

# **INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM RATOS WISTAR EXPOSTOS À ÁGUA QUE ABASTECE O MUNICÍPIO DE ARARAS (SP)**

## **INVESTIGATION OF THE MICRONUCLEI FREQUENCY IN WISTAR RATS EXPOSED TO WATER THAT SUPPLIES ARARAS CITY (SP)**

**Mariana Zorel Stocco<sup>1</sup>, Elaine Cristina Mathias Silva  
Zacarin<sup>2</sup>, Maria Aparecida Marin Morales<sup>3</sup>, Rodolfo  
Tolentino Bisneto<sup>4</sup>, Grasiela Dias Campos Severi Aguiar<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Avenida Dr. Maximiliano Barutto, nº 500, Jd. Universitário, CEP 13607-339, Araras, São Paulo, Brasil; marianazs.bio@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, Rodovia João Leme dos Santos, Km 110 - SP-264, CEP 13506-900, Sorocaba, São Paulo, Brasil; elaine@ufscar.br

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Avenida 24-A, nº 1515, Bela Vista, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil, mamm@rc.unesp.br

<sup>4</sup>Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Avenida Dr. Maximiliano Barutto, nº 500, Jd. Universitário, CEP 13607-339, Araras, São Paulo, Brasil; rodolfo@biotema.com.br

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Avenida Dr. Maximiliano Barutto, nº 500, Jd. Universitário, CEP 13607-339, Araras, São Paulo, Brasil; grazielaaguiar@terra.com.br, grazielaaguiar@uniararas.br

---

### **RESUMO**

A modernização industrial e o aumento do emprego de produtos químicos levaram à poluição do ambiente por resíduos tóxicos, comprometendo a qualidade de vida dos organismos vivos. Estudos de mutagenicidade e genotoxicidade são importantes para detectá-los e avaliar seus efeitos, e o teste do micronúcleo é recomendado nesse caso. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo analisar o potencial mutagênico de efluentes presentes na água que abastece a população de Araras, por meio da técnica do micronúcleo. Foram utilizados quatro grupos de ratos

Wistar, machos, tratados por gavagem. O grupo controle negativo que recebeu apenas água, o grupo controle positivo que, além da gavagem com água, recebeu, 24 h antes do sacrifício, uma dose de meta-metil-sulfonato (MMS) e os grupos testes que receberam água dos pontos de coleta, realizada em duas épocas do ano. A água testada foi coletada em outubro de 2005 e abril de 2007, na confluência entre o Ribeirão das Furnas e o Ribeirão das Araras, e na Barragem Hermínio Ometto. Após 15 dias de tratamento, foi realizada a coleta da medula óssea dos fêmures, sua distensão em lâminas e a coloração com Giemsa-Wright. Foram realizadas as análises microscópicas, em que foram contados 2.000 eritrócitos policromáticos por animal, e o número de eritrócitos policromáticos micronucleados. O teste estatístico ANOVA demonstrou não haver diferença significativa na frequência de micronúcleos encontrada entre o grupo teste e o controle negativo, nos dois momentos de coleta realizados, sugerindo que, nas condições em que esse estudo foi realizado, a água que abastece o município de Araras parece não apresentar potencial genotóxico e, portanto, não oferece riscos a saúde humana.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade. Micronúcleo. Contaminantes ambientais. Água. Saúde pública.

---

## ABSTRACT

The industrial modernization and the increase of the use of chemical products had led to the pollution of the environment for diverse toxic residues, compromising the life quality of the alive organisms. Mutagenicity and genotoxicity studies are important to detect them and to evaluate the exposition risks. The micronucleus' test is used in the detention of clastogenic and aneugenic agents, recommended internationally for evaluation of the mutagenic potential of diverse products. Being thus, this work had been for objective to analyze the genotoxic potential of effluent in the water that supplies the Araras city by means of the micronucleus technique. Four groups of male Wistar rats treated by gavage with drinking waters (negative control group), with a knowledge toxic substance (positive control group) and with water of the areas had been used (test groups). The tested water was collected at 2005 october, and 2007 april, in two different points, in the confluence between the Furnas Stream and the Araras Stream, also in the Hermínio Ometto embankment. Bone marrow samples of rats have been obtained after 15 days of treatment, they were stained with Giemsa-Wright and analyzed for optic microscopy in immersion. It has been evaluated the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPEs) in 2.000 polychromatic erythrocytes for each animal. It was applied statistics analysis by ANOVA, that demonstrated not to have significant difference in the frequency of micronuclei found between the test group and the negative control group, in both studied areas, suggesting that, in the conditions where the experiments had been

carried the analyzed water seems do not present genotoxic potential and probably don't cause risks to human health.

**Keywords:** Genotoxicity. Micronucleus. Polluents. Water. Human health.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A modernização industrial e a utilização de produtos químicos no controle de pragas agrícolas trouxeram inúmeros benefícios para a humanidade, mas por outro lado, levaram à poluição do ambiente por diversos resíduos tóxicos que comprometem a qualidade de vida dos organismos vivos.

Vários poluentes ambientais tais como chumbo, cromo, mercúrio e os herbicidas triazínicos, que são utilizados rotineiramente em plantações de interesse econômico, permanecem muito tempo na água, que é utilizada na irrigação ou então ingerida pelos animais e pelo homem, atingindo os indivíduos via gastrointestinal. Além disso, muitos deles são contaminantes mutagênicos podendo causar danos desastrosos ao indivíduo.

Pesquisas que investigam a ação dos agentes mutagênicos ambientais vêm tendo grande importância, pois se sabe que, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos aos quais o homem pode estar exposto (MATSUMOTO, 2004).

Os efeitos da ingestão de substâncias químicas devem ser avaliados em vários níveis, a fim de otimizar o uso e a liberação desses produtos no meio ambiente. Ratos tratados em laboratório constituem um excelente modelo de estudo da toxicidade desses compostos e do seu potencial mutagênico para a avaliação dos possíveis danos que esses agentes químicos possam causar nesses organismos e, de forma semelhante, no homem.

Desse modo, os estudos de mutagenicidade e genotoxicidade receberam destaque nos últimos tempos e diversas técnicas estão sendo desenvolvidas e aplicadas como instrumento de avaliação da ação de xenobióticos ambientais, assim como para a avaliação dos efeitos da poluição sobre os organismos expostos (AL-SABTI e METCALFE, 1995). São de grande importância, portanto, estudos para avaliar a mutagenicidade desses poluentes, para que se possa detectá-los e conhecê-los.

O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Esse teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (RIBEIRO et al., 2003).

Diante do exposto, torna-se claro o papel da ecotoxicologia, juntamente com os parâmetros imunológicos clássicos na avaliação e monitoramento dos sistemas naturais, de modo a auxiliar na redução dos impactos ou até mesmo recuperar áreas degradadas.

A investigação sobre a frequência de micronúcleos em animais tratados com água que recebe os efluentes químicos da região de Araras, parece ser bastante interessante, pois, embora não existam sinais de toxicidade para os organismos vivos que compõem esses ecossistemas é possível que, a exposição contínua a agentes químicos, cause algum efeito genotóxico nos mesmos.

Podemos encontrar na literatura várias situações em que organismos aquáticos são utilizados para estudos desse tipo. Um estudo realizado com a água da Bacia do Guaíba em Porto Alegre (RS, Brasil) verificou um aumento significativo de danos por micronúcleo e teste do COMETA em *Limnoperna fortunei* (VILLELA et al., 2007). Ergene et al. (2007 a, b) realizaram um estudo no Mediterrâneo, na região da Turquia, e verificaram através da técnica de micronúcleos, que as lagoas estavam contaminadas com poluentes genotóxicos muito provavelmente derivados da agricultura. Lemos et al., (2007) investigaram a qualidade da água do Rio Caí (RS, Brasil) numa área sob influência de um complexo petroquímico, por meio da análise de micronúcleo (MN) em eritrócitos de *Pimephales promelas* e descreveram aumento da frequência de MN após 14 dias de exposição à água coletada em quatro diferentes sítios. Esse tipo de teste também foi utilizado para analisar a poluição das águas marinhas usando animais como modelo experimental (ZAMORA-PEREZ et al., 2006).

Assim, este trabalho teve por objetivo analisar o potencial mutagênico de compostos químicos de efluentes lançados na água que abastece o município de Araras, usando como modelo experimental ratos machos Wistar, por meio da técnica de micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

Localizada numa região privilegiada, às margens da rodovia Anhanguera, entre Campinas e Ribeirão Preto, conhecida como “cidade das árvores”, Araras é considerada pelos bons índices IDH, por abrigar uma série de indústrias e por ser forte no setor sulcro-alcooleiro. Essas atividades econômicas que geram empregos e renda a população, podem, indiretamente, comprometer o suprimento de água potável aos municípios.

Entre os problemas mais graves que afetam a qualidade da água de rios e lagos encontram-se os esgotos domésticos tratados de forma inadequada, o controle inadequado de efluentes industriais, a perda e destruição das bacias de captação, a

localização errônea das unidades industriais, o desmatamento, a agricultura migratória sem controle e as práticas agrícolas deficientes.

O Ribeirão das Furnas é considerado de grande importância para a cidade de Araras, pois atende a Barragem Hermínio Ometto, que fornece cerca de 50% a 60% da água para o abastecimento do município, com capacidade para armazenar 1,62 milhões de litros cúbicos, gerando uma totalidade de 430 mil litros de água por hora. A qualidade da água é boa, sendo classificada como de classe 2 de acordo com o CONAMA nº 357 de 17/03/2005 (BRASIL, 2005). A região de confluência dos Ribeirões das Furnas e das Araras (Ponto A) trata-se de uma região urbana, onde são encontradas várias indústrias como a têxtil, de papel e o curtume e outros estabelecimentos que contribuem com a poluição.

A região da Barragem Hermínio Ometto (Ponto B), também está localizada numa região urbana, na qual se pode observar a presença de indústrias como a de suco de laranja, de materiais plásticos, metalúrgicas, eletrodomésticos, química entre outras e um condomínio baldeado. As atividades observadas na barragem podem comprometer a qualidade da água desse manancial.

## 2.2. Metodologia

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos, divididos em quatro grupos com oito animais cada: um controle negativo que recebeu apenas água, um controle positivo tratado com um composto sabidamente mutagênico (Meta Metil Sulfonato – MMS) 24 horas antes do sacrifício, e os grupos tratados com a água proveniente dos pontos de coleta – Ponto A, região de confluência entre o Ribeirão das Araras e o Ribeirão das Furnas, Ponto B, Barragem Hermínio Ometto, coletados, respectivamente, em outubro de 2005 e abril de 2007.

A escolha dos pontos de coleta foi feita com base na sua localização, pela exposição há resíduos de diferentes tipos. A água foi coletada manualmente, em recipientes de vidro limpos, que foram abertos no momento da coleta da amostra e fechados logo após a mesma. Os frascos foram identificados e transportados ao laboratório onde foram feitas as análises.

Em 2007 foram feitas 400 coletas de água para garantir a qualidade do produto para consumo em diferentes localizações da cidade. Cerca de 20 amostras foram colhidas e analisadas mensalmente, para diferentes parâmetros, como fisiológicos, bioquímicos, bacteriológicos, turbidez, cloro, além da quantidade de flúor e alterações no pH ou temperatura. As amostras foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro para análises mais completas e, no caso de problemas, os laudos foram encaminhados ao Serviço de Água e Esgoto do Município de Araras, (SAEMA, 2007), para que pudessem ser sanados, ou até mesmo levados a Vigilância Epidemiológica do município para providências mais severas (SANFELICE, 2007).

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Água da UNIARARAS. Os critérios utilizados encontram-se descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (GREENBERG, 1999) e,

neste trabalho foram analisados os parâmetros: pH, sólidos totais dissolvidos (STD), salinidade (S), condutividade (C), demanda química do oxigênio (DQO), demanda bioquímica do (DBO), oxigênio dissolvido (OD) e nitrogênio amoniacal.

Os animais foram pesados e marcados individualmente. Todos os animais receberam, diariamente, por gavagem, um volume de água de acordo com seu. Após período de 15 dias de tratamento, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com xilasina ( $1\text{mg.kg}^{-1}$ ) e ketamina ( $8\text{mg.kg}^{-1}$ ), colocados em decúbito dorsal e com a tesoura, foi feito um pique no abdome e realizada laparotomia medial, até alcançar o diafragma que foi seccionado. A pele foi rebatida em direção à pata posterior, os músculos da coxa foram retirados, expondo o fêmur e, os ligamentos que prendem o osso foram rompidos. O fêmur foi limpo, para retirar o excesso de sangue, e suas epífises foram cortadas, coletada a medula óssea e realizada a distensão. Depois de coradas com Giemsa-Wright, foram analisadas em microscopia por imersão (RIBEIRO et al., 2003).

Os resultados foram apresentados em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 2.000 eritrócitos policromáticos por animal. Foram empregados os testes ANOVA e Tukey, com grau de significância de 5%, pelo software BioEstat 4.0.

A substância testada é considerada mutagênica quando produzir aumento, estatisticamente significativo em nível de 5%, na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao controle negativo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na coleta de água na região de confluência dos Ribeirões das Furnas e das Araras (Ponto A), realizada em outubro de 2005, foram encontrados esgotos domésticos, esgoto industrial e lixo. Observou-se na coleta da água da barragem Hermínio Ometto (Ponto B), em abril de 2007, a presença de assoreamento, ausência de mata ciliar, afloramento de algas e macrófitas. Imagens digitais, que foram obtidas no momento das coletas (Figura 1) evidenciam as condições ambientais encontradas.



**Figura 1.** Fotos digitais do Ponto A (a,b, c) Ponto B (d, e, f) obtidas na coleta da água.

Embora tenham sido observadas algumas variações nos valores destes parâmetros, eles se mostraram dentro da normalidade, conforme descrito na Tabela 1.

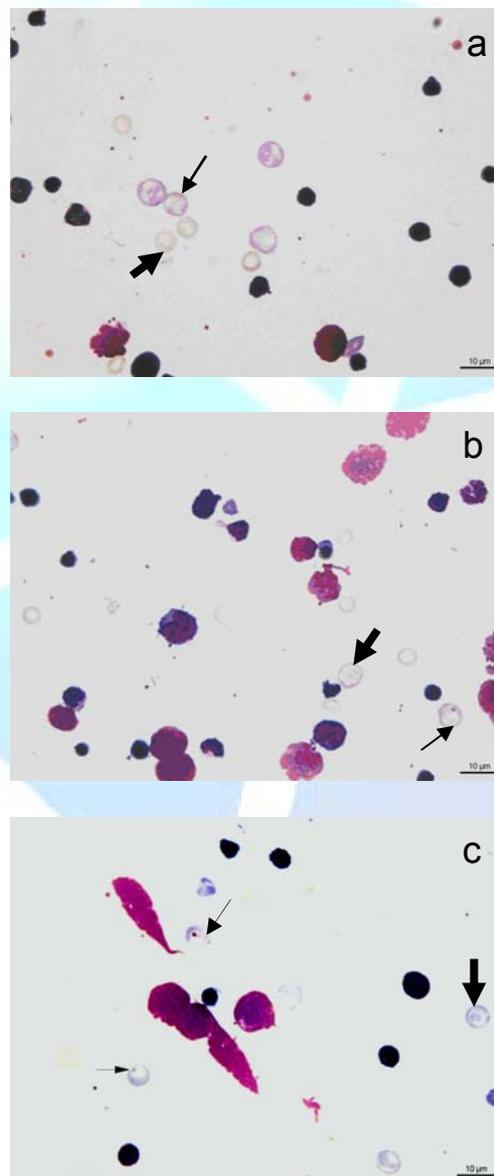
**Tabela 1** - Resultados das análises dos parâmetros físicos, físico-químicos e químicos da água coletada nos meses outubro de 2005 (ponto A) e abril de 2007 (ponto B).

	<b>pH</b>	<b>STD mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>S %</b>	<b>C</b>	<b>DQO mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup></b>	<b>DBO</b>	<b>OD</b>	<b>N mg.L<sup>-1</sup></b>
<b>Ponto A</b>	7,3	53,1	0,1	268,0	26,0	18	6,0	0,3
<b>Ponto B</b>	7,4	107,0	0,0	111,7	100,0	12	7,4	1,4

Os parâmetros estudados na análise físico-química das amostras de água nos pontos estudados mostraram algumas alterações nas coletas realizadas, porém, os valores obtidos estão dentro da normalidade segundo o CONAMA nº 357 de 17/03/2005 (BRASIL, 2005). É possível que as variações observadas sejam

decorrentes da época do ano em que foi realizada a coleta, pois a primeira, ocorreu em outubro, depois de longo período de seca e, a segunda, em abril, após período de chuvas. A presença de maior ou menor concentração de efluentes despejados nas águas e o índice pluviométrico podem ser responsáveis pelas alterações sazonais nos valores encontrados. De maneira interessante, (HAYASHI et al., 1998) observaram diferenças sazonais na frequência de micronúcleos entre células das brânquias e de eritrócitos de peixes marinhos, sendo que houve aumento no verão.

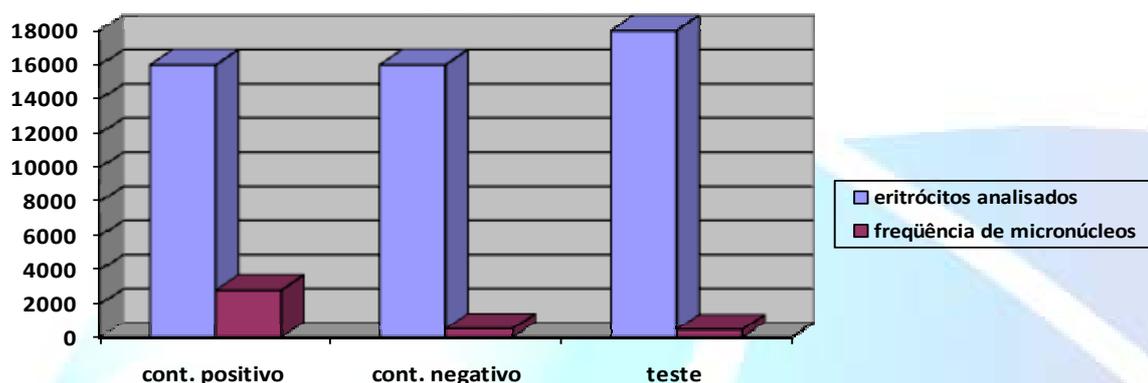
Nas análises das distensões de medula óssea foram observados vários tipos celulares, inclusive células imaturas, porém, para análise da presença de micronúcleos foram considerados os eritrócitos policromáticos, apontados pelas setas (Figura 2a) e não os eritrócitos normocromáticos, evidenciados pelas pontas de seta (Figura 2a).



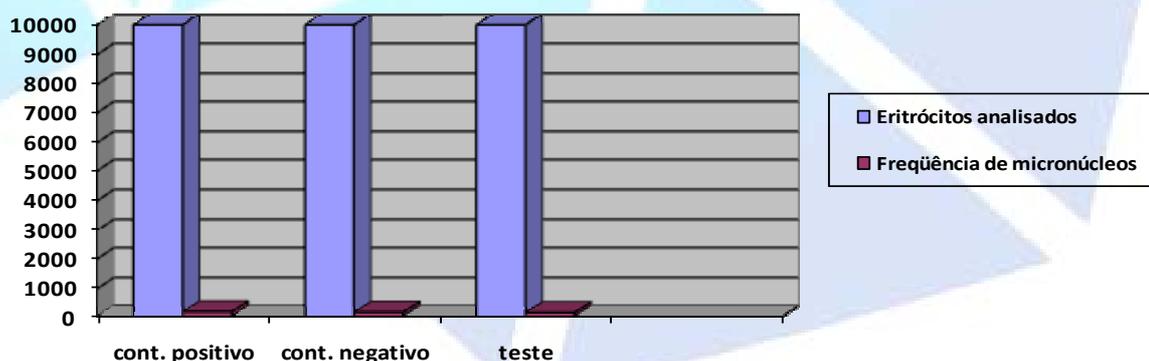
**Figura 2.** Imagens microscópicas de distensões de medula óssea evidenciando a diferença entre eritrócitos normocromáticos (a – seta larga) e policromáticos (a – seta fina). Em B e C pode ser visualizada a presença de eritrócito policromático (setas largas) e eritrócito policromático micronucleado (setas finas).

Para as análises abaixo foram utilizados valores de freqüência do número de eritrócitos micronucleados em relação aos 2000 eritrócitos policromáticos contados por indivíduo, em cada grupo.

Os testes empregados demonstram não haver diferença significativa na freqüência de micronúcleos encontrada entre o grupo teste e o controle negativo com a água da coleta de outubro de 2005 e entre os três grupos estudados após a coleta de abril de 2007 (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos referentes à coleta de outubro de 2005.



**Figura 4.** Freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos referentes à coleta de abril de 2007.

É possível observar diferença significativa quando se compara tanto o grupo controle negativo com o grupo teste e com o grupo controle positivo, mas é que se sabe que nesse grupo foi utilizado um composto sabidamente mutagênico e, por isso, a freqüência de micronúcleos apresenta-se aumentada nesse grupo.

Embora os pontos de coleta da água recebam efluentes domésticos e industriais da cidade de Araras, as substâncias mutagênicas que podem estar neles presentes, como por exemplo, o cromo resultante dos processos químicos que ocorrem nos curtumes, parecem não comprometer a qualidade da mesma e, assim, não induzir aumento na frequência de mutações nos organismos direta ou indiretamente a ela relacionados. É importante salientar que o tratamento realizado teve duração de 15 dias, tempo talvez insuficiente para revelar algum dano genotóxico, uma vez que as concentrações de agentes clastogênicos podem ser baixas nas amostras obtidas. Outro ponto a ser levantado, é que esses resultados podem ser decorrentes da preocupação dos gestores municipais em manter a boa qualidade da água. Políticas públicas são implantadas na cidade.

Moraes (2000) salientou que as análises físicas e químicas determinam a presença ou a concentração de diferentes poluentes no meio, enquanto que os testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis na avaliação das reações dos organismos vivos à poluição e indicadores dos possíveis efeitos sinérgicos dos poluentes. O resultado de um, complementa o do outro teste.

Investigação com modelos animais são interessantes por demonstrar *in vivo* efeitos genotóxicos. Abrevaya et al. (2007) realizaram um experimento com três linhagens de camundongos (*Mus musculus*), que foram tratados intraperitonealmente com metronidazole, e concluíram que esse composto tem atividade genotóxica devido ao aumento significativo na frequência de micronúcleos no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste estudo, que teve como modelo experimental ratos machos Wistar foi investigado o potencial genotóxico dos componentes encontrados na água que abastece o município de Araras, em dois pontos, por meio da técnica de micronúcleo. Os resultados indicaram que parece não existir diferença significativa entre o número de eritrócitos micronucleados encontrados nos animais tratados com as amostras em estudo, quando comparado com aqueles resultantes do uso de água potável. Sendo assim, pode ser sugerido que na água analisada e nas condições em que foram conduzidos os experimentos, não foi observado risco de alterações no material genético dos indivíduos a ela expostos.

Sendo assim, o teste do micronúcleo é uma ferramenta importante a ser utilizada em estudos de genotoxicidade, porém, não deve ser a única. Os experimentos realizados nesse trabalho, nas condições apresentadas sugerem que a água coletada nos pontos descritos parece não apresentar potencial genotóxico, reforçando a importância desse tipo de investigação e salientando a necessidade de especulações de outra natureza para que possa ser confirmada a isenção de qualquer risco à saúde das populações.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Renata Barbieri pelo apoio técnico durante o desenvolvimento do trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS

ABREVAYA, X.C.; CARBALLO, M.A.; MUDRY, M.D. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n. 4, 1139-1143, 2007. doi: 10.1590/S1415-47572007000600018

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.323, p. 121-135, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resoluções do CONAMA nº 357**. (5ed). Brasília, DF. SEMA, 2005. 23 p. Data da Legislação 17/03/2005. Publicação D.O.U. 18/03/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/pot/conama/legiario.cfm> Acesso em: 20 de out de 2005.

ERGENE, S.; CAVAS, T.; CELIK, A.; KÖLELLI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and molecular mutagenesis**. v 48, p. 421-9, 2007a.

ERGENE, S.; CAVAS, T.; CELIK, A.; KÖLELLI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 385-91, 2007b.

GREENBERG A. E. (Eds). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20<sup>th</sup> Edition. 1220 p. 1999.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y.K. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

LE MOS, C.T.; RÖDEL, P.M.; TERRA, N.R.; OLIVEIRA, N.C.D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n.3, p. 391-401, 2007.

MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 306p, 2003.

SAEMA – SERVIÇO DE ÁGUA E ESGOTO MUNICIPAL DE ARARAS.  
Disponível em: <http://www.saema.com.br> Acesso em: 12 de ag. de 2007.

SANFELICE, S. Vigilância Sanitária: quase 2 mil inspeções em 2007. Disponível em [www.araras.sp.gov.br/materias2007/8162.html](http://www.araras.sp.gov.br/materias2007/8162.html). Acesso em: 27 de mai de 2008.

VILLELA I.V., DE OLIVEIRA I.M., SILVEIRA J.C., DIAS J.F., HENRIQUES J.A., DA SILVA J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research**, v. 628, p. 76-86, 2007.

ZAMORA-PEREZ A., CAMACHO-MAGANA C., GOMEZ-MEDA B., RAMOS-IBARRA M., BATISTA-GONZALEZ C., ZUNIGA-GONZALEZ G., Importance of spontaneous micronucleated erythrocytes in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) to marine toxicology studies. **Acta Biologica Hungarica**, v.57, p. 441-8, 2006.

*Manuscrito recebido em: 10/04/2008*  
*Revisado e Aceito em: 15/12/2010*