



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CENTRO DE ECOLOGIA**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**ISMAEL KRÜGER PESCKE**

**ANÁLISE GENOTOXICOLÓGICA DE ÁGUA SUPERFICIAL E ÁGUA INTERSTICIAL  
DO SEDIMENTO DA LAGOA NEGRA (P.E. ITAPUÃ, VIAMÃO/RS)**

Porto Alegre

2019

**ISMAEL KRÜGER PESCKE**

**ANÁLISE GENOTOXICOLÓGICA DE ÁGUA SUPERFICIAL E ÁGUA INTERSTICIAL  
DO SEDIMENTO DA LAGOA NEGRA (P.E. ITAPUÃ, VIAMÃO/RS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Ecologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientadora:** Profa. Dra. Luciane Oliveira Crossetti

**Coorientadora:** Profa. Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Porto Alegre

2019

**ISMAEL KRÜGER PESCKE**

**ANÁLISE GENOTOXICOLÓGICA DE ÁGUA SUPERFICIAL E ÁGUA INTERSTICIAL  
DO SEDIMENTO DA LAGOA NEGRA (P.E. ITAPUÃ, VIAMÃO/RS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas com ênfase em Ecologia na  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Luciane Oliveira Crossetti  
Instituto de Biociências - UFRGS

---

Profa. Dra. Vera Maria Ferrão Vargas  
Centro de Ecologia - UFRGS

---

Profa. Dra. Juliana da Silva  
PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - ULBRA

---

Profa. Dra. Mariana Vieira Coronas  
Coordenadoria Acadêmica - UFSM Cachoeira do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Krüger Pescke, Ismael

Análise genotoxicológica de água superficial e água intersticial do sedimento da Lagoa Negra (P.E. Itapuã, Viamão/RS) / Ismael Krüger Pescke -- 2019.

30 f.

Orientadora: Luciane Oliveira Crossetti.

Coorientadora: Vera Maria Ferrão Vargas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de  
Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto  
Alegre, BR - RS, 2019.

1. Ensaio salmonella/microsossoma. 2. mutagênese ambiental. 3. genética toxicológica. 4. biomarcadores de genotoxicidade. 5. Parque Estadual de Itapuã. I. Oliveira Crossetti, Luciane, orient. II. Vargas, Vera Maria Ferrão, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Breno e Hilza, que sempre me deram o suporte e o incentivo necessário, eles nunca deixaram aparas na minha trajetória pelo ensino, possibilitando que eu fosse o primeiro da família a ingressar na Universidade Federal. Obrigado por compreenderem também a minha ausência nos almoços de domingo. Às minhas irmãs, Vanessa e Patrícia, minha vida não seria a mesma sem a companhia de vocês.

À Dra. Luciane, obrigado por todos os ensinamentos que me transmitiu durante as disciplinas da graduação e, principalmente, pela indicação de necessidade de pesquisas em uma lagoa pouco conhecida e estudada — foi nesta aula que toda a ideia deste projeto teve início. Agradeço pelo apoio dado na realização desta pesquisa na Lagoa Negra e a burocracia feita para acessar o P.E. Itapuã. Obrigado à Divisão de Unidades de Conservação - SEMA/RS por aprovar esta pesquisa científica. Obrigado à Daniela que nos acompanhou na coleta; à equipe da FEPAM pelos ensinamentos e auxílios durante a amostragem; e à equipe do Parque de Itapuã que nos levou até a lagoa e também nos salvou dos perrengues (vulgo, rebocar da areia). O apoio de vocês foi fundamental!

À minha co-orientadora e líder, Dra. Vera, agradeço por toda assistência e aprendizado que tive até então como bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Mutagênese Ambiental/UFRGS e pela confiança depositada em mim para assumir esse projeto próprio. Admiro imensamente a capacidade da Vera em transmitir o conhecimento e incentivar seus alunos na desafiadora jornada da pesquisa científica. Os momentos de orientação foram primordiais para compreender o significado do nosso trabalho. Logo, agradeço também à FEPAM/RS pela bolsa PIBIC/CNPq concedida que permitiu a realização desta pesquisa.

Uma amiga que me auxiliou no preparo de todo o material dos ensaios, indispensável para o resultado da pesquisa, que me incentivou e fez o (im)possível para manter as tarefas do laboratório em dia, Lívia: tua ajuda foi essencial e eu sou muito grato por isso! As experiências vividas com os demais colegas foram cruciais para a minha perspectiva de postura como pesquisador.

À minha amiga e colega de profissão, Lara, agradeço por todas as risadas, momentos e horas de descontração durante o curso. As conversas, conselhos e apontamentos foram importantes para chegarmos às conclusões e adquirir experiências. A nossa convivência foi fundamental para desopilar dos sufocos da graduação.

Obrigado a quem surgiu durante esse período e virou um companheiro de luta e de vida, meu namorado Deivid Augusto. O teu modo contagiante de perceber a vida, a maneira racional de considerar as situações e encontrar alternativas e, mais que isso, aproveitar ao máximo todas as oportunidades recebidas, são características fundamentais para progredir e me instigam a ser o melhor de mim. Sou grato por esses ensinamentos.

Agradeço também à Dra. Tatiana Montanari, a quem admiro muito. Graças ao período de bolsista, conheci as ferramentas teóricas e práticas que procuram facilitar o processo de ensino-aprendizagem. Hoje, vejo com orgulho todo o trabalho realizado em conjunto. Essa amizade, as conversas, as ideias e, principalmente, o apoio que recebi, despertaram em mim ainda mais o gosto pela Educação.

A vivência oportunizada pela UFRGS é única: a maneira analítica e integradora de perceber o mundo biológico que os docentes do Instituto de Biociências transmitem ao senso crítico e teórico dos profissionais da Faculdade de Educação. Todos com suas características e peculiaridades. Uma parte do aluno-profissional-cidadão-pesquisador que sou agora é decorrente do conhecimento de vocês. Vida longa ao ensino público e de qualidade! Que a Universidade Federal continue acolhendo a diversidade junto de políticas públicas inclusivas e produzindo bons frutos com a participação coletiva.

Àqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram a concluir este trabalho, meu reconhecimento!



*“Não dá para apagar o sol,  
não dá para parar o tempo.  
Não dá para contar estrelas,  
que brilham no firmamento.  
Não dá para parar um rio  
quando ele corre para o mar.  
Não dá para calar um Brasil,  
quando ele quer cantar.”*

## **SUMÁRIO**

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>9</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>12</b>
<b>ARTIGO</b>	<b>13</b>
<b>Análise genotoxicológica de uma lagoa de águas escuras em uma unidade de conservação no sul do Brasil</b>	<b>14</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Os seres humanos sempre dependeram de fontes naturais, renováveis ou não, para a subsistência, e toda ação humana sempre gerou impactos no meio ambiente. Esses efeitos, hoje, podem ser decorrentes de um crescimento desordenado, expansão agrícola, poluição (Jenkins & Joppa, 2009). Os reflexos dessa má conduta são vistos, por exemplo, nas mudanças climáticas, na perda de habitats, na extinção de espécies animais e vegetais e no aumento do desmatamento (Coelho *et al.*, 2006).

Uma ferramenta primordial que busca reduzir esses impactos é a delimitação de áreas protegidas, cujo conceito, de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), é:

“uma área com limites geográficos definidos e reconhecidos, cujo intuito, manejo e gestão buscam atingir a conservação da natureza, de seus serviços ecossistêmicos e valores culturais associados de forma duradoura, por meios legais ou outros meios efetivos (IUCN, 1994).”

Nesse sentido, fez-se necessária a criação e implantação de áreas protegidas, como as Unidades de Conservação (UCs), que são definidos como *“espaços territoriais e recursos ambientais com características relevantes, com objetivos de conservação de limites definidos e regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção”* (BRASIL, 2000). Essas áreas têm como finalidade, majoritariamente, a preservação integral da biodiversidade: da flora, da fauna, do solo, da água e de outros recursos naturais, conciliando objetivos científicos, educacionais e recreativos (RIO GRANDE DO SUL, 2017). Segundo Alho (2008), entre os benefícios da delimitação de uma UC, pode-se destacar a conservação dos solos, a regulação do regime hídrico e a manutenção das condições climáticas, que são alguns dos fatores que impactam diretamente a produção agropecuária e a qualidade de vida da população.

A ocupação humana irregular e os fatores associados, como a extração de granito, a criação agropecuária, a introdução de espécies exóticas, a ocorrência de queimadas estão no histórico conflituoso da área do Parque Estadual de Itapuã, localizado em Viamão/RS. Este ecossistema é a última amostra dos remanescentes naturais da paisagem da região Metropolitana de Porto Alegre e abriga a maior diversidade de ecossistemas dentre os parques estaduais do Rio Grande do Sul, além de um número significativo de espécies raras e endêmicas, colocando-o em posição de destaque quanto à preservação e manutenção do equilíbrio ecológico (RIO GRANDE DO SUL, 1997). Por estas razões biológicas valiosas, Itapuã é classificado como Unidade de Conservação de Proteção Integral. Dessa forma, busca-se manter o ecossistema livre de alterações antrópicas, admitindo apenas o uso indireto dos recursos naturais. O parque também é espaço para programas de educação ambiental e turismo ecológico, além de pesquisas científicas (RIO GRANDE DO SUL, 1997).

Desde 1991, a Lagoa Negra faz parte da área protegida. Caracterizada por águas bastante ácidas e alto teor de matéria orgânica, ela ganha destaque por ser a única lagoa de águas escuras existente na planície costeira do Estado (Volkmer-Ribeiro, 1981). Em razão destas peculiaridades, tanto da lagoa quanto do parque, faz-se necessária a investigação científica destes ambientes. Na literatura, há poucos trabalhos fundamentados na Lagoa Negra e, quando existem, já datam mais de dez anos.

O monitoramento ambiental é uma ferramenta para avaliar a presença de impactos no ambiente, dimensionando a magnitude destes e buscando adoção de eventuais medidas preventivas (Bitar & Ortega, 1998; Guerra, 2015). Colher e compilar as informações sobre o estado de um ambiente é essencial para compreender a sua evolução ao longo do tempo, sendo um instrumento importante para tomadas de decisão para manutenção do equilíbrio ecológico.

Dentre as estratégias utilizadas no monitoramento ambiental está a avaliação ecotoxicológica, que incluem análises físico-químicas associadas a métodos biológicos. Essa metodologia permite estimar em diferentes graus os efeitos ecotoxicológicos — tóxicos ou genotóxicos — nas amostras ambientais. Desses, os ensaios de toxicidade crônica avaliam alterações fisiológicas em organismos modelo, enquanto os de toxicidade aguda, mensuram morte ou imobilidade dos organismos. A avaliação de genotoxicidade, por sua vez, analisa alterações genéticas que podem ser em células somáticas ou reprodutivas (FEPAM, 2008). A

atividade genotóxica também pode ser avaliada através de bioensaios que medem alterações genéticas em nível molecular. O ensaio *Salmonella*/microsossoma é um bom exemplo, pois tem sido usado como metodologia básica para estudos do potencial genotóxico devido ao contínuo aprimoramento e amplo uso com diferentes amostras ambientais: solo, água superficial, sedimentos, compartimento atmosférico, entre outros (Vargas, *et al.*, 2001; Claxton *et al.*, 2010). É evidente a importância de realização do biomonitoramento em diferentes compartimentos ambientais através das mais variadas estratégias. A avaliação de dano genotóxico, se constitui numa importante ferramenta na prevenção, conservação e uso sustentável do ambiente, porque possibilita a detecção precoce de substâncias com capacidade reativa ao material genético dos organismos, que podem causar danos celulares cumulativos.

Portanto, investigar e compreender as dinâmicas dos ambientes, principalmente onde houve e/ou há interferência humana, faz-se fundamental para a tomada de medidas preventivas. Com esse enfoque e tendo conhecimento do histórico de ocupação humana na área adjacente do P.E. Itapuã, mostram-se essenciais estudos que contribuam com informações, dados e análises disponibilizadas visando a conservação e proteção efetiva desses ambientes raros e de extrema importância para a manutenção da biodiversidade do Estado do Rio Grande do Sul.



*Lagoa Negra (ponto LN03), dia 06 de setembro de 2019.*

## REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R. 2008. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology* 68(4): 956-966. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842008000500005>>.
- BITAR, O.Y & ORTEGA, R.D. Gestão Ambiental. In: OLIVEIRA, A.M.S. & BRITO, S.N.A. (Eds.). *Geologia de Engenharia*. São Paulo: Associação Brasileira de Geologia de Engenharia (ABGE), 1998. cap. 32. p. 499-508.
- BRASIL. Lei n 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o artigo 225, 1.º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 19 jul. 2000. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19985.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm)>.
- CLAXTON, L.D., UMBUZEIRO, G.A. & DEMARINI, D.M. 2010. The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Persp.* 118(11): 1515-1522.
- COELHO, J., GOUVEIA, V., MILFONT, T. 2006. Valores humanos como explicadores de atitudes ambientais e intenção de comportamentos pró-ambientais. *Psicologia em estudo* 11: 199-207.
- FEPAM. 2008. *Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicadas à Bacia Hidrográfica do Rio Caí: Atlas Ambiental*. Vera Maria Ferrão Vargas (Coord.). Porto Alegre: FEPAM, 2008. 164p.
- GUERRA, T. 2015. Educação ambiental: contribuição para a gestão socioambiental na Bacia Hidrográfica do Rio Gravataí. Rio de Janeiro: MC&G Editorial. 248 p.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). 1994. *Guidelines for Protected Area Management Categories*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- JENKINS, C. & JOPPA, L. 2009. Expansion of the global terrestrial protected area system. *Biological Conservation* 142(10).
- RIO GRANDE DO SUL, 1997. *Plano de manejo: Parque Estadual de Itapuã*. Porto Alegre: Departamento de Recursos Naturais Renováveis, 158 p.
- RIO GRANDE DO SUL, SECRETARIA DO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. 2017. *Unidades de Conservação Estaduais: proteger os ecossistemas é conservar a biodiversidade*. Porto Alegre: Departamento de Biodiversidade, 32 p.
- VARGAS, V. M. F., DUCATTI, A. & HORN, R. C. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In: TUCCI, C. E. M. & MARQUES, D. M. L. (Eds.). *Avaliação e controle da drenagem urbana*. Porto Alegre: ABRH. p. 57-71.
- VOLKMER-RIBEIRO, C. 1981. Limnologia e a vegetação de macrófitas na Lagoa Negra, Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul. *IHERINGIA Sér. Bot.* 27: 41-68.

## ARTIGO

O presente trabalho resultou na elaboração de um artigo científico que relata a investigação genotoxicológica de amostras ambientais da Lagoa Negra.

O manuscrito a seguir foi formatado seguindo as normas editoriais da Revista Brasileira de Biociências.

As tabelas e figuras essenciais seguem ao longo do texto para melhor compreensão.

## **Análise genotóxica de uma lagoa de águas escuras em uma unidade de conservação no sul do Brasil**

Ismael Krüger Pescke<sup>1,2\*</sup>, Livia de Oliveira Rozino<sup>1,2</sup>, Luciane Oliveira Crossetti<sup>3</sup>, Vera Maria Ferrão Vargas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (FEPAM), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Mutagênese Ambiental, Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Limnologia, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\* Contato do autor: [kruger.pescke@ufrgs.br](mailto:kruger.pescke@ufrgs.br)

## **Análise genotoxicológica de uma lagoa de águas escuras em uma unidade de conservação no sul do Brasil**

**RESUMO:** Ensaio com biomarcadores de genotoxicidade avaliam os efeitos de contaminantes a nível molecular, celular, tecidual nos organismos e são essenciais para o monitoramento ambiental. Com esse propósito, um dos mais utilizados em razão da sua sensibilidade é o ensaio *Salmonella*/microsoma. Ele avalia a presença de compostos tóxicos no ambiente através de danos no código genético de linhagens de bactérias modificadas geneticamente e, comparado com outros bioensaios, é rápido e prático. A necessidade de comparação entre os resultados obtidos, em ambientes contaminados ou não, implica na busca por áreas de referências, onde os valores basais indicam os processos naturais que ocorrem no ecossistema. Em uma abordagem original, o presente estudo propõe avaliar o potencial mutagênico da água superficial e água intersticial do sedimento da Lagoa Negra, situada em uma unidade de conservação que, historicamente, teve seu entorno antropizado. Amostras totais de água e sedimento de três pontos, coletadas na margem sul da lagoa em uma campanha amostral piloto, foram submetidas ao ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsuspenção, com e sem ativação metabólica (S9). Foi observada atividade mutagênica nas amostras de água intersticial do sedimento em bioensaios com ação indireta (LN01 TA100+S9  $0.14 \pm 0.073 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ; LN02 TA98+S9  $0.07 \pm 0.008 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ; LN03 TA98+S9  $0.12 \pm 0.047 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ). As características naturais da lagoa formam um ambiente ímpar, entretanto podem induzir resultados positivos nesta área sem histórico de contaminação. Este estudo embora sirva como alerta, requer dados complementares incluindo parâmetros bióticos, análises químicas e de genotoxicidade em outros pontos de amostragem e em diferentes estações climáticas. O cruzamento desses dados poderá auxiliar a compreender melhor a condição ambiental da Lagoa Negra.

**Palavras-chave:** Ensaio *Salmonella*/microsoma, biomarcadores de genotoxicidade, Lagoa Negra, Parque Estadual de Itapuã.

## Genotoxicology evaluation of a dark water lagoon in a protected area in Southern Brazil

**ABSTRACT:** Genotoxicity biomarker assays evaluate the effects of contaminants at molecular, cellular, and tissue levels on the organisms and are essential for environmental monitoring. For this purpose, one of the most used due to its sensitivity is the *Salmonella*/microsome assay. This assay assesses the presence of toxic compounds in the environment through damage to the genetic code of bacterial strains that were genetically modified, also it is practical as compared to other bioassays. The need to compare the results obtained in contaminated or not contaminated environments implies the search for reference areas, where the basal values indicate the natural processes that occur in the ecosystem. In an original approach, the present study proposes to evaluate the mutagenic potential of surface water and interstitial water of sediment of the Negra Lake, located in a conservation unit that historically had its surroundings anthropized. Total water and sediment samples of three sites, collected on the south shore of the lagoon in a pilot sampling campaign, were submitted to *Salmonella*/microsome assay, microsuspension method, in the presence and absence of metabolic activation (S9). Mutagenic activity was observed in the interstitial water samples of the sediment in bioassays with indirect action (LN01 TA100+S9  $0.14 \pm 0.073 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ; LN02 TA98+S9  $0.07 \pm 0.008 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ; LN03 TA98+S9  $0.12 \pm 0.047 \text{Rev}/\mu\text{L}$ ). The natural characteristics of the lagoon form a unique environment, however they can induce positive results in this area without a historical contamination. This study, although it serves as an alert, requires additional data including biotic parameters, chemical and genotoxicity analyses at other sampling sites and at different climatic seasons. The crossing of these data can help to better understand the environmental condition of Negra Lake.

**Key-words:** *Salmonella*/microsoma assay; biomarkers of genotoxicity; Negra Lake; Itapuã State Park.

## I. Introdução

O Parque Estadual de Itapuã (PEI), Viamão/RS, é uma Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral. A Lagoa Negra integra o complexo lagunar da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Bacia do Guaíba, sendo o elemento hidrográfico mais destacado da planície arenosa pela coloração escura característica de suas águas. Ela possui 17,5km<sup>2</sup> de superfície, aproximadamente, cerca de 19km<sup>2</sup> da área total do Parque e é um modelo natural na evolução dos corpos lagunares da faixa costeira do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 1997; Volkmer-Ribeiro; 1981). De águas levemente ácidas e rasas — profundidade média menor que 2,5 metros — a lagoa tem alta taxa de nutrientes, em razão da grande quantidade de matéria orgânica vegetal em suspensão e no sedimento de fundo, com concentrações elevadas de ácidos orgânicos dissolvidos, principalmente de ácidos húmicos e fúlvicos, que caracterizam a lagoa como distrófica (Kishi, 1991; Irgang, 2003; De Luca, 1991; Aguiar, 2008). Em suas margens há vegetação típica de áreas turfosas, conferindo coloração amarronzada à água, característica das “águas negras” (*bog-waters*), sendo a única lagoa na planície costeira do sul do Brasil com esse padrão (Rutnner, 1963; Volkmer-Ribeiro; 1981; Esteves, 1998; Ramgrab *et al.*, 2000).

Por se tratar de um ambiente aquático situado em uma Unidade de Conservação, de acordo com a Resolução n° 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005), as águas da Lagoa Negra são inseridas na Classe Especial. Apesar disso, desde a década de 1950, a área passou a sofrer impacto antrópico com o barramento das águas para irrigação de lavouras de arroz, prática agrícola bastante acentuada na região norte da lagoa (Aguiar, 2008). As lavouras de arroz irrigado podem prejudicar as propriedades físicas e químicas do solo e das águas superficiais e subterrâneas (ANA, 2009). Além disso, no ambiente próximo da irrigação pode ocorrer lixiviação e escoamento de agrotóxicos, pesticidas e outros insumos, e a devolução do material com carga elevada de sedimentos, aos corpos hídricos, pode provocar assoreamento e poluição química (Lipp-Nissinen, 2018). Os efluentes das áreas agrícolas podem conter excesso de nutrientes, principalmente Nitrogênio e Fósforo, além de compostos químicos poluentes e substâncias genotóxicas. Estudos mostram que essas substâncias induzem danos genéticos e toxicológicos (Stahl, 1991; Valent *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2001; Telles, 2002; Prusch, 2019). Uma alteração das condições físico-químicas do corpo hídrico pode gerar

impactos negativos no ecossistema, como perda da biodiversidade e extinção de espécies (Sayer & Roberts, 2001).

No ambiente aquático os contaminantes têm maior interação com os componentes abióticos e bióticos do sistema, dependendo das características próprias de cada corpo hídrico (Sisinno & Moreira, 2013). Essas substâncias podem sofrer dispersão, deposição/sedimentação, bioacumulação, interferindo no fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica, ou ainda persistirem estáveis por longo período de tempo (Holtz, 2000; Tagliari *et al.*, 2004). O material particulado em suspensão é depositado ao longo do tempo no sedimento. Este compartimento ambiental mantém o histórico de contaminação de uma área e pode atuar ainda como uma fonte de contaminantes para a coluna d'água, em perturbações naturais ou antrópicas (Fronza, 2006). Alguns contaminantes podem ainda reagir com as espécies químicas naturalmente presentes, resultando em misturas complexas que provocam efeitos desconhecidos (Schnoor, 1996; Lemos, 2011).

O monitoramento ambiental a partir de ensaios com biomarcadores de genotoxicidade compõem uma ferramenta adequada para mensurar possíveis efeitos de agentes químicos em nível molecular, celular e tecidual nos organismos (Van der Oost *et al.*, 2003; Ohe *et al.*, 2004; Souza, 2006). O bioensaio *Salmonella*/microsoma é a metodologia mais empregada na avaliação de amostras ambientais complexas, sendo utilizado pela comunidade científica e agências de controle (Mortelmans & Zeiger, 2000; Chen & White, 2004). Após modificações que elevam a sensibilidade na detecção de substâncias mutagênicas, este ensaio avalia alterações causadas na estrutura ou funcionamento do DNA com linhagens de bactérias geneticamente modificadas associadas a homogenatos de células microsomais de ratos (Maron & Ames, 1983; Umbuzeiro & Vargas, 2003; Claxton *et al.*, 2010).

O uso do solo no entorno da lagoa provocou alterações morfológicas na área que podem influenciar na qualidade das águas da lagoa Negra (Moura-Fujimoto, 1997; Irgang, 2003; Aguiar, 2008). Apesar disso, vários estudos mostram que a unidade de conservação ainda é uma área de referência para bioensaios de genotoxicidade, apresentando níveis basais de respostas para mutagenicidade (Silveira *et al.*, 2003; Villela *et al.*, 2006a, 2006b, 2013; Meyer, 2008). Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial mutagênico da água superficial e da água intersticial de sedimento da Lagoa Negra pelo bioensaio *Salmonella*/microsoma, um diagnóstico inédito para este corpo hídrico, elucidando a

possível atividade de compostos genotóxicos neste ambiente lacustre que é o limite físico entre a Unidade de Conservação e as áreas antropizadas adjacentes. Os dados produzidos no desenvolvimento desta pesquisa auxiliarão na compreensão das condições ambientais do ecossistema estudado e em tomadas de decisão, manejo e/ou gestão da lagoa em si, além de fomentar possíveis ações de preservação futuras para as áreas adjacentes à lagoa Negra e ao Parque Estadual de Itapuã.

## **II. Material e Métodos**

### *Amostragem*

O estudo foi realizado na Lagoa Negra, que compõe a paisagem hídrica do Parque Estadual de Itapuã, uma unidade de conservação da região metropolitana de Porto Alegre (Figura 1). Uma coleta foi realizada no período final da estação de inverno (06/09/19). No local, foram escolhidos três pontos para coleta, na porção que margeia a Lagoa dos Patos em um segmento de terras que alcança 6 km de extensão, onde existe a Praia de Fora, conhecida por ser um local de visitação do Parque. Os pontos foram nomeados com as letras iniciais da lagoa (LN). Definiu-se **LN01** (30°22'46"S; 51°0'33"W) como o primeiro ponto de coleta por ser o local de chegada à Lagoa. Em seguida, o ponto **LN03** (30°23'26"S; 50°58'21"W) foi o local mais distante e acessível por estrada de terra que fora alcançado nesta margem com possibilidade de coleta. Por fim, a escolha do ponto **LN02** (30°23'01"S; 50°58'57"W) deu-se pela equidistância deste entre os demais. As amostras de água foram coletadas em frascos DBO esterilizados, posteriormente envoltos com alumínio. Da mesma maneira, as amostras compostas de sedimento foram coletadas e acondicionadas em frascos de vidro, envoltos por alumínio. As amostras foram transportadas refrigeradas ao laboratório e estocadas a 4 °C até os devidos procedimentos de extração, seguindo cada protocolo (APHA, 1992). Em cada ponto amostral, foi mensurada a condutividade elétrica, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura da água, turbidez, salinidade e pH com o auxílio de uma sonda multiparâmetro EXO 1 (XYL). Ainda, foi medida a profundidade total e do ponto de coleta de água e a transparência da água com o auxílio de Disco de Secchi.



**Figura 1:** Imagem aérea do local de estudo (Google Earth, 2019). Fonte: Ismael Krüger Pescke.

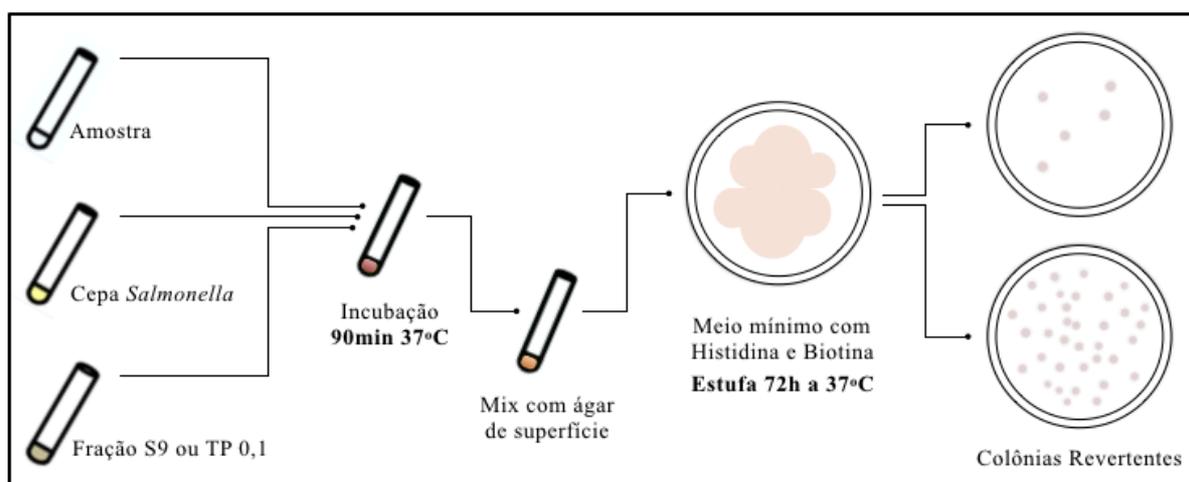
### ***Preparação de amostras***

As amostras de água superficial foram retiradas dos frascos DBO e esterilizadas utilizando filtros *Millipore* 0.45  $\mu\text{m}$ . Para separar e extrair a água intersticial, a amostra de sedimento passou pelo processo de centrifugação (10.000 Xg, durante 10 minutos a 4 °C), onde 20 mL do sobrenadante de cada amostra foram esterilizados com filtros *Millipore* 0.45  $\mu\text{m}$ . Após a esterilização, as amostras de água superficial e água intersticial foram armazenadas em microtubos de centrífuga devidamente identificados, em alíquotas de 1,5 mL, estocados a -20 °C. Os filtros utilizados neste processo, ou seja, com o material orgânico retido, foram armazenados em béqueres contendo 2 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) por um período de 20 horas antes do bioensaio.

### ***Ensaio de Mutagênese e Citotoxicidade: Salmonella/microsoma***

As atividades mutagênicas e citotóxica das amostras foram avaliadas através do ensaio *Salmonella/microsoma*, método de microssuspensão (Maron & Ames, 1983; Kado *et al.*, 1986). O bioensaio avalia alterações no DNA através de linhagens de *S. typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina (*his<sup>-</sup>*), ou seja, elas não sintetizam este aminoácido e não crescem em meio de cultura mínimo, a não ser que mutações restaurem a sua capacidade

de síntese, como pela ação de um mutágeno. Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens TA98 (*hisD3052*, *frameshift GC*, *rfa*,  $\Delta$ *uvrb*, pKM101) que detecta compostos mutagênicos por erro no quadro de leitura, e a linhagem TA100 (*hisG46*, *base pair substitution GC*, *rfa*,  $\Delta$ *uvrb*, pKM101) que caracteriza substituição de pares de bases nitrogenadas. Os ensaios foram realizados na presença e ausência de metabolização (S9), uma mistura de células de fígado de rato induzidas por Aroclor1254 (Moltox S.A). A figura 2 esquematiza o processo do bioensaio.



**Figura 2:** Esquema-síntese do bioensaio *Salmonella*/microsoma método de microssuspensão.

Fonte: Ismael Krüger Pescke.

Os volumes de amostras utilizados nos ensaios foram 50, 100, 200, 300 e 400  $\mu$ L, em duplicada. Já para os ensaios com amostras de material orgânico retido em filtros, as concentrações foram 5 e 10  $\mu$ L por placa. Em todos os ensaios foram utilizados controles negativos de meio nutriente líquido (controle de cepa) e água deionizada estéril ou dimetilsulfóxido DMSO (controles de solventes), que definem a mutação espontânea característica de cada linhagem. Como controles positivos foram utilizados Azida Sódica (AZS, CASRN 26628-22-8, Merck do Brasil) e 4-Nitroquinoleína-1-óxido (4NQO, CASRN 56-57-5, Sigma Chemical Company) em ensaios sem S9 *mix* e 2-Aminofluoreno (2AF, CASRN 153-78-6, Sigma Chemical Company) com S9 *mix*.

As amostras foram consideradas mutagênicas quando apresentaram ANOVA significativa ( $p \leq 0,05$ ) e dose-resposta positiva ( $p \leq 0,05$ ). Esta potência mutagênica expressa em número de revertentes por unidade de amostra (Rev/unidade de amostra) foi analisada no software *SALANAL (Salmonella Assay Analysis, version 1.0, Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA)*, selecionando os modelos de regressão linear ou Bernstein (Bernstein, 1982). A concentração da mutagênese efetiva (CME), que marca o critério clássico de duplicar o número de revertentes espontâneos, foi calculada para comparar a sensibilidade das diferentes linhagens. A citotoxicidade das amostras foi definida quando a porcentagem de células sobreviventes (após 72 horas de incubação) foi inferior a 60% em relação ao valor do controle negativo (Vargas, 1993).

### III. Resultados e Discussão

As amostras foram submetidas ao ensaio *Salmonella*/microsossoma, método de microsuspensão, com as linhagens TA98 e TA100, com ação direta (-S9) e indireta (+S9) de fração de metabolização de rato *in vitro*. Não foram observadas atividades mutagênicas nas amostras de água superficial total nos ensaios realizados. Entretanto, as amostras de água intersticial de sedimento, naturalmente concentradas nesta matriz, apresentaram mutagenicidade com a detecção pelas duas linhagens, em ensaios com fração de metabolização *in vitro* (S9). Os valores da Tabela 1 são os resultados considerados estatisticamente mutagênicos e expressos em número de colônias revertentes por microlitro de amostra (Rev/ $\mu$ L), o que determina a potência mutagênica. No ponto LN01, os valores para TA100+S9 de  $0.14 \pm 0.073$  Rev/ $\mu$ L indicaram mutações por substituição de pares de bases nitrogenadas. Já para os pontos LN02 e LN03, as respostas positivas para TA98+S9 atingiram valores de  $0.07 \pm 0.008$  Rev/ $\mu$ L e  $0.12 \pm 0,047$  Rev/ $\mu$ L, respectivamente, causados por mutações de erro no quadro de leitura. Os bioensaios que avaliaram a presença de agentes mutagênicos no material orgânico retido nos filtros *Millipore* não apresentaram respostas positivas. Nenhuma amostra apresentou citotoxicidade (dados não mostrados).

O número de colônias revertentes espontâneas é diferente e característico das linhagens utilizadas. Sendo assim, para definir a sensibilidade dos ensaios de forma comparativa foi realizado o cálculo de dose mutagênica efetiva (D.M.E.): a dose necessária

para duplicar a taxa espontânea. De acordo com os valores apresentados na Tabela 1, a linhagem TA98 mostrou-se mais sensível, uma vez que apenas 297.62 µL de amostra de água intersticial já indica o dobro do número de colônias revertentes espontâneas obtidas frente ao solvente. Já a resposta menos sensível foi observada para a linhagem TA100, onde seria necessário praticamente o triplo do volume de amostra para duplicar o número de colônias his<sup>+</sup> por placa (914.28 µL). Os valores de mutação espontânea encontrados estão na faixa observada nos dados históricos do laboratório.

**Tabela 1:** Resultados da potência mutagênica das amostras de água intersticial do sedimento dos pontos da Lagoa Negra (P.E. Itapuã) analisadas pelo ensaio *Salmonella*/microsossoma, método de microssuspensão, na presença e ausência de fração de metabolização *in vitro* (S9).

Pontos de coleta	Ensaio	Rev/µL <sup>a</sup>		D.M.E. <sup>b</sup>		M. Espontânea <sup>c</sup>		Controle Positivo <sup>d</sup>	
		TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100
LN01	+S9	– <sup>e</sup>	0.14±0.073	–	914.28	25 (±1)	128 (±7)	219	242
	-S9	–	–	–	–	–	–	–	–
LN02	+S9	0.07±0.008	–	357.14	–	25 (±1)	128 (±7)	219	242
	-S9	–	–	–	–	–	–	–	–
LN03	+S9	0.12±0.047	–	297.62	–	25 (±1)	128 (±7)	219	242
	-S9	–	–	–	–	–	–	–	–

<sup>a</sup> Revertentes por microlitro de amostra. <sup>b</sup> Dose mutagênica efetiva (µL). <sup>c</sup> Colônias revertentes espontâneas no controle de solvente (Rev/placa, média ± Desvio Padrão). <sup>d</sup> Colônias revertentes induzidas no controle positivo (Rev/placa, média). <sup>e</sup> Atividade mutagênica não detectada.

**Tabela 2:** Condições físico-químicas nos pontos de coleta na Lagoa Negra (P.E. Itapuã).

		LN01	LN02	LN03
<b>Condutividade</b>	<b>µS/cm</b>	71.5	74.1	68.9
<b>Oxigênio Dissolvido</b>	<b>mg OD/L</b>	10.06	9.95	10.03
<b>Profundidade coleta</b>	<b>m</b>	0,2	0,2	0,2
<b>Profundidade total</b>	<b>m</b>	1,1	0,8	1
<b>Salinidade (g/L)</b>	<b>g/L</b>	0,03	0,03	0,03
<b>Temperatura da água</b>	<b>°C</b>	14,55	15,77	15,24
<b>Temperatura do ar</b>	<b>°C</b>	16,25	17,42	16,26
<b>Transparência da água</b>	<b>m</b>	0,13	0,16	0,11
<b>Turbidez</b>	<b>UNT</b>	117	90	119
<b>pH</b>	<b>unid pH</b>	6.67	6.68	6.67

Os pequenos volumes de amostra avaliados neste trabalho foram adequados em razão da eficiência do ensaio *Salmonella* método de microssuspensão, além deste ser comumente proposto para avaliar amostras ambientais complexas (Kado *et al.*, 1986; Claxton *et al.*, 2010). Não foi detectada mutagenicidade nas amostras de água superficial total, possivelmente pelos fatores abióticos, principalmente ventos, bastante dinâmicos que atuam na coluna d'água, alterando a estrutura e composição deste compartimento ambiental (Volkmer-Ribeiro, 1981; Callegaro, 1981).

As respostas genotóxicas positivas observadas em água intersticial do sedimento mostram a eficiência deste compartimento em fixar compostos naturais ou antrópicos no ambiente. Essas amostras obtiveram potência mutagênica positiva em ensaios com fração de células hepáticas (S9), que simulam a função protetora do sistema hepático de mamíferos e outros vertebrados. Isso indica que, no sedimento coletado, há compostos pró-mutagênicos, ou seja, que geram produtos genotóxicos após a metabolização. Esta porção de sedimento analisada está na zona de interface de fundo, assim a água intersticial está biodisponível aos seres que habitam este compartimento, bem como propensa a receber produtos orgânicos complexos, resultado de reações químicas naturais, onde a deposição de compostos pode alterar o fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica (Holtz, 2000; Tagliari *et al.*, 2004).

O aporte abundante de matéria orgânica em suspensão na coluna d'água e depositada no sedimento da lagoa pode levar a uma taxa elevada de decomposição biológica. Apesar disso, a concentração relativamente alta de oxigênio dissolvido verificada nos locais de coleta é indiretamente resultado da ação dos fortes ventos responsáveis pela homogeneização do ambiente aquático e também pela baixa transparência na coluna d'água (Volkmer-Ribeiro, 1981; Callegaro, 1981). Assim, o papel desempenhado pelos ventos na mistura do corpo hídrico, e dada a profundidade rasa do mesmo, não há formação de estratificação química na lagoa e, dessa maneira, não ocorre esgotamento de oxigênio pelas substâncias orgânicas em decomposição no humo gelatinoso que compõe o fundo da lagoa.

O processo natural de decomposição predispõe aumento na concentração iônica e consequente elevação na condutividade elétrica (Zuccari, 1991; Júlio *et al.*, 1997; Esteves, 1998; Vasconcelos-Segundo & Froehner, 2016). Porém, os valores de condutividade elétrica moderadamente altos observados podem estar relacionados com a composição ácida característica desta lagoa. Naturalmente, os ácidos orgânicos dissolvidos, com destaque aos

ácidos húmicos e fúlvicos, têm composição química complexa e, mesmo com os indícios de propriedades antimutagênicas presentes no ácido húmico, as reações naturais de associação com compostos orgânicos e inorgânicos — com efeitos sinérgico no ambiente — podem gerar subprodutos mutagênicos, fato que explicaria a potência mutagênica observada (Sato *et al.*, 1986, 1987; Cozzi *et al.*, 1993; Bernacchi *et al.*, 1996; Canellas & Façanha, 2004).

A área da Unidade de Conservação, no entanto, é referenciada na literatura como uma área limpa para estudos de genotoxicidade, cujas amostras ambientais servem como amostra controle nos bioensaios. Um estudo de solos não obteve respostas mutagênicas positivas na área do P.E. Itapuã e, em análises de água superficial e de sedimento da Praia da Pedreira, às margens do Lago Guaíba, observou-se índice referente ao dano basal no DNA de organismos bioindicadores (*Limnoperna fortunei*) submetidos a ensaios de toxicidade e sem respostas significativas em ensaios de mutagênese (Meyer, 2008; Silveira *et al.*, 2003; Villela *et al.*, 2006a, 2006b, 2013). A falta de estudos de caráter genotoxicológico, porém, faz com que o presente estudo inicie esta abordagem na Lagoa Negra.

As respostas positivas para mutagenicidade, portanto, podem estar relacionadas com efeitos naturais, assim como os fatores abióticos observados que revelam a complexidade na análise de amostras ambientais. É importante ressaltar que, embora este estudo indique a presença de possíveis alterações em sedimentos de uma lagoa situada em área de preservação, novas abordagens considerando variações sazonais e pontos adicionais de amostragem na lagoa são necessárias. Ainda, técnicas mais eficazes de tratamento da amostra e a associação de análises limnológicas, químicas e de genotoxicidade poderão auxiliar a compreender o significado e a dinâmica das respostas observadas neste ecossistema.

#### **IV. Agradecimentos**

Os autores agradecem as agências de fomento FEPAM/RS, PIBIC, CNPq (122157/2019-2) por apoiarem o projeto, o suporte da equipe técnica do Parque Estadual de Itapuã, FEPAM/RS e Centro de Ecologia (UFRGS) na campanha de amostragem, e a Divisão de Unidades de Conservação (DUC) da Secretaria de Meio Ambiente (SEMA/RS) por permitir o trabalho no Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS, Brasil).

## V. Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA; INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ - IRGA. 2009. *Conservação de água e preservação ambiental nas lavouras de arroz do Rio Grande do Sul: produção mais limpa*. Brasília: ANA. 54p.
- AGUIAR, M.R. 2008. *Análise das alterações ambientais na Lagoa Negra, Viamão/RS: enfoque na qualidade da água*. 95 p. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Instituto de Geociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/15008>. Acesso em: 16 nov. 2019.
- APHA.1992. *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 18th ed. M.A.H Franson, Washington, p. 1-20.
- BERNACCHI, F., PONZANELLI, I., MINUNNI, M., FALEZZA, A., LOPRIENO, N. & BARALE, R. 1996. In vivo cytogenetic effects of natural humic acid. *Mutagenesis*, 11(5): 467-469.
- BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J. & PIKE, M.C. 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research*, 97: 267-281.
- BRASIL. 2005. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. *Conselho Nacional de Meio Ambiente*. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 21 nov 2019.
- CALLEGARO, V.L.M. 1981. Diatomáceas da Lagoa Negra, Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul, Brasil. *IHERINGIA Sér. Bot.* 27: 69-99.
- CANELLAS, L.P. & FAÇANHA, A.R. 2004. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesq. agropec. bras.* 39(3): 233-240. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108425/1/Chemical.pdf>. Acesso em: 22 nov 2019.
- CHEN, G. & WHITE, P. A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.* 567: 151-225. <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.005>>.
- CLAXTON, L.D., UMBUZEIRO, G.A. & DEMARINI, D.M. 2010. The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Persp.* 118(11): 1515-1522.
- COZZI, R., NICOLAI, M., PERTICONE, P., De SALVIA, R. & SPUNTARELLI, F. 1993. Desmutagenic activities of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity. *Mutation Res.* 299: 37-44.
- DE LUCA, S. J. 1991. Índices de diversidade biológica da Lagoa Negra/RS. In: V Simpósio Luso Brasileiro de Hidráulica e Recursos Hídricos e IX Simpósio Brasileiro de recursos Hídricos, v.2, 1991, Rio de Janeiro: Anais ABRH/APRH. p. 133-267.
- ESTEVEZ, F. A. 1998. *Fundamentos de limnologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Interciência. 226 p.

- FRONZA, L. 2006. *Capacidade de Liberação de Hidrocarbonetos dos Sedimentos de Áreas Contaminadas do Estuário da Lagoa dos Patos*. 126 f. Dissertação (Mestrado Oceanografia Física, Química e Geológica) - Departamento de Geociências. Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2006.
- HOLTZ, M. S. 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.* 38: 21-27.
- IRGANG, G. V. 2003. *Análise espacial e temporal do estado da conservação ambiental do Parque Estadual de Itapuã-RS e sua zona de amortecimento*. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/4981>. Acesso em: 20 nov 2019.
- JÚLIO-JR., H. F., BONECKER, C. C., AGOSTINHO, A. A. 1997. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A. A. & GOMES, L. C. (Eds.). *Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo*. Maringá: EDUEM. 387 p.
- KADO, N., GUIRGUIS, G., FLESSEL, C., CHAN, R., CHANG, K. & WESOLOWSKI, J. 1986. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* 8: 53-66.
- KISHI, R.T. 1991. *Avaliação ambiental da Lagoa Negra/RS - Índices e modelagem matemática*. 248 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) - Instituto de Pesquisas Hidráulicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
- LEMOS, A. T. 2011. *Investigação de contaminantes mutagênicos de matrizes ambientais em área de risco ecotoxicológico*. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/37447>. Acesso em: 20 nov 2019.
- LIPP-NISSINEN, K. H. 2018. *Licenciamento ambiental para irrigação superficial da orizicultura no RS: manual de orientação*. Porto Alegre: FEPAM. 64p.
- MARON, D. M. & AMES, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 11: 173-215.
- MEYER, D. D. 2008. *Utilização do ensaio Salmonella/microsoma em amostras de solo no sul do Brasil: três potenciais áreas de referência*. 32 p. Trabalho de Conclusão de Graduação (Ecologia) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/16110>. Acesso em: 21 nov 2019.
- MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 445: 29-60. <[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)>.
- MOURA-FUJIMOTO, N. S. 1997. Análise geomorfológica de Itapuã - norte da Laguna dos Patos. *Revista do Departamento de Geografia* 11: 67-93. <<https://doi.org/10.7154/RDG.1997.0011.0007>>.

- OHE, T., WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567: 109-149. <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.003>>.
- PRUSCH, L.M. 2019. *Avaliação da sensibilidade das fases iniciais do desenvolvimento de Pomacea canaliculata à Niclosamida*. 24 p. Trabalho de Conclusão de Graduação (Ecologia) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- RAMGRAB, G. E., TONIOLO, J. A., FERREIRA, J. A., MACHADO, J. L. F., BRANCO, P. M. & SÜFFER, T. 2000. Principais recursos minerais do Rio Grande do Sul. In: HOLZ, M & DE-ROS, L. F. (Eds.). *Geologia do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora UFRGS. p. 407-440.
- RIO GRANDE DO SUL, 1997. *Plano de manejo: Parque Estadual de Itapuã*. Porto Alegre: Departamento de Recursos Naturais Renováveis, 158 p.
- RUTTNER, F. 1963. *Fundamentals of Limnology*. 3ed. Toronto: Uni of Toronto Press. 307 p.
- SATO, T.Y. & NAGASE. H. 1986. Desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Res.* 162: 173-178. <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90083-7)>.
- SATO, T.Y., NAGASE. H. & HAYASE K. 1987. Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutat. Res.* 176: 199-204. <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(87\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(87)90050-9)>.
- SAYER, C.D. & ROBERTS, N. 2001. Establishing realistic restoration targets for nutrient enriched shallow lakes: linking diatom ecology and palaeoecology at the Attenborough Ponds, UK. *Hydrobiologia* 448: 117-142. <<https://doi.org/10.1023/A:1017597221052>>.
- SCHNOOR, J.L. 1996. *Environmental Modeling: fate and transport of pollutants in water, air and soil*. New York: John Wiley & Sons. 682 p.
- SILVEIRA, J., VILLELA, I.V., OLIVEIRA, I.M., DA SILVA, J. & HENRIQUES, J.A.P. 2003. A utilização do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)) como biomonitor de genotoxicidade ambiental. *Revista de Iniciação Científica ULBRA 2*: 83-93. Disponível em: <http://www.periodicos.ulbra.br/index.php/ic/article/view/1892/1357>. Acesso em: 21 nov 2019.
- SISINNO, C. L. S. & MOREIRA, J. S. 2013. Dinâmica, transformação e destino dos contaminantes no ambiente. In: SISINNO, C. L. S. & OLIVEIRA-FILHO, E. C. (Eds.). *Princípios de Toxicologia Ambiental*. Rio de Janeiro: Interciência. p. 27-36.
- SOUZA, V. H. E. 2006. *Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em Allium cepa*. 160 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/88429>. Acesso em: 17 nov 2019.
- STAHL, R. G. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22: 94-125. <[https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90051-P](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90051-P)>.

- TAGLIARI, K. C., CECCHINI, R., ROCHA, J. A. V. & VARGAS, V. M. F. 2004. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Research* 561: 101-117. <<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.04.001>>.
- TELLES, D. D'A. 2002. Água na agricultura e pecuária. In: REBOUÇAS, A. C., BRAGA, B. & TUNDISI, J. G. (Eds.). *Águas doces no Brasil*. 2a ed. São Paulo: Escrituras Editora. p. 305-337.
- UMBUZEIRO, G. & VARGAS, V. M. F. 2003. Teste de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F. & MARQUES, E. K. (Eds.). *Mutagênese ambiental*, 1a ed. Canoas: Editora ULBRA. p. 81-112.
- VALENT, G. U., SATO, M. I., COELHO, M. C., COIMBRÃO, 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* 8(4): 371-381. <<https://doi.org/10.1002/tox.2530080403>>.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. & VERMEULEN, N. P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149. <[https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)>.
- VARGAS, V. M. F., MIGLIAVACCA, S. B., MELO, A. C., HORN, R. C., GUIDOBONO, R. R., FERREIRA, I. C. & PESTANA, M. H. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.* 490(2): 141-158. <[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00159-5)>.
- VARGAS, V. M. F., DUCATTI, A. & HORN, R. C. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In: TUCCI, C. E. M. & MARQUES, D. M. L. (Eds.). *Avaliação e controle da drenagem urbana*. Porto Alegre: ABRH. p. 57-71.
- VARGAS, V. M. F. 2003. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutat. Res.* 544: 313-319. <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.06.020>>.
- VASCONCELOS-SEGUNDO, E. H. & FROEHNER, S. J. 2016. Modelo condutométrico para determinação da concentração de dióxido de carbono dissolvido no Reservatório Vossoroça, Brasil. *Eng. Sanit. Ambient.* 21(3): 479-487. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522016120490>>.
- VILLELA, I. V. 2006a. *Avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais da região hidrográfica da bacia do Lago Guaíba*. 153 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/7527>. Acesso em: 21 nov 2019.
- VILLELA, I. V., OLIVEIRA, I. M., DA SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. 2006b. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed

to environmental contaminants. *Mutation Research* 605(1-2): 78-86. <<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.006>>.

VILLELA, I. V., DA SILVA, J., OLIVEIRA, I. M., MACHADO, M. S., DIAS, J. F. & HENRIQUES, J. A. P. 2013. The use of genetic bioassays to evaluate the environmental quality in a region under the influence of urban waste in Guaíba lake basin (Brazil). *Advances in Science and Technology of Water Resources* 2(5): 138-149.

VOLKMER-RIBEIRO, C. 1981. Limnologia e a vegetação de macrófitas na Lagoa Negra, Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul. *IHERINGIA Sér. Bot.* 27: 41-68.

ZUCCARI, M. L. 1991. *Determinação de fatores abióticos e bióticos do Ribeirão Lavapés (Botucatu, SP)*. 113 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1991.