcialmente, os dois corpos de água que formam o complexo estuarino Tramandaí-Armazém. A Lagoa Tramandaí está situada a NE do pontal, enquanto que a Lagoa do Armazém situa-se a SW (Mapa 1).



Mapa 1 - Lagunas possivelmente afetadas  
Fonte: Lima, 2004.

O Rio Tramandaí, responsável pelo maior aporte de água de doce para o sistema, está situado ao Norte. Ao Sul, na lagoa do Armazém, encontra-se o Rio Camarão responsável pela comunicação destes dois corpos com a lagoa das

Custódias. Este canal interlagunar tem a função de aporte de água doce para o sistema Tramandaí – Armazém. No entanto, quando ocorre reversão de fluxo no sentido norte-sul, transmite água salina para as Lagoas das Custódias e Gentil, mais ao Sul (TABAJARA; DILLENBURG, 1997).

## 2.2 O PETRÓLEO COMO AGENTE MUTAGÊNICO

Sabe-se que o petróleo apresenta uma composição química complexa, variável e influenciada pelas condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. Entretanto, independentemente de sua composição, o petróleo apresenta diversos efeitos deletérios aos organismos expostos, podendo causar, mesmo em concentrações muito baixas, desde efeitos tóxicos crônicos, como diminuição ou inibição da capacidade reprodutiva, até efeitos genotóxicos e mutagênicos. Desta maneira, impactos causados por derrames de óleo não estão apenas associados ao volume derramado, pois pequenos vazamentos podem causar severos danos às áreas atingidas e aos organismos expostos. (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Dentre os ambientes afetados, o meio aquático tem recebido atenção especial, pois é alvo direto de contaminações derivadas de vazamentos de oleodutos e navios petroleiros, além de despejos dos efluentes das refinarias. Devido ao possível potencial mutagênico e carcinogênico dos químicos contidos nesses efluentes, os recursos hídricos relacionados com as atividades destas indústrias têm sido foco de estudo de pesquisadores preocupados com a poluição tanto marinha como de água doce (ALZIEU, 2000; GODWIN, 2001).

No caso de acidentes envolvendo derramamento de óleo, a maior preocupação ambiental é atribuída principalmente aos componentes polares e de baixo peso molecular como os hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (INCARDONA *et al.*, 2004; LEE; ANDERSON, 2005; PACHECO; SANTOS, 2001), que tendem a volatilizar ou solubilizar-se com a água e serem lixiviados para fora da mancha de óleo constituindo a chamada Fração Solúvel do Petróleo (FSP). Esta fração do petróleo é extremamente danosa aos ecossistemas aquáticos uma vez que

apresenta alta toxicidade para os organismos vivos, sendo uma séria ameaça à biodiversidade desses ambientes (SARKAR *et al.*, 2006).

Entre os grupos de substâncias orgânicas de maior reatividade biológica para diferentes organismos estão os PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), compostos classificados pela USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) como mutagênicas e carcinogênicas através da geração de aductos no DNA (HENNER *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 1998).

A cadeia produtiva da indústria petroquímica ligada à produção de derivados, em expansão a cada dia, deve considerar a segurança do meio ambiente já que estas atividades são altamente impactantes desde a extração até o refino dos produtos. Desta forma, a garantia e manutenção de ambientes seguros requerem testes padrões para avaliação de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos de fácil execução e de rápida obtenção de resultados, além de serem facilmente reproduzíveis (FISKESJÖ, 1985).

### 2.3 BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE AMBIENTAL

A caracterização dos efluentes líquidos industriais tem sido realizada, sobretudo, através de análises físico-químicas, sendo que as concentrações máximas são estabelecidas na legislação vigente por padrões numéricos de emissão. Pesquisas têm demonstrado que os resultados obtidos através dessas análises dificilmente fornecem informações sobre o efeito aditivo ou sinérgico de várias substâncias que interagem juntas sobre a biota do ambiente aquático. Enquanto a análise química identifica e quantifica isoladamente as substâncias em um efluente industrial, o ensaio biológico detecta a reação de organismos vivos a uma situação global, o efluente industrial como um todo ou uma amostra de água de um corpo receptor ao qual são lançados despejos industriais (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990).

A Bioindicação não trata predominantemente da indicação da existência, do vigor ou da intensidade de um fator ambiental, mas sim da reação do sistema biológico, ou bioindicador. Trata-se do reconhecimento do efeito de um fator ambiental. Nisso baseia-se a principal diferença entre o monitoramento de

parâmetros físicos e químicos da bioindicação de fatores ambientais. No monitoramento físico-químico aborda-se a qualidade e quantidade de fatores, podendo-se eventualmente inferir-se sobre os efeitos biológicos, enquanto que na bioindicação obtêm-se informações sobre os efeitos no sistema biológico, podendo-se eventualmente inferir sobre a qualidade e quantidade do fator estressor (MATSUURA, 2000).

Organismos testes são empregados em metodologias de laboratório altamente padronizadas, cujos resultados são também altamente reprodutíveis. Estas metodologias têm sido amplamente utilizadas no monitoramento da qualidade da água.

#### 2.4 *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE

A utilização de sistemas-teste vegetais na avaliação de certas classes de carcinógenos como a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), é vista com certa restrição por alguns autores pelo fato de haver necessidade de um complexo sistema de metabolização para ativar o potencial genotóxico destas substâncias, metabólitos estes, presentes em mamíferos, incluindo o homem (UHL *et al.*, 2003; RANK; NIELSEN, 1998). No entanto, há anos, vêm sendo realizados estudos de sistemas de ativação metabólica em plantas, e a capacidade de vegetais superiores ativarem promutágenos em mutágenos já foi comprovada por vários pesquisadores (HIGASHI, 1988; PLEWA *et al.*, 1996; PLEWA *et al.*, 2003). Todavia, é sabido que alguns dos metabólitos produzidos por esta via diferem daqueles gerados pela via de metabolização de mamíferos.

A importância do sistema-teste de *Allium cepa*, para avaliação da genotoxicidade de PAHs, foi mostrada por Fiskejö em 1985 com a utilização de benzo[a]pireno, em dissonância com a argumentação exposta acima. Conforme o autor, as células de *Allium cepa* apresentam um sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos e, embora outros sistemas-teste se mostrem mais sensíveis, os resultados gerados pelo teste de *Allium cepa* devem ser considerados como alerta, advertindo para a possibilidade de ação semelhante em outros organismos. Segundo Rank e Nielsen (1993), a sensibilidade do teste de



mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores.

*Allium cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e mutagenicidade devido às características que apresenta na cinética de proliferação de suas raízes, o que gera um grande número de células em divisão. Além disso, apresenta alta tolerância a diferentes condições de cultivo, grande disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e possui cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987). A utilização do teste de *A. cepa* também é uma alternativa interessante devido ao baixo custo, não exigência de equipamentos elaborados para sua realização e dispensar a aprovação em Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

O *Allium* Teste fornece dois tipos informações sobre toxicidade. Em escala macroscópica, pode ser observada a formação de tumores e avaliados o crescimento de raízes e presença de raízes torcidas. Ao nível microscópico, a análise da taxa de divisão celular pode ser definida pelo Índice mitótico. Além disso, alterações cromossômicas, que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase e formação de micronúcleos, como indicadores de anormalidades no DNA, perfazem parâmetros microscópicos. (MONARCA *et al.*, 2000).

## 2.5 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE EM ESTUDOS AMBIENTAIS

A mutagenicidade é um efeito tóxico que danifica, especificamente, o material genético da célula, causando uma mudança no DNA ou no cromossomo. A mutagenicidade de uma substância química pode ser avaliada por diversos modos de ação, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta (TIMBRELL, 1999); presença de anormalidades e micronúcleos nas células. (MATSUMOTO, 2006; FERNANDES 2007; CARITÁ, 2008).

Os testes biológicos de mutagenicidade com plantas consistem em verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular (FISKESJÖ, 1985; MELLO *et al.*, 2004). Esses testes fornecem parâmetros significantes para avaliar a toxicidade de misturas

complexas de despejos sem saber sobre sua composição química (CHANDRA *et al.*, 2005), podendo servir como primeiro indicador de dano e poluição ambiental na água, ar, e solo, os elementos essenciais à vida (CABRERA *et al.*, 1999).

Micronúcleos e aberrações cromossômicas foram usados como parâmetros de genotoxicidade e índice mitótico como parâmetro de citotoxicidade para testes realizados com *Allium cepa* (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996; MARCANO *et al.*, 2004; CHANDRA *et al.*, 2005).

Testes de Aberrações cromossômicas, utilizando-se *Allium*, padronizados por Fiskejő (1985), são realizados desde o final da década de 30. Esse teste constitui em um ensaio muito sensível e confiável para monitoramento ambiental. Ele é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas em espécies do gênero *Allium* por meio do registro da atividade mitótica (índice mitótico) e anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes dessas plantas (VIDAKOVIÉ-CIFREK, 2002).

### **2.5.1 Teste de micronúcleo (MN)**

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é considerado um dos melhores métodos para estudos de monitoramento ambiental relacionado aos efeitos mutagênicos (GAVRONSKI, 2008). Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, podendo ser avaliados para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de teste com roedores e plantas (SILVA *et al.*, 2011).

O ensaio do micronúcleo avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, caracterizando a potencialidade mutagênica do agente estudado. A técnica é aplicada, principalmente, em monitoramento da poluição ambiental e usa diversos organismos testes (roedores, peixes e plantas, dentre outros) como bioindicadores.

O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo. A sua formação resulta de uma

lise na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de agente mutagênico quando as células da camada basal da raiz estão em divisão (STICH; ROSIN, 1983; STICH; ROSIN; VALLEJERA, 1984). São constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes (BELIËN *et al.*, 1995) que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da divisão mitótica (STICH; ROSIN, 1983). Portanto, células micronucleadas podem refletir a incidência de eventos genotóxicos sobre os organismos vivos (BELIËN *et al.*, 1995).

Para que o micronúcleo seja visualizado é necessária uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, sendo, necessário fazer o cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea e raízes (VILLELA; LAU, 2003).

### **2.5.2 Índice de alterações cromossômicas**

Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de mutagenicidade é o teste de alterações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK *et al.*, 2002).

Alterações cromossômicas em *Allium cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebras no DNA) ou aneugênico (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIÉ-CIFREK *et al.*, 2002). Este teste tem sido amplamente utilizado, principalmente, para se monitorar os impactos derivados de emissão de efluentes em rios (FISKEJÖ, 1993; RANK; NIELSEN, 1993; SMAKA-KINCL *et al.*, 1996).

### 2.5.3 Índice mitótico (IM)

Em plantas, a maior quantidade de células em divisões mitóticas se encontra no tecido meristemático. Esse tecido pode ser encontrado em diferentes órgãos das plantas e se caracteriza por não apresentar células diferenciadas. Para análise cromossômica mitótica o melhor meristema é o de raízes, devido principalmente ao maior volume celular e ao crescimento muito rápido. Além disso, as pontas de raízes absorvem mais facilmente soluções onde são mergulhadas. A obtenção de raízes para a análise cromossômica pode ser feita a partir de diferentes fontes. As mais comuns são sementes, bulbos e caules (GUERRA; SOUZA, 2002).

Índices mitóticos significativamente menores que aqueles do controle negativo podem indicar alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos e IM maiores que o controle negativo resultam do aumento na divisão celular, podendo ser prejudicial às células, levando a proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tumores (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

### 3 ÁREA DE ESTUDO

Subsidiária integral da Petrobras, a Transpetro opera por meio dos segmentos de Dutos e Terminais, Transporte Marítimo e Gás Natural. A atividade da Transpetro une as áreas de produção, refino e distribuição do Sistema Petrobrás. Dos campos de produção, o petróleo é transportado, por oleodutos e/ou por navios, para os terminais da Transpetro. Os terminais aquaviários estendem-se por toda a costa brasileira e bacia amazônica e são operados por meio de píeres, de monobóias, de quadro de bóias, de operações ao largo e de operações de GNL (gás natural liquefeito), estando presente ao longo dos 4.500km de rios e lagoas navegáveis. São a entrada e saída das diversas regiões produtoras de petróleo, refinarias e bases de processamento e distribuição.

O Efluente estudado é proveniente do Separador de Água e Óleo (SAO) do Terminal Almirantes Soares Dutra (TEDUT), situado no município de Osório, RS (Mapa 2).



Mapa 2 – [Localização do Terminal Almirante Soares Dutra, Osório, RS]  
Fonte: Google, 2013.

### 3.1 O TERMINAL ALMIRANTE SOARES DUTRA – TEDUT

O Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT) é um terminal oceânico não abrigado, constituído por dois sistemas de monobóias instalados em mar aberto, próximos à costa da cidade de Tramandaí (RS). As monobóias são projetadas para a amarração de navios nas operações de carga e de descarga de petróleo e derivados (nafta petroquímica, diesel, condensado petroquímico e gasolina). O terminal atende basicamente a Refinaria Alberto Pasqualini (Refap) e a petroquímica Brasken pelo gasoduto Osório-Canoas (Oscan).

No TEDUT são realizadas operações de carregamento e descarregamento de navios através do sistema de dutos terrestres, marítimos e monobóias; armazenamento de petróleo e seus derivados no parque de tanques; transferência de petróleo e seus derivados para a Refap através do sistema de dutos Oscan e recebimento e exportação de derivados da Refap por meio do sistema de dutos Oscan e sistema de dutos terrestres, marítimos e monobóias, respectivamente.

A área industrial do TEDUT está localizada na margem oeste da Lagoa Armazém, possui 19 tanques com teto flutuante que armazenam petróleo (cru) e derivados claros (gasolina, nafta petroquímica, condensado petroquímico e óleo diesel) e estações de bombeamento de petróleo e de derivados (Fotografia 1).



Fotografia 1 – Imagem aérea da área industrial do TEDUT  
Fonte: Imagem cedida pelo banco de imagens do TEDUT

Ciente de seu compromisso com as comunidades onde atua e com os ambientes que abrigam suas instalações, a Transpetro considera que a aplicação da Política de Gestão de QSMS (Qualidade, Segurança, Meio ambiente e Saúde) e suas diretrizes incluem a preocupação com a possível contaminação do solo e dos corpos d'água, a possível emissão de gases para a atmosfera, e a possível ocorrência de acidentes e doenças ocupacionais, envolvendo os trabalhadores e o entorno de suas instalações.

No que diz respeito à preocupação com a contaminação de corpos hídricos, o TEDUT, por situar-se às margens da Lagoa do Armazém, implantou um sistema de separação de água e óleo denominado SAO, para evitar que possíveis derramamentos de petróleo e derivados em sua área industrial venham a contaminar a lagoa.

### **3.1.1 O Separador de Água e Óleo – SAO**

Todo produto oriundo de derrames e vazamentos em áreas de parques de bombas, parque de tancagem e/ou de qualquer outro tipo de perda de produto que venha ocorrer nas instalações do TEDUT, é direcionado à canaletas que dirigem o produto misturado à água para o SAO, para evitar contaminação dos corpos d'água vizinhos ao terminal. Além do monitoramento contínuo através do Circuito Fechado de Televisão - CFTV realiza-se inspeções presenciais no SAO para, se for o caso, coletar o óleo presente.

O SAO é constituído por compartimentos interligados, denominados piscinas, onde o fluxo vindo da canaleta perde velocidade, facilitando a separação água/óleo. O processo de coleta do óleo é feito fisicamente, pela simples separação da mistura em duas fases, uma aquosa e uma oleosa. O óleo sobrenadante é direcionado às flautas coletoras – cilindros com rasgos longitudinais que coletam o óleo – com auxílio de um soprador de ar comprimido. O conteúdo coletado nas flautas é enviado ao poço de coleta e, posteriormente, bombeado para um tanque de resíduo. A água proveniente do SAO é conduzida por meio de um canal para a lagoa do Armazém (Fotografia 2).



Fotografia 2 – Imagem do Separador de Água e Óleo do TEDUT: A - Sistema de piscinas de separação água/óleo; B – Saída do efluente para a Lagoa do Armazém; C - Vertedouro.  
Fonte: O autor, 2013.

Diariamente, são registradas a cada turno de trabalho (3 vezes ao dia) as medições de vazão e temperatura do efluente, colhidas no vertedouro de saída do SAO para monitorar o cumprimento aos padrões de descarte de efluentes exigidos na Licença de Operação do TEDUT, em que a vazão não deve ultrapassar



285m<sup>3</sup>/dia e a temperatura deve ser inferior a 40°C. Mensalmente, é efetuado o monitoramento físico-químico do efluente, nos termos da Licença de Operação que estabelece padrões de emissão a serem atendidos.

### 3.1.2 Parâmetros ambientais monitorados

A Licença de Operação concedida pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler<sup>1</sup> (FEPAM) ao TEDUT exige da empresa apresentar, mensalmente, até o décimo dia do mês seguinte, boletim da análise da saída do SAO, dos seguintes parâmetros e respectivos padrões de emissão:

Tabela 1 - Parâmetros ambientais monitorados e limites de emissão

PARÂMETROS	PADRÃO DE EMISSÃO A SER ATENDIDO
pH	entre 6,0 e 8,5
Nitrogênio Total	até 10mg/L
Cianetos	até 0,18mg/L
DQO	até 324mg/L
Óleos e Graxas	até 10mg/L
Fenóis	até 0,1mg/L
Sulfetos	até 0,2mg/L
Cádmio	até 0,09mg/L
Níquel	até 0,9mg/L
Manganês	até 2,0mg/L
Mercúrio	até 0,009mg/L
Chumbo	até 0,45mg/L
Cromo total	até 0,45mg/L
Benzeno	até 1,2mg/L
Tolueno	até 1,2mg/L
Xileno	até 1,6mg/L
Etilbenzeno	até 0,84mg/L

Fonte: Licença de Operação LO n° 5262 / 2012-DL

<sup>1</sup> Órgão responsável pelo licenciamento ambiental do estado do Rio Grande do Sul.

O atendimento aos padrões de emissão deve obedecer aos valores constantes nas Resoluções CONSEMA N.º128/2006 que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul e CONSEMA N.º 129/2006, que dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul.

Trimestralmente, a empresa deve apresentar relatório conclusivo de avaliação de toxicidade do efluente final, atendendo as condições da Resolução CONSEMA 129/2006 e Resolução CONSEMA 251/2010 que dispõe sobre prorrogação de prazo para cumprimento do Art. 9º da resolução CONSEMA 129/2006. O artigo 9º da referida Resolução apresenta uma tabela em que constam os valores máximos de toxicidade aguda, crônica e genotoxicidade que são permitidos para lançamento de efluentes em corpos hídricos superficiais. Além dos padrões de emissão, a tabela também apresenta prazos específicos para atendimento aos padrões de emissão de acordo com a vazão máxima de lançamento de efluente líquido do empreendimento, presente na Licença de Operação da empresa.

As análises dos parâmetros exigidos nesta Licença devem ser realizadas em laboratórios cadastrados na FEPAM e considerados aptos à realização das mesmas, de acordo com a Portaria nº 34/2009 – FEPAM. Atualmente, os ensaios são realizados pela empresa Bioagri Ambiental.

Semestralmente, até o décimo dia do semestre seguinte, é exigido do TEDUT relatório de análise crítica do automonitoramento do Separador Água-Óleo (SAO), informando as vazões e temperaturas de emissão do efluente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da ação mutagênica foi realizada pelo método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI e colaboradores. Análises químicas de hidrocarbonetos totais de petróleo foram realizadas para as amostras coletadas, com a finalidade de dar suporte às investigações biológicas.

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para avaliar a possível ação mutagênica do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra – TEDUT, foram utilizados bulbos de cebola (*Allium cepa*).

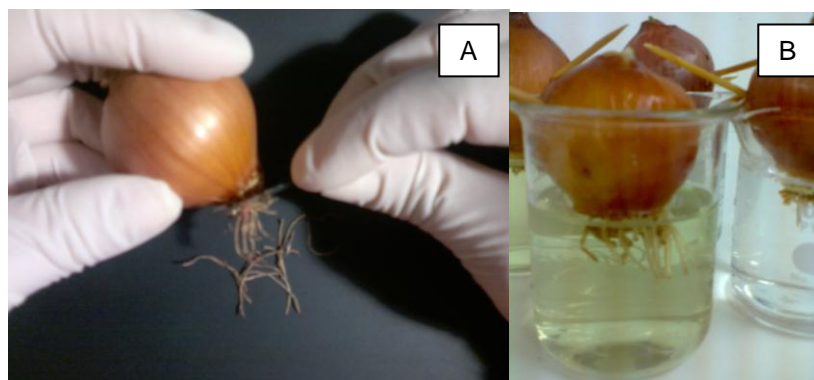
### 4.2 AMOSTRAGENS

As amostras de efluente foram coletas no vertedouro de saída do Separador de Água e Óleo do TEDUT em maio de 2013. As amostragens seguiram os padrões estabelecidos pela ABNT NBR 9897 (Planejamento de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores) e NBR 9898 (Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores).

Para efluentes industriais tratados por processos físico-químicos com curto tempo de retenção, a norma ABNT NBR 9897 recomenda a coleta de amostras compostas em períodos variados, que não devem exceder 24 horas. Seguindo esta recomendação, as coletas foram realizadas durante três turnos (manhã, tarde e noite), com intervalo de 8h entre as amostragens, compondo um total de 3 amostras, correspondentes a um dia de operação do SAO.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA

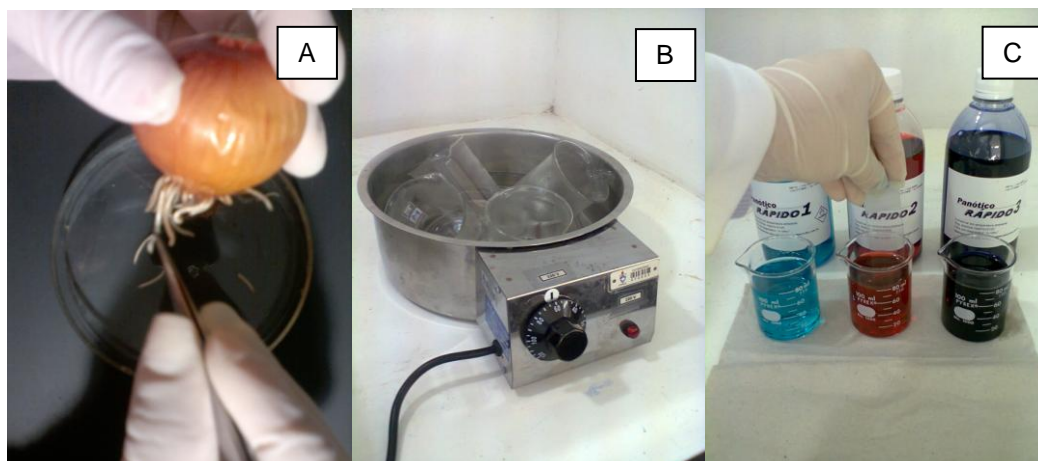
Foram utilizados 12 exemplares de *A. cepa*, de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinados e saudáveis, adquiridos em um mercado do Município Tramandaí. As raízes secas foram extraídas e 9 bulbos foram postos a germinar sobre frascos de 100 ml, protegidos da incidência direta da luz solar, com a parte inferior mergulhada em água coletada do vertedouro do Separador de Água e Óleo do TEDUT e 3 bulbos foram postos a germinar em água destilada. Para cada tratamento (amostra da manhã, tarde e noite) foram utilizadas 3 réplicas, totalizando nove bulbos. Três outros bulbos serviram de controle negativo (Fotografia 4).



Fotografia 4 - Cultivo de *Allium cepa* em efluente e água deionizada: A – Preparação do bulbo. B – Germinação das raízes.

Fonte: O autor, 2013.

Quando as raízes atingiram o comprimento de 0,5 a 3cm, foram coletadas para análise, lavadas em água destilada, hidrolisadas com HCl a 1mol/L por 10 minutos em banho-maria a 60°C e após, os frascos resfriados em água corrente. Após a lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram feitos esfregaços em duas lâminas por *A. cepa* (totalizando 24 lâminas) e aguardados 30 minutos em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as lâminas foram coradas com o Kit Panótico Rápido LB que é composto de três recipientes: o primeiro com triarilmetano a 0,1%, o segundo com xatenos a 0,1% e o terceiro com tiazinas a 0,1%, sendo as lâminas mergulhadas 10 vezes em cada recipiente, exceto no último, no qual foram mergulhadas 3 vezes com submersão de 1 segundo de duração na sequência acima descrita. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secas à temperatura ambiente (Fotografia 5).



Fotografia 5 - Preparação das lâminas para análise microscópica: A – Extração do meristema radicular; B – Hidrólise em HCl em banho-maria; C – Coloração das lâminas.  
Fonte: O autor, 2013.

A avaliação das aberrações cromossômicas consistiu na observação de alterações interfásicas e mitóticas em 6000 células para cada amostra de efluente coletada e sistema controle, sendo 1000 células por lâmina, para um total de 24 lâminas. A contagem foi feita em microscopia óptica, pelo método de varredura, com objetiva de 40x e ocular de 10x tendo um aumento de 400x.

#### 4.3.1 Alterações Interfásicas (AI)

As alterações interfásicas observadas foram células com micronúcleos, células binucleadas e brotos nucleares. O reconhecimento dos micronúcleos obedeceu os seguintes critérios: (a) deveria ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deveria ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) deveria estar no mesmo plano de foco do principal; (e) deveria estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que houvesse identificação clara do limite nuclear de ambos.

### 4.3.2 Alterações Mitóticas (AM)

Para a análise de Alterações Mitóticas foram consideradas aberrações como: pontes anafásicas, pontes telofásicas e atrasos cromossômicos, observados nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase).

### 4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para análise do efeito citotóxico, calculou-se o índice mitótico (IM) pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para determinar o IM foi utilizada a seguinte equação: **IM = NCM/NTC x 100**, em que **NCM** corresponde ao número de células em mitose e **NTC** ao número total de células analisadas.

A partir de valores obtidos sobre índices mitóticos, é possível avaliar o potencial de uma determinada substância em inibir ou aumentar a proliferação celular.

### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico TUKEY, variância (ANOVA), utilizando o Software SPSS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados, após análise das células meristemáticas expostas às amostras de efluente coletadas em maio de 2013 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Índice mitótico, alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* em amostras de efluente e sistema controle

TRATAMENTO	ÍNDICE MITOTICO	ALTERAÇÕES INTERFÁSICAS	ALTERAÇÕES MITÓTICAS
CONTROLE	4,15±0,55	5,00±2,00	0,50±0,50
EFLUENTE MANHÃ	*4,90±0,15	*15,00±1,00	5,36±1,76
EFLUENTE TARDE	*5,95±0,35	*19,00±1,23	3,50±1,15
EFLUENTE NOITE	3,47±0,35	*14,50±1,50	6,00±4,00

Fonte: O autor, 2013.

Nota: Média±DP.\*diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ ), de acordo com o teste TUKEY.

Alterações relacionadas com o crescimento da raiz e Índice Mitótico são parâmetros indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações como anomalias cromossômicas (*stickiness*, micronúcleos, pontes cromossômicas, entre outras), indicam genotoxicidade (FISKESJÖ, 1985).

No que diz respeito às anomalias nucleares, os testes realizados apontaram a presença de alterações interfásicas e mitóticas (Tabela 3).

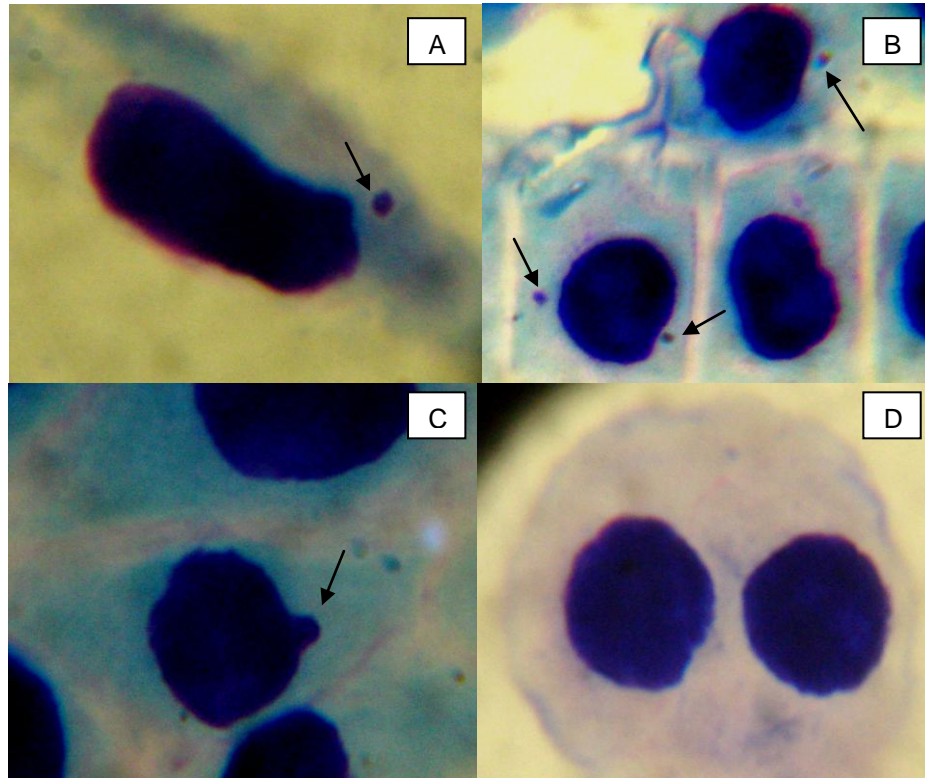
Tabela 3 – Tipos de alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* em amostras de efluente e sistema controle

TRATAMENTO	ALTERAÇÕES INTERFÁSICAS				ALTERAÇÕES MITÓTICAS		
	BR	MN	BN	Total	PT	AT	Total
CONTROLE	2,00	2,00	1,00	5,00	0,50	0,00	0,50
EFLUENTE MANHÃ	6,33	7,66	1,00	15,00	3,00	2,33	5,33
EFLUENTE TARDE	10,50	6,50	2,00	19,00	2,50	1,00	3,50
EFLUENTE NOITE	6,00	7,00	1,50	14,50	5,00	1,00	6,00

Fonte: O autor, 2013.

Nota: Número de ocorrências em 1000 células observadas. BR (Brotamento nuclear); MN (Micronúcleo); BN (Célula binucleada); PT (Ponte cromossômica); AT (Atraso mitótico).

As alterações na morfologia nuclear foram caracterizadas pela presença de brotos nucleares, micronúcleos e células binucleadas em todas as amostras de efluente testadas (Fotografia 6)



Fotografia 6 - Alterações interfásicas encontradas em células do meristema radicular de *Allium cepa*: A, B – Micronúcleo; C – Broto nuclear; D – Célula binucleada. a1000x.  
Fonte: O autor, 2013.

Os resultados verificados neste estudo sugerem um efeito mutagênico do efluente sobre as células de *Allium cepa*, uma vez que a indução de micronúcleos é comumente interpretada como evidência de danos genéticos resultantes de exposição a um agente mutagênico. A ocorrência de micronúcleos, segundo vários autores tem sido utilizada como indicativo de efeitos clastogênicos e aneugênicos.

As diferenças nas frequências foram significativas ao nível de 5% para todas as amostras, quando comparadas ao sistema controle (Gráfico 1).



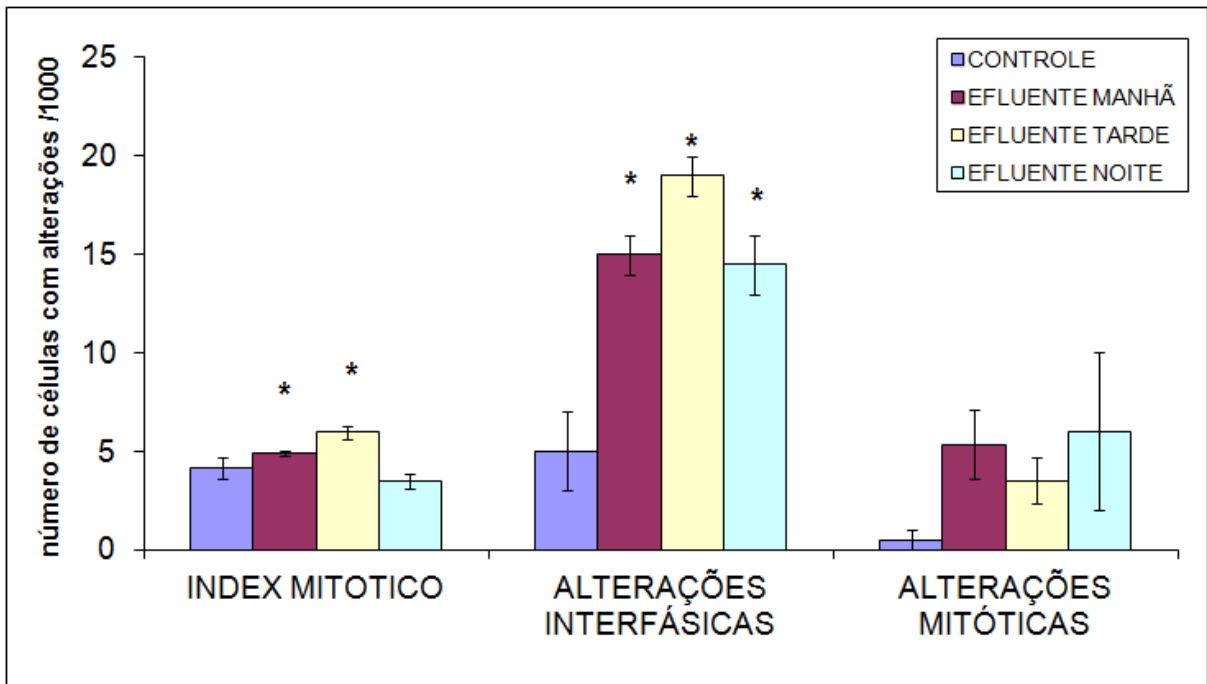
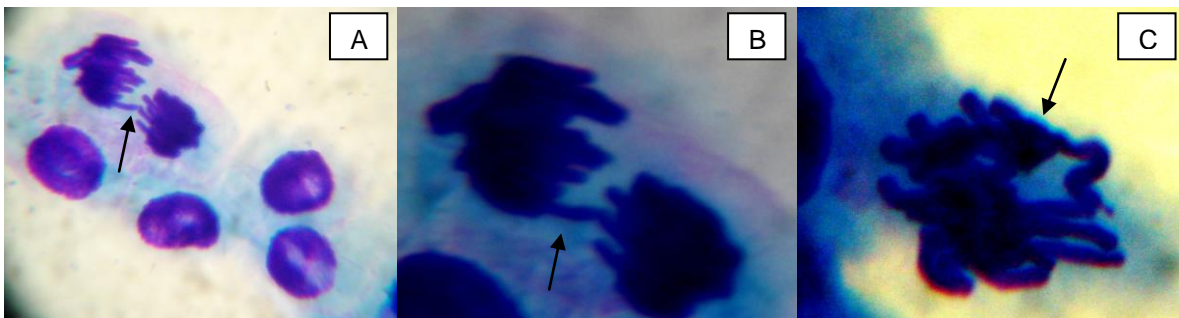


Gráfico 1: Índice mitótico, alterações interfásicas e alterações mitóticas encontradas em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* em amostras de efluente e sistema controle.

Fonte: O autor, 2013.

Nota: \*diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0.05$ ), de acordo com o teste TUKEY.

As alterações mitóticas observadas consistiram em pontes anafásicas e telofásicas e atrasos cromossômicos (Fotografia 7).



Fotografia 7 - Alterações mitóticas encontradas em células do meristema radicular de *Allium cepa*: A, B – Ponte anafásica; C – Atraso. a1000x.

Fonte: O autor, 2013.

Os danos genéticos detectados neste estudo são indicativos da presença de substâncias clastogênicas (indutoras de quebras) nas amostras testadas. Pontes anafásicas e telofásicas são exemplos clássicos desse mecanismo. Alterações cromossômicas como atrasos podem indicar problemas no fuso mitótico. A interrupção do fuso ou a sua formação incompleta pode promover uma segregação incorreta dos cromossomos para as células filhas, gerando anormalidade cromossômica numérica (VIDAKOVIC *et al*, 1993). Todavia, as alterações mitóticas

observadas nas amostras não apresentaram significância estatística se comparadas ao sistema controle (Gráfico 1).

Como parâmetro de citotoxicidade foram estimados apenas os índices mitóticos, não sendo observadas variações no comprimento das raízes. Para o cálculo do índice mitótico, foram consideradas as células em qualquer uma das fases da mitose.

Tabela 4: Número médio de células em interfase e células em mitose por 1000 células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* analisadas em amostras de efluente e sistema controle

TRATAMENTO	CÉLULAS EM INTERFASE	CÉLULAS EM MITOSE				Total
		P	M	A	T	
CONTROLE	958,50	16,50	15,50	7,50	2,00	41,50
EFLUENTE MANHÃ	951,00	21,33	11,33	14,66	1,66	49,00
EFLUENTE TARDE	940,50	36,50	4,00	9,00	10,50	59,50
EFLUENTE NOITE	965,34	16,00	11,66	4,66	2,33	34,66

Fonte: O autor, 2013.

Nota: P (Prófase); M (Metáfase); A (Anáfase); T (Telófase).

As análises do índice mitótico, referentes às radículas tratadas com o efluente coletado apresentaram um acréscimo significativo no índice de divisão celular, para as amostras coletadas nos períodos da manhã e tarde, quando comparadas ao teste controle (Gráfico 1). Índices Mitóticos maiores que o controle negativo resultam do aumento na divisão celular, podendo ser prejudicial às células, levando a proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tumores (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As análises físico-químicas do efluente indicaram que os parâmetros analisados em maio de 2013 não se acham presentes em níveis acima dos tolerados pela legislação CONSEMA 128/2006. As análises químicas do efluente apontam que a concentração de Hidrocarbonetos policíclicos Totais (TPH) na amostra coletada na mesma data das amostragens para o teste de mutagenicidade, é inferior a 0,2mg/L. O teor de óleos e graxas quantificado foi menor que 5,0mg/L, atendendo ao limite máximo estabelecido na Licença de Operação que é de 10mg/L. Da mesma forma, as concentrações de Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (BTEX) apresentaram resultados inferiores aos valores máximos permitidos pela resolução CONAMA 430 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA 357/2005.

No entanto, a alta sensibilidade do teste de *Allium cepa* aponta para possíveis contaminações não monitoradas pela norma técnica em questão. O teste é recomendado para uma rápida avaliação da genotoxicidade de efluentes, sendo uma valiosa ferramenta que pode ser usada como padrão em monitoramentos ambientais para se traçar a localização da fonte de contaminação, identificando influências de baixas concentrações de substâncias citotóxicas e genotóxicas em águas naturais (rios ou lagos), os quais são usados como recipientes para efluentes domésticos e industriais e que, posteriormente, têm suas águas utilizadas na agricultura e no abastecimento público (FISKESJÖ, 1985, 1989; RANK; NIELSEN, 1993; NIELSEN; RANK, 1994; SMAKA-KINCL *et al.*, 1996; AMARAL *et al.*, 2007; BARBÉRIO *et al.*, 2009).

O teste de *Allium cepa*, combinado com análises químicas, pode ser usado para se conseguir dados com bases científicas para regulamentação das descargas de substâncias potencialmente perigosas, lançadas no ambiente (NIELSEN; RANK, 1994). Também mostrou ser sensível nas análises de hidrocarbonetos do petróleo, representando um eficiente modelo para detectar tais contaminações (LEME; MARIN-MORALES, 2008), podendo ser utilizado em conjunto com outros sistemas-testes para se avaliar a contaminação de águas superficiais por esgotos, lodos de esgotos domésticos e industriais (GUPTA *et al.*, 2005).

Os resultados positivos no teste *Allium* devem ser considerados como uma indicação de que a amostra testada pode ser um perigo biológico também para os outros organismos (FISKESJÖ, 1989), podendo indicar a presença de certas substâncias citotóxicas, genotóxicas ou mutagênicas no ambiente (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996).

A Resolução CONSEMA nº 129/2006 não estabelece a periodicidade para a realização dos ensaios de toxicidade, porém, durante o período estabelecido para as adequações necessárias ao atendimento dos padrões de emissão de toxicidade, as empresas devem realizar análises periódicas para monitoramento e constatação do atendimento ao requisito legal. Atualmente, são realizadas análises de toxicidade aguda do efluente do TEDUT com periodicidade trimestral. Os ensaios são realizados com três organismos-testes de diferentes níveis tróficos, conforme estabelece a norma: o microcrustáceo *Daphnia similis* (consumidor primário), o peixe *Danio rerio* (consumidor secundário) e a bactéria *Vibrio fischeri* (decompositor). Ensaios de toxicidade aguda avaliam a capacidade do efluente de causar efeitos

danosos (em geral morte ou imobilidade) aos organismos-teste após um curto período de exposição à amostra (normalmente inferior a 96 horas). Se a amostra de efluente apresentar toxicidade aguda, significa que ela é tóxica o suficiente para matar os organismos, mesmo quando eles ficam expostos a ela por pouco tempo (AREZON *et al.*, 2011). Até o momento, todos os ensaios realizados com amostras do efluente do SAO não apresentaram efeito tóxico agudo para nenhum destes organismos-teste.

Contudo, segundo a resolução CONSEMA 129/06, depois de a empresa provar que seu efluente não mais possui toxicidade aguda e crônica é necessário comprovar que o efluente não possui potencial mutagênico. Para esta avaliação são utilizadas as análises de genotoxicidade, cujo objetivo é avaliar se o efluente possui potencial para causar efeitos sobre o material genético dos organismos do corpo receptor. O presente estudo apresenta os primeiros resultados relacionados à capacidade mutagênica do efluente em questão. Os indicativos positivos de potencial mutagênico do efluente servem para suscitar novas intervenções no sentido de minimizar os riscos para a natureza e a população do entorno.

Todavia, é muito arriscado tirar conclusões sobre a toxicidade do efluente, ou a ausência dela, com base em uma única avaliação. É impossível avaliar se a única análise realizada reflete a melhor ou a pior situação do efluente em relação a sua toxicidade. Um bom conjunto de dados sobre a toxicidade do efluente é o primeiro passo para resolver este potencial problema. O conjunto de dados deve refletir a variabilidade da composição do efluente, proporcionando uma visão mais ampla sobre a potencial toxicidade. Estes dados fornecem maior embasamento, permitindo que se dimensione o problema e se estabeleçam as ações a serem tomadas (AREZON *et al.*, 2011).

Diante dos resultados encontrados neste trabalho é possível perceber que mesmo efluentes perfeitamente enquadrados nos padrões químicos de lançamento de efluentes podem apresentar toxicidade. A toxicidade é resultante da interação de todos os constituintes do efluente, e não somente daqueles poucos parâmetros químicos analisados (AREZON *et al.*, 2011). Embora as análises e os ensaios não garantam a confirmação das causas da toxicidade, em alguns casos podem permitir um ponto de partida para a sua minimização.

Em sua maioria, os atuais sistemas de tratamento de efluentes foram construídos visando a uma eficiência na remoção de compostos químicos e

orgânicos, e cuja eficiência é baseada na análise química de alguns poucos compostos. As Estações foram projetadas para atender especificamente os padrões de emissão, até então fixados pelo Órgão Ambiental, mas, em geral, se desconhece o quanto elas são eficientes na remoção da toxicidade (AREZON *et al.*, 2011).

A legislação ambiental do Rio Grande do Sul exige mutagenicidade zero ao final dos prazos estipulados para este parâmetro, todavia, a presença de substâncias mutagênicas no efluente pode não ser solucionada rapidamente. Considerando que a vazão de efluente lançado pelo TEDUT encontra-se na faixa de 100 a 500m<sup>3</sup>/dia, o prazo estabelecido pela legislação para que o efluente apresente genotoxicidade zero é até o ano de 2020. Assim, estudos relacionados ao potencial genotóxico do efluente tornam-se importantes ferramentas para se tomar medidas corretivas. Além disso, ensaios com outros organismos são necessários, uma vez que diferentes organismos-teste podem apresentar diferenças em sua sensibilidade às substâncias presentes no efluente, respondendo diferentemente ao grau de toxicidade para um mesmo efluente.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que o efluente proveniente do Separador de Água e Óleo do TEDUT é potencialmente mutagênico. Esse efeito pode ser atribuído pela sua capacidade em promover alterações em células meristemáticas de *Allium cepa*, tais como, células portadoras de brotos nucleares, micronúcleos e células binucleadas. Este estudo com *Allium cepa* mostrou que existe uma forte correlação entre a composição química do efluente analisado e o desenvolvimento de certas alterações celulares. Constatou-se que as amostras coletadas em dois períodos do dia promoveram um aumento no índice de proliferação celular quando comparadas ao controle negativo, efeito possivelmente relacionado aos níveis de resíduos presentes nos efluentes, o que confere ao efluente potencial citotóxico. Esses resultados permitem inferir que os padrões de emissão de efluentes em corpos hídricos estabelecidos pela legislação vigente, por considerarem apenas parâmetros físico-químicos, não garantem a manutenção da qualidade ambiental, uma vez que as medições químicas não conseguem detectar perturbações sutis no ecossistema. Entretanto, vale ressaltar que os resultados apontados representam o estudo do efluente bruto, não considerando sua diluição no corpo hídrico receptor. Além disso, representam o efluente lançado em um único dia pelo Terminal Petroquímico, não servindo como um parâmetro de monitoramento ambiental de toxicidade. Neste sentido, sugere-se estudos futuros de acompanhamento de mutagenicidade do efluente em combinação com testes de mutagenicidade em amostras da Lagoa do Armazém.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, v. 65, n. 4, p. 666-673, 2006.
- ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, France, v. 258, n. 1-2, p. 99-102, aug. 2000.
- AREZON, A.; GERBER, W.; NETO, T.J.P. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais**. Porto Alegre: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011. 40p.
- BELIËN, J. A. M. *et al.* Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, Oxford, Inglaterra, v.16, n.10, p. 2395-2400, 1995.
- CABRERA, G.L.; RODRÍGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of leachates from a landfill using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 426, n. 2, p. 207-210, May 1999.
- CABRERA, G.L.; RODRÍGUEZ, D.M.G.; MARURI, A.B. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, NLv.426, n. 2, p. 201-206, May 1999.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, England, v. 72, n. 5, p. 722-725, June 2008.
- CHANDRA, S. *et al.* Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium test*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 347, n. 1-3, p. 46-52, July 2005.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, Calif., v. 88, n. 3, p. 252-259, July 2007.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to laboratory animals**, Nottingham, v. 21, n. 2, p. 139-149, Apr. 1993

GAVRONSKI, L. **Avaliação da mutagenicidade de amostras de água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa***. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Aplicada) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. *et al.* **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. (Série manuais, v. 6)

GODWIN, A. H. The biological chemistry of lead. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, GB, v. 5, n. 2, p. 223-227, Apr. 2001.

GOOGLE. **[Localização do Terminal Almirante Soares Dutra, Osório, RS]**. 2013. Disponível através de: <<https://maps.google.com.br/>>. Acessado em: 12 de janeiro de 2013.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002.

HENNER, P. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. **Analisis Magazine**, Paris, v. 25, n. 9 – 10, p. 56 – 59, Nov. 1997.

HIGASHI, K. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.197, n. 2, p.273-288, Feb. 1988.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological anomalies in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, Calif., v. 196, n. 2, p. 191–205, Apr. 2004.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, England, v. 50, n. 7, p. 705–723, July 2005.



LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 682, n. 1, p. 71-81, Aug. 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 650, n.1, p.80–86, Jan. 2008.

LIMA, G.T.N.P. **Estudo dos Hidrocarbonetos e Metais Pesados no Sistema Lagunar e Estuarino de Tramandaí – RS**. 2004. 162 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2004.

MARCANO, L. *et al.* Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, San Diego, Calif., v. 94, n. 2, p. 221 – 226, Feb. 2004.

MATSUMOTO, S.T. *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.29, n. 1, p.148-158, 2006.

MATSUURA, K. **Bioindicadores em Ecossistemas**. Unesco, 2000.

MELLO, M.L.S. *et al.* Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermóneges Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE PAULÍNIA E REGIÃO METROPOLITANA DE CAMPINAS, 2004, Paulínia. **Anais**. Campinas: UNICAMP, 2004. p. 1-8.

MONARCA, S. *et al.* The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, New York, US, v. 34, n.17, p. 4261-4269, Dec. 2000.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90- 103, Abr. 2011.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, US, v. 49, n. 1, p. 64–75, May 2001.

PLEWA, M.J. *et al.* Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.350, n. 1, p.163-171, Feb. 1996.

PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; JU, Y.H. The plant activation of aromatic amines into unique high molecular weight agents that induced genomic DNA damage in mammalian cells. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Poland: Katowice, 2003. p.39-60.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em merístemos**: la formación de intercambios entre cromátidas hermanas. 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v. 118, n. 1, p. 49-53. 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.418, n. 2-3, p.113-119, Oct. 1998.

RANK, J. *et al.* Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v.136, n. 1, p. 13-18. 2002.

SARKAR, A. *et al.* Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340, May 2006.  
Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-006-0069-1> >

SMAKA - KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOUKAM, T. M. A. M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, July 1997.

SILVA, F. C. *et al.* Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, Rondônia, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2011.

SINGH, A.K., SPASSOVA, D., WHITE, T. Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil,

water and plasma by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, NL, v.706, n. 2, p. 231 – 244, Mar. 1998.

SMAKA-KINCL, V. *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using then *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, July 1996.

STICH, H. F.; ROSIN, M. Quatitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, New York, US, v. 31, n. 3, p. 305-308. 1983.

STICH, H. F.; ROSIN, M.; VALLEJERA, M.O. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosa cells in Asian betel nut and tobacco chewers. **Lancet**, London, GB, n. 8388, p. 1204-1206, 1984.

TABAJARA, L. L.; DILLENBURG, S. Batimetria e sedimentos de fundo da Laguna de Tramandaí – RS. **Notas Técnicas**, Porto Alegre, n. 10, p. 21-33, 1997.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to Toxicology**. 2nd ed. London, GB : Taylor & Francis Ltd. 1999.

UHL, M. *et al.* Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Poland : Katowice, 2003. p.11-30.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z. *et al.* Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, US, v.43, n. 3, p. 284-291, Oct. 2002.

VILLELA, V. I; LAU, A. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J; EDRTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 158-159.

VIDAKOVIC, Z; PAES, D; TOMIC, M. Toxicity of ware drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, Berlin, v. 69, n. 3-4, p. 413-423, 1993.

## BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897** - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, jun. 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897** – Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, jun. 1987.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>> Acesso em: 15 de nov. 2012.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lunds-krona, v. 102, p. 99-112, 1985.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER. **Licença de Operação n. 5262 / 2012-DL**. Porto Alegre, 2012.

MENEGUETTI, D. U. de O. *et al.* Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 2, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/2161-0525/2161-0525-2-127.php?aid=4500>>. Acesso em: 12 de outubro de 2012.

RIO GRANDE DO SUL. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução n. 128 de 24 de novembro de 2006. Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 07 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.mp.rs.gov.br/ambiente/legislacao/id4887.htm>>. Acesso em: 15 de novembro de 2012.

\_\_\_\_\_. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução n. 129, de 24 de novembro de 2006. Dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**, 07

dez. 2006. Disponível em:

<<http://www.mp.rs.gov.br/ambiente/legislacao/id4890.htm>>. Acesso em: 15 de novembro de 2012.

\_\_\_\_\_. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução n. 251, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre a prorrogação de prazo para o cumprimento do Art. 9º da Resolução CONSEMA 129/2006 que define Critérios e Padrões de Emissão para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**, 24 dez. 2010. Disponível em:

<[http://www.sema.rs.gov.br/upload/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONSEMA%20n%C2%BA%20251\\_2010.pdf](http://www.sema.rs.gov.br/upload/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONSEMA%20n%C2%BA%20251_2010.pdf)>. Acesso em: 15 de novembro de 2012.