



Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal

of Applied Science

ISSN: 1980-993X

ambi-agua@agro.unitau.br

Universidade de Taubaté

Brasil

Bortoluci Maceda, Elisangela; Barufatti Grisolia, Alexéia; Oliveira Vaini, Jussara; Cândido, Líliam Silvia
Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio

Brilhante, MS, Brasil

Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, vol. 10, núm. 1, enero-marzo,

2015, pp. 117-129

Universidade de Taubaté

Taubaté, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92832874011>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil

doi: 10.4136/ambi-agua.1500

Received: 12 Sep. 2014; Accepted: 27 Nov. 2014

**Elisangela Bortoluci Maceda^{1*}; Alexéia Barufatti Grisolía¹;
Jussara Oliveira Vaini²; Liliam Silvia Cândido¹**

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brasil

¹Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

²Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas

* Autor correspondente: e-mail: elisangelabmac@gmail.com,
alexeiagrisolia@ufgd.edu.br, jussaravaini@hotmail.com,
liliamcandido@ufgd.edu.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de amostras de água provenientes do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil, por meio de testes toxicológicos utilizando biomarcadores. Para avaliar a mutagenicidade utilizou-se o teste de micronúcleo, para a genotoxicidade o ensaio cometa, ambos com *Astyanax altiparanae*, e para analisar a citotoxicidade utilizou-se o teste de *Allium cepa*. As coletas foram realizadas nos meses de abril e junho de 2013, em três pontos distintos (pontos 1, 2 e 3) do Córrego Arara e no Tanque de Irrigação da UFGD (ponto 4). Os resultados indicaram aumento significativo na frequência de micronúcleos pisceiros na coleta do mês de junho quando comparada com a realizada em abril. No teste de *Allium cepa*, o efeito citotóxico apresentou-se significativamente maior na coleta de abril, porém a genotoxicidade das águas não apresentou diferença estatística entre os meses de coleta. O maior número de danos no ensaio cometa ocorreu no ponto 4, em ambos períodos de coleta. A análise química da água indicou níveis de cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel, com valores superiores ao permitido pela legislação vigente. A presença de metais acima dos níveis permitidos nas amostras de água analisadas do Córrego Arara indica possíveis potenciais mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos aos organismos devido a esses poluentes derivados ou não de ações antrópicas. Assim sendo, este trabalho pode contribuir como ferramenta adicional ao controle da qualidade da água do Córrego Arara, considerando sua utilização e importância para a região.

Palavras-chave: ambiente aquático, anormalidade cromossômica, contaminação.

Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil

ABSTRACT

This study evaluated the mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil, by means of toxicological

tests using biomarkers. The micronuclei test was used to evaluate mutagenicity, and the comet assay was used to evaluate genotoxicity; both tests used *Astyanax altiparanae*. The *Allium cepa* test was used to analyze cytotoxicity. The collections were performed in April and June, 2013, at three different points (points 1, 2 and 3) of the Arara Stream and at the Irrigation Tank of UFGD (point 4). The results indicated greater frequency of piscine micronucleus in the June collection than in that of April. In the *Allium cepa* test, the cytotoxic effect was significantly greater in the collection of April, but the genotoxicity of water showed no statistical difference between the months of collection. The greatest amount of damage in the comet assay occurred at point 4, in both collection periods. The chemical analyses revealed that the levels of cadmium, chromium, copper and nickel were higher than the values allowed by legislation. The presence of pollutants above the permitted level in the analyzed samples of the Arara Stream shows possible potential mutagenic, genotoxic and cytotoxic effects to the water bodies due to these pollutants which may or may not be caused by human action. This work may thus contribute an additional tool to the quality control of water of the Arara Stream, considering its use and importance to the city.

Keywords: aquatic environment, chromosomal abnormality, contamination.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos ecossistemas aquáticos é problema crescente proveniente de ações antrópicas, em consequência de atividades inadequadas por liberação de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas sem tratamento adequado, uso indiscriminado de substâncias químicas, lixo urbano e descarte indevido de materiais e resíduos (Gupta et al., 2014).

Algumas das substâncias químicas liberadas no ambiente aquático, como compostos orgânicos e metais pesados, são capazes de inibir a atividade celular ou alterar o material genético podendo comprometer a fisiologia e sobrevivência de organismos aquáticos, transmitindo esta contaminação aos níveis tróficos superiores, incluindo o ser humano (Bianchi et al., 2011).

Desta forma, o uso de peixes, como bioindicadores de contaminação aquática, é explicado pela resposta destes aos tóxicos de maneira similar aos grandes vertebrados (Scalon et al., 2010). Os peixes são capazes de sofrer bioacumulação, assim como os mamíferos, respondendo a agentes mutagênicos mesmo em baixas concentrações (Mansouri et al., 2012).

Segundo Sánchez-Galán et al. (1998), uma espécie de peixe considerada ideal, para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, necessita ser: distribuída em vários ecossistemas; sensível para detectar poluentes em baixas concentrações; e de fácil manuseio no laboratório. Assim sendo, o *Astyanax sp* (lambari) tem sido o biomarcador amplamente utilizado para estes testes, pois é comum, pequeno, detritívoro, possui considerável importância econômica e sensível para detectar poluentes em baixas concentrações. Este pode ser utilizado para identificar a ação de agentes genotóxicos por meio de danos cromossômicos, como os micronúcleos (Ribeiro et al., 2014).

O teste de micronúcleo em peixe desenvolvido inicialmente por Schmid (1975) é amplamente utilizado, pois é uma técnica vantajosa, simples, sensível e de baixo custo para detecção de danos mutagênicos causados em organismos aquáticos e diversos trabalhos avaliaram a frequência de anormalidades como parâmetro de genotoxicidade (Russo et al. 2004; Hoshina et al., 2008; Melo et al., 2014). A avaliação de danos no material genético de peixes pode ser avaliada também pelo ensaio cometa. Este ensaio apresenta diversas vantagens e características quando comparado a outros testes genotóxicos, pois exige menor número de células para a análise, é sensível à detecção de danos no material genético, mesmo em baixa quantidade, possui custo relativamente baixo, necessita de curto período de tempo para sua realização (Tice et al., 2000).

O ensaio cometa pode ser utilizado para avaliar a potencialidade de água contaminada por agentes genotóxicos provenientes de efluentes industriais, domésticos e agrícolas de, induzir danos no DNA monitorar a qualidade da água (White e Rasmussen, 1998; Matsumoto et al., 2003), que podem resultar em mutações. Estes danos observados com o ensaio cometa, diferente das mutações, podem ser reparados (Gontijo e Tice, 2003).

Outro teste utilizado para avaliar a qualidade da água é o teste de *Allium cepa*, uma vez que ensaios utilizando modelos vegetais podem ser considerados mais simples quando comparado aos testes utilizando modelos animais (Radic et al., 2010). O teste de *Allium cepa* possui curta duração, baixo custo devido este organismo possuir cromossomos grandes e em pequena quantidade, deixando visível assim os danos cromossômicos e os distúrbios do ciclo mitótico (Rank e Nielsen, 1998; Alvim et al., 2011).

O município de Rio Brilhante, localizado no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, caracteriza-se por representar região agropecuária, sucroalcooleira de grande importância no Estado. Está situado entre dois rios, Vacaria e Brilhante, pertencentes à Bacia Rio do Ivinhema, e possui diversos cursos d'água, sendo o seu principal, o Córrego Arara. As águas deste são utilizadas, principalmente, para irrigação de lavouras e dessedentação de animais. Também recebe efluentes da estação de tratamento de esgoto da cidade e apresenta degradação da sua mata ciliar original ao longo do percurso (IMAP/MS, 2006).

A avaliação da qualidade da água do Córrego Arara é necessária em decorrência da sua importância para o município, onde até o momento não há registros de pesquisas realizadas para este fim. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade dos elementos presentes na água em diferentes pontos do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil, por meio do teste de micronúcleo e ensaio cometa em *Astyanax altiparanae*, teste de *Allium cepa* e análise química da água. Assim sendo, espera-se que essa pesquisa ressalte a importância de adoção de planos de medidas de conservação dos mananciais de água que recebem efluentes decorrentes das diversas atividades humanas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de coleta

Amostras de água do Córrego Arara, situado na Bacia do Rio Paraná e pertencente ao município de Rio Brilhante, MS, Brasil, foram coletadas em meses de maior e menor regime de pluviosidade (abril e junho respectivamente) no ano de 2013, em três pontos distintos (1, 2 e 3), conforme ilustrado na Figura 1. O ponto 1 ($21^{\circ}47'40.60"S$ $54^{\circ}31'58.37"E$) caracteriza-se por possuir resquícios de poluição decorrente da ação humana, como resíduos sólidos e compostos orgânicos, o ponto 2 ($21^{\circ}48'20.77"S$ $54^{\circ}31'38.12"E$) localiza-se 100 metros após o efluente da unidade de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município, estando próximo a propriedades agrícolas, e o ponto 3 ($21^{\circ}48'45.32"S$ $54^{\circ}31'44.60"E$) caracteriza-se pela ausência de mata ciliar ao redor de suas margens e áreas de lavouras em suas proximidades. Também foi realizada a coleta de água subterrânea proveniente de poço artesiano no Tanque de Irrigação da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), caracterizado como ponto 4, sendo utilizado para fins comparativos. Aproximadamente 20 litros de água foram coletados em cada ponto de coleta em profundidade de aproximadamente 10 cm da superfície do espelho d'água. As amostras coletadas foram armazenadas em galões de polietileno e encaminhadas para o Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da UFGD.

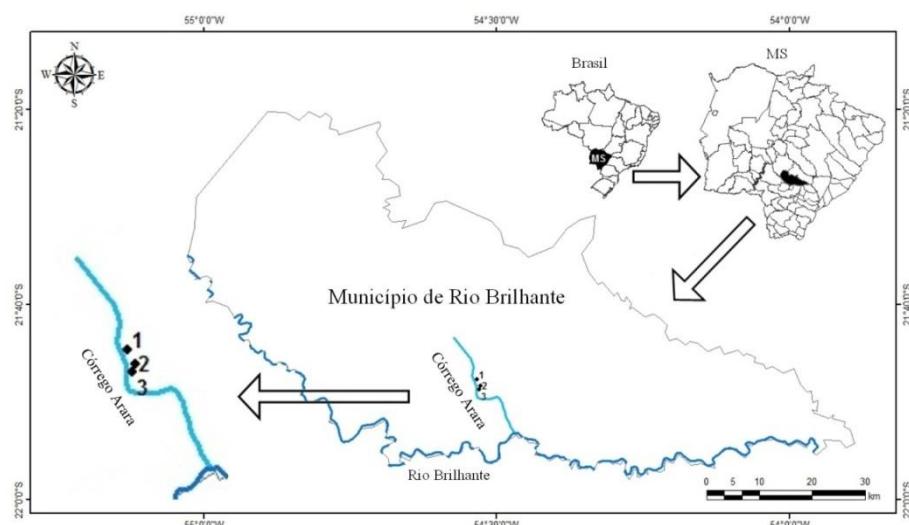


Figura 1. Mapa dos locais de coleta no Córrego Arara, município de Rio Brilhante, MS, Brasil. 1 (Ponto 1), 2 (Ponto 2), 3 (Ponto 3).

2.2. Testes de mutagenicidade e genotoxicidade em animal

As amostras de água coletadas foram acondicionadas em quatro aquários, sendo três deles para as amostras de águas superficiais provenientes do Córrego Arara (pontos 1, 2 e 3) e outro para a amostra de água subterrânea proveniente de poço artesiano no Tanque de irrigação da UFGD (ponto 4). O preparo consistiu em colocar a água coletada em aquários de vidro (40 x 30 x 20 mm), devidamente aerados, no Laboratório de Mutagênese da FCBA.

Após este período, dez espécimes de *Astyanax altiparanae*, fornecidos por uma piscicultura do município de Dourados, MS, foram adicionados em cada aquário, onde ficaram expostos pelo período de 72-h, com aeração e em temperatura ambiente. Dentre esses, 5 espécimes foram utilizados para o ensaio do cometa e os outros 5 para o teste do micronúcleo.

2.2.1. Teste de micronúcleo utilizando *Astyanax altiparanae*

O teste do Micronúcleo Písceo foi realizado para verificar a frequência de micronúcleos empregando-se a técnica descrita por Schmid (1975), com modificações. Após 72-h cinco espécimes de exposição à agua do córrego nos aquários *Astyanax altiparanae* foram retiradas de cada aquário e utilizados para o teste. Para isso, eles foram anestesiados em benzocaína 1%, e em seguida colheu-se o sangue periférico retirado da veia caudal e procedeu-se com a extensão sanguínea em lâminas de microscopia. De cada peixe montou-se uma lâmina, que após secas foram fixadas em etanol 96% durante 30 minutos e coradas com Panótico Rápido. Para análise de presença ou ausência de micronúcleos foram observadas 2000 células de cada peixe, no aumento total de 400X em microscópio óptico (Bioval).

2.2.2. Ensaio cometa utilizando *Astyanax altiparanae*

Para o ensaio do cometa foram utilizados 6 mL de sangue, coletados por punção branquial e diluídos em 2000 µL de solução salina (PBS). Duas lâminas de cada peixe foram confeccionadas com 20 µL de suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % (v/v) a 37 °C. As lâminas permaneceram em solução de lise, à 4 °C, por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram armazenadas em tampão NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. Em seguida, foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 15 minutos, fixadas em etanol por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹). Um total de 100 nucleóides de cada

lâmina foi observado em microscópio de fluorescência (Labomed - T121100) na objetiva de 400x.

Para avaliação da genotoxicidade realizou o ensaio cometa adaptado da metodologia de Ventura et al. (2008), onde foram utilizados os cinco espécimes expostos por 72h à água do Córrego Arara de *Astyanax altiparanae* provenientes de cada aquário contendo as amostras dos quatro pontos analisados. Foram confeccionadas duas lâminas por peixe. Os procedimentos anestésicos foram similares aos anteriormente citados. Foram colhidos 6,0 µL de sangue da região brânquial de cada animal e eluídos em 2,0 mL de PBS 1x. Dessa suspensão celular, 20,0 µL foram adicionados em 120,0 µL de agarose Low Melting de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C. A suspensão foi aplicada sobre a lâmina de microscopia, previamente gelatinizada com agarose comum e identificada, coberta com lamínula e acondicionada sob-refrigeração durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução de lise final e mantidas por 1 hora na geladeira. Após a lise, as lâminas foram armazenadas em tampão NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. para desnaturação do DNA. As lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 M por 15 minutos, fixadas em etanol 100% por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (0,02 mg mL⁻¹) e em seguida observadas os nucleóides em microscópio de fluorescência Nikon, em aumento total de 200X. Para cada lâmina foram contados 100 nucleóides, e classificados de acordo com o seu grau de dano.

2.3. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade em vegetais

2.3.1. Teste de Allium cepa

A citotoxicidade da água foi avaliada por meio do índice mitótico e a genotoxicidade através do índice de anormalidades cromossômicas, em radículas de *Allium cepa*, variedade Baia Periforme. As análises citogenéticas foram conduzidas de acordo com o procedimento descrito por Guerra e Souza (2002). Aproximadamente 15 sementes foram submetidas à germinação em placas de Petri com papel-filtro, contendo as amostras de água de cada ponto (1, 2, 3 e 4), sendo uma placa para cada ponto de estudo. Após 72h de germinação, as sementes com as radículas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético glacial) durante 6-h a temperatura ambiente e em seguida, transferidas para uma nova solução de Carnoy 3:1, mantendo-se as mesmas na geladeira até sua utilização. As radículas foram submetidas à hidrólise com ácido clorídrico (HCl) 1N a 60 °C durante 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas em Reativo de Schiff durante um período de 2-h, no escuro. Confeccionou-se 5 lâminas por ponto de cada coleta realizada, e a montagem das mesmas foi realizada por meio de esmagamento do meristema radicular. Um total de 1000 células por lâmina foram contadas e analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), no aumento total de 400X.

2.4. Análise química da água

A análise química das amostras de água foi realizada no Laboratório de Espectrometria e Cromatografia Aplicada (LECA) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET) da UFGD. Para isso, coletou-se 1000 mL de água de cada ponto de coleta em frasco âmbar, e aproximadamente 0,5 mL de ácido nítrico foram acrescentadas (para deixar o pH da água inferior à 2,0). Posteriormente, as amostras de água foram filtradas e armazenadas sobre refrigeração. As análises foram realizadas por meio do método de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS – “Flame Atomic Absorption Spectrometry”). Os elementos químicos analisados foram: cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, níquel e zinco.

2.5. Análise estatística

O número de micronúcleos (MCN), proveniente do teste de micronúcleo e os índices mitóticos (IM) e índices de anormalidades cromossômicas (IAC) provenientes do teste de *Allium cepa*, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente, as médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ($p<0,05$), sendo realizadas com auxílio do pacote computacional SAS® (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Os dados do ensaio cometa foram avaliados pelo teste qui-quadrado (χ^2), por meio do Programa BioEstat 4.0 (Ayres et al., 2005), a fim de se comparar o total de núcleos alterados de peixes expostos aos pontos de coleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de micronúcleo (MCN) em *Astyanax altiparanae* estão apresentados na Tabela 1. Na coleta realizada no mês de abril, não foi verificada diferença estatística na frequência de micronúcleos entre os pontos de coleta. Entretanto, na coleta realizada em junho, o ponto 2 apresentou maior número de micronúcleos, que os demais pontos, apesar da média não ter sido estatisticamente diferente dos pontos 1 e 3. O ponto 4 foi o que apresentou menor média de micronúcleos.

Tabela 1. Médias ± desvio padrão do teste de micronúcleo em *Astyanax altiparanae* e do teste de *Allium cepa*, observados nos dois períodos de coleta.

	<i>Allium cepa</i>					
	MCN		IM		IAC	
	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho
Ponto 1	3,10±0,65 ^a	3,70±1,03 ^{ab}	4,68±1,81 ^b	6,70±1,73 ^a	0,20±0,24 ^b	0,30±0,10 ^a
Ponto 2	2,70±0,57 ^a	4,50±1,17 ^a	8,74±3,00 ^{ab}	4,90±0,97 ^a	1,86±0,69 ^a	0,72±0,38 ^a
Ponto 3	1,50±1,06 ^a	3,00±0,93 ^{ab}	11,64±2,52 ^a	4,28±0,68 ^a	0,68±0,17 ^b	0,88±0,38 ^a
Ponto 4	2,30±0,90 ^a	2,30±0,67 ^b	8,94±4,58 ^{ab}	6,20±1,08 ^a	0,64±0,55 ^b	0,60±0,48 ^a

Nota: MCN: Micronúcleo; IM: Índice Mitótico; IAC: Índice de Anormalidades Cromossômicas. MCN, IM e IAC seguida pela mesma letra minúscula em determinada coluna não difere estatisticamente pelo teste Tukey ($p<0,05$).

Provavelmente, o número de micronúcleos dos pontos 1 e 3 foram estatisticamente iguais ao ponto 2, devido a elevada pluviosidade (263,2 mm) do mês de junho no município de Rio Brilhante, MS (Embrapa, 2013), visto que tanto o ponto 1 quanto o ponto 3 apresentam resquícios de poluição decorrente da ação humana, seja por meio de resíduos (orgânicos ou inorgânicos) ou uso indiscriminado de defensivos agrícolas.

Em relação à citotoxicidade avaliada por meio do teste de *Allium cepa*, no mês abril foi verificado que o ponto 3 apresentou maior índice mitótico (IM), embora a média não tenha sido estatisticamente diferente das obtidas nos pontos 2 e 4. O ponto 1 apresentou menor frequência de IM. Já para a coleta realizada em junho não foram verificadas diferenças significativas entre os pontos de coleta (Tabela 1).

Costa et al. (2008) apontam que não é possível identificar e determinar a toxicidade de determinadas substâncias presentes no meio, uma vez que seus efeitos podem ser influenciados por outras substâncias ou componentes, como propriedades químicas e físicas do ambiente, pluviosidade, temperatura, entre outros. Segundo Bollmann e Marques (2006), os danos celulares ocasionados podem ainda estar relacionados a outros fatores como, por exemplo, a contaminação do meio por agrotóxicos, poluentes atmosféricos, e materiais orgânicos e inorgânicos, provenientes basicamente do escoamento das águas da chuva.

A avaliação do IAC no mês de abril revelou que o ponto 2 foi o que apresentou maiores danos cromossômicos, possivelmente devido à presença do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto e seus componentes, o que resultou em maior taxa de danos. Esse resultado complementado pela análise química, sugere que os micronúcleos em *Astyanax altiparanae* podem ter sido induzidos pelas elevadas concentrações de cádmio e níquel ($0,087 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,600 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente), que segundo Dias et al. (2003), estes metais presentes em efluentes domésticos em elevadas concentrações estão associados a danos em plantas e animais.

Para a genotoxicidade, não foi verificado diferença estatística para o índice de anormalidades cromossômicas (IAC) entre os pontos de coleta, no mês junho de 2013 (Tabela 1).

Segundo Silva (2002), testes toxicológicos utilizando diferentes organismos vivos, como o teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo, podem apresentar respostas diferentes a um mesmo composto químico ou mistura, podendo este ser um fator para a divergência obtida entre os meses de coleta.

Na Tabela 2 estão apresentados os tipos de anormalidades cromossômicas encontradas nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*. Foram observadas anáfases com pontes cromossômicas e com quebras cromossômicas, c-metáfases, intérfases com micronúcleos e telófases com pontes cromossômicas. Para Grant (1982) as anormalidades das células de *Allium cepa* são maneiras eficientes de investigar possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos causados por substâncias químicas em ambientes aquáticos contaminados, seja por efluentes industriais ou domésticos.

Tabela 2. Análise de anormalidades cromossômicas do teste de *Allium cepa* nos dois períodos de coleta (média ± desvio padrão).

		Anormalidades Cromossômicas									
		Anáfase com quebra cromossômica		C-metáfase		Intérfase com micronúcleo		Telófase com ponte cromossônica			
		Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho		
Ponto 1		$0,2 \pm 0,44$	$2,8 \pm 1,09$	$0,2 \pm 0,44$	-	$0,2 \pm 0,44$	-	-	-	$0,2 \pm 0,44$	
Ponto 2		$2,0 \pm 2,34$	$4,0 \pm 2,34$	$1,2 \pm 1,64$	$0,2 \pm 0,44$	$3,2 \pm 1,64$	$1,8 \pm 1,64$	$5,8 \pm 4,43$	-	$2,0 \pm 1,58$	$1,2 \pm 1,30$
Ponto 3		$3,6 \pm 1,94$	$1,0 \pm 1,00$	$0,4 \pm 0,89$	-	$1,8 \pm 1,09$	$2,4 \pm 0,89$	-	$3,4 \pm 2,07$	$0,2 \pm 0,44$	$2,0 \pm 0,70$
Ponto 4		$0,4 \pm 0,89$	$2,6 \pm 2,07$	-	-	$0,8 \pm 0,83$	$0,8 \pm 1,09$	$1,4 \pm 1,67$	$2,2 \pm 4,91$	$1,6 \pm 1,34$	$0,4 \pm 0,89$

Na coleta do mês de abril, o maior número de anormalidades encontradas situam-se no ponto 2 (Tabela 2), com exceção das células que apresentaram anáfase com ponte cromossônica, sendo maior em junho. A quantidade de cromo observada no mês de abril, encontra-se superior no ponto 2, quando comparada aos demais pontos, explicando assim, a presença de células com c-metáfase. Matsumoto (2006) obteve resultado semelhante a esse trabalho, onde relatou a ação do cromo sobre o fuso mitótico, o principal causador de anormalidades cromossômicas do tipo c-metáfase. Segundo Sahi et al. (1998) o cromo tem potencial genotóxico, podendo induzir quebras e perdas cromossômicas, e resultar em anormalidades nas células dos organismos teste.

Os resultados do ensaio cometa estão apresentados na Tabela 3. Considerando o total de células analisadas com dano, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas do ponto 1 em relação ao ponto 4 (tanque de irrigação da UFGD), em ambos os períodos de coleta (Tabela 3). Diferentemente dos demais testes, no ensaio cometa a maior frequência de danos no mês de abril ocorreu no ponto 1, enquanto no mês de junho ocorreu nos pontos 2 e 4. Isso possivelmente pode estar relacionado à natureza dos testes utilizados. Segundo

Hartmann et al. (2001), o ensaio cometa apresenta-se mais sensível, quando comparado ao teste de micronúcleo, por detectar danos reversíveis no DNA.

Tabela 3. Médias das classes de dano obtidas através do ensaio cometa em *Astyanax altiparanae* em dois períodos de coleta.

		Classes de Dano					
		TCA	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	CS
Abril	Ponto 1	8,8*	4,2	0,4	2,4	1,8	19,4
	Ponto 2	17,2	8,0	6,4	2,0	0,8	30,0
	Ponto 3	9,8*	6,0	1,6	1,2	1,0	16,8
	Ponto 4	22,6	17,2	4,0	0,0	1,4	30,8
Junho	Ponto 1	17,4*	11,2	2,4	0,8	3,0	30,4
	Ponto 2	23,6	4,0	5,2	8,2	6,2	63,8
	Ponto 3	14,6*	7,0	5,4	0,8	1,4	25,8
	Ponto 4	33,0	5,2	5,4	10,0	12,4	95,6

Nota: **TCA:** Total de células analisadas com dano; **CS:** Pontuação do cometa. **Classe 1**= danos mínimos; **Classe 2**= danos médios; **Classe 3**= danos intensos; **Classe 4**= danos máximos. *Significativamente diferente em relação ao ponto 4, por meio do teste χ^2 com $p<0,05$.

Os resultados do ensaio do cometa estão apresentados na Tabela 3. Considerando o total de células analisadas com dano, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas dos pontos 1 e 3 em relação ao ponto 4 (tanque de irrigação da UFGD), em ambos os períodos de coleta (Tabela 3). A maior frequência de danos, nos dois períodos de coleta foi verificada no ponto 4.

Deve-se considerar ainda que a água proveniente do tanque de irrigação da UFGD possui origem subterrânea e sua classificação é diferenciada dos demais pontos. A elevada quantidade de elementos químicos acima do permitido pode explicar o alto número de danos neste ponto, apresentados pelo ensaio cometa. Segundo Salvadori et al. (2003), os danos avaliados por este teste aparecem antes que no teste de micronúcleo, pois é possível visualizar o micronúcleo somente após um ou mais ciclos de divisão celular.

Os pontos de coleta 1 e 3 apresentaram menor quantidade de células danificadas, para ambos os períodos de coleta (Tabela 3). De acordo com Belpaeme et al. (1998), os danos apresentados no ensaio cometa dependem não somente da amostra a ser analisada, mas também dos agentes genotóxicos presentes na mesma, do período de exposição, da espécie de peixe a ser utilizada e das condições experimentais.

As diferenças apresentadas entre os pontos e meses de coleta podem estar relacionadas a diversos fatores aos quais as águas estão expostas. Segundo Handy et al. (2003), as diferentes respostas apresentadas no biomarcador podem ser influenciadas por fatores abióticos como temperatura, pH e oxigênio, e fatores bióticos como microrganismos, animais e vegetais presentes naquele ambiente.

Os resultados positivos apresentados em ambos períodos de coleta sugerem que a provável presença de agentes genotóxicos nas amostras analisadas podem ter influenciado na boa qualidade da água. Porém, estes agentes não necessariamente são representados por compostos químicos. Segundo Rojas et al. (1999), os danos analisados através do ensaio cometa podem ser formados por diversos mecanismos, entre eles Mitchelmore e Chipman (1998) citam além dos compostos químicos, a digestão do DNA durante o processo de apoptose.

Entre os elementos químicos analisados, as concentrações de cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel, apresentaram-se acima da concentração máxima ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, $0,013 \text{ mg L}^{-1}$, $0,033 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,025 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) permitida para classe 3 de água

superficial, que são destinadas para abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais, de acordo com a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA (Brasil, 2005), em todas as amostras analisadas do Córrego Arara, das coletas realizadas em abril e junho.

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com os dados obtidos por Cavas et al. (2005), em que observaram a formação de micronúcleos em peixes quando expostos a cádmio e cobre, indicando sua ação genotóxica para estes organismos. Tagliari et al. (2006) verificaram um aumento de danos no material genético em bioindicadores expostos a elevadas concentrações de cromo, como demonstrado em estudo através do teste de *Allium cepa*.

A maior concentração de chumbo foi verificada nos ponto 4, para ambos períodos de coleta. Duffus (2002) propôs a capacidade deste metal se acumular no interior das células e consequentemente apresentar toxicidade às mesmas. Porém, sua toxicidade pode ser alterada em função do pH e dos teores de carbono presente no meio, formando complexos ou sendo adsorvidos (Baird e Cann, 2011).

Em relação ao níquel, Marques e Chierice (1993) demonstram que seu potencial genotóxico no ambiente aquático depende de fatores como pH e oxigênio dissolvido. Sua elevada concentração é ocasionada principalmente por efluentes domésticos, assim como pela erosão do solo e de rochas (Sawasdee e Köhler, 2009), concordando com os resultados apresentados pelo teste de micronúcleo.

Entre as amostras analisadas do ponto 4, nos meses de abril e junho, todos os elementos químicos analisados, com exceção do cálcio, magnésio e manganês, apresentaram-se acima da concentração máxima permitida pela Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008, do CONAMA, para as águas subterrâneas utilizadas para irrigação (Brasil, 2008).

O armazenamento dessa água a céu aberto antes da sua distribuição às lavouras submete a mesma à exposição aos fatores externos. Chaim (1995) apresenta a deriva dos agrotóxicos, durante sua aplicação, uma das formas de contaminação e diminuição da qualidade das águas, considerando-se a presença de pequenas plantações em suas proximidades. Walls et al. (1996) demonstraram que a presença de resíduos de agrotóxicos nas águas podem gerar um elevado grau de toxicidade aos organismos expostos.

Os valores máximos permitidos de cálcio e magnésio não se encontram nos padrões de qualidade de água superficial e subterrânea, estabelecidos pelo CONAMA através da Resolução 357/2005 (Brasil, 2005) e Resolução 396/2008 (Brasil, 2008), respectivamente. Sendo assim, não foi possível compará-los aos demais elementos químicos analisados.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se perceber a importância da utilização de múltiplos biomarcadores para avaliação a toxicidade em ambientes aquáticos. Pesquisas realizadas com estes organismos indicadores da qualidade da água podem servir de parâmetros aos demais estudos relacionados à preservação e conservação do ambiente.

Pesquisas futuras que possibilitem verificar a possível origem desses poluentes seriam de grande interesse para melhor explicar os resultados de alterações genotóxicas e mutagênicas observadas no presente estudo.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que todas as amostras de água analisadas do Córrego Arara apresentaram possível potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico à animais e vegetais, que estão em contato com a mesma, devido à presença de substâncias e materiais poluentes derivados ou não de ações antrópicas.

Considerando-se a utilização e importância das águas deste córrego para o município de Rio Brilhante, MS, esse trabalho pode contribuir como ferramenta de suporte ao controle da

qualidade da água a fim de auxiliar ações e medidas para recuperação do Córrego Arara (Rio Brilhante, MS).

5. AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Universidade Federal da Grande Dourados pelo apoio financeiro e logístico, à Douradense Piscicultura pelo fornecimento dos peixes, a todos os alunos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Animal pelo auxílio na realização dos testes, ao professor Dr. Joelson Gonçalves Pereira e sua aluna Chun Pun Hung por terem ajudado na elaboração do mapa e ao professor Dr. Jorge Luiz Raposo Júnior por ter realizado as análises químicas das amostras de água.

6. REFERÊNCIAS

- ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Evaluation of the cytogenotoxicity of textile effluents using *Allium cepa* L. **Revista Ambient. Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.198>
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 4.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: ONG Mamirauá, 2005.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 844.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flat fish. **Mutation Research**, v. 415, p. 167-184, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00062-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00062-X)
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.006>
- BOLLMANN, H. A.; MARQUES, D. M. L. M. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 343-352, 2006.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2008.
- CAVAS, T.; GARANKO N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>

- CHAIM, A. Impacto ambiental de agrotóxicos e biopesticidas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 8, n. 1, p. 9-10, 1995.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. I. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- DIAS, N. M. P.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C.; CAMARGO, O. A. Energia livre da reação de adsorção de cádmio em latossolos ácricos. **Revista Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 829-834, 2003.
- UFFUS, J. H. "Heavy metals" - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Guia clima: Estação da Embrapa Agropecuária Oeste**. 2013. Disponível em: <<http://www.cpaq.embrapa.br/clima/?lc=site/estatisticas/estatisticas>>. Acesso em: 11 de fev de 2014.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.
- GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutation Research**, Orlando, v. 99, n.3, p. 273 -29, 1982. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-X](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X)
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: FUNPEC, p. 131, 2002.
- GUPTA, A. K.; AHMAD, I.; AHMAD, M. Genotoxicity of refinery waste assessed by some DNA damage tests. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, in press, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.032>
- HANDY, R. D.; GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H. A proposal for the use f biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 331-343, 2003.
- HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; RADDATZ, K.; GRÜNERT-FUCHS, M.; SPEIT, G. Does physical activity induced DNA damage? **Mutagenesis**, v. 9, p. 269-272, 2001.
- HOSHINA, M. M.; DE ANGELIS, D. DE F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 656, n. 1-2, p. 44-48, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.07.004>
- INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL – IMAP MS. **Bacia do Rio Ivinhema**: diagnóstico hidroambiental e socioeconômico. Campo Grande: Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos/Instituto de Meio Ambiente Pantanal. Gerência de Recursos Hídricos, 2006.
- MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233711412425>

- MARQUES, A. L. B.; CHIERICE, G. O. Trace nickel determination with phenyl dithiocarbamate in sea water, by adsorptive stripping voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 4, n.1, p.17-19, 1993.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. 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**, v. 29, p. 148-158, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALLAGUTI, M. I.; MARIN-MORALES, M. A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. **Cytologia**, v. 68, p. 395-401, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>
- MELO, K. M.; GRISOLIA, C. K.; PIECZARKA, J. C.; SOUZA, L. R.; FILHO, J. S.; NAGAMACHI, C. Y. FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mutagenesis**, v. 29, n. 3, p. 215-219, 2014.
<http://dx.doi.org/dx.doi.org/10.1093/mutage/geu005>
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00252-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2)
- RADIĆ, S.; STIPANICER, D.; VUJCIĆ, V.; RAJCIĆ, M. M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1228-1233, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055>
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, n. 2-3, p. 113-119, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00118-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00118-1)
- RIBEIRO, D. L.; BARCELOS, G. R. M.; D'ARCE, L. P. G. Genotoxic Effects of Water from São Francisco River, Brazil, in *Astyanax paranae*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 274-279, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00128-014-1291-9>
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 25-254, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00313-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00313-2)
- RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 2, p. 168-174, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7)
- SAHI, A. N.; SINGH, S. K.; SEM, P. K.; SINGH, R. N. Cytogenetic response of hexavalent chromium-induced somatic cell abnormalities in *Allium cepa*. **Cytobios**, v. 96, p. 71-79, 1998.

- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003.
- SÁNCHEZ-GALÁN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.; GARCÍA-VÁSQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, v. 412, p. 219-225, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00186-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00186-1)
- SAWASDEE B.; KÖHLER, H. R. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1539-1547, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.08>
- SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M.; KAYSER, M. L.; RODRIGUES, M. T.; MALUF, S. W.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.4, p.1217-1222, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000600011>
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)
- SILVA, A. C. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; VAZ ROCHA, J. A.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicidade do Sedimento e Estresse Oxidativo Hepático em Peixes sob a Influência de Curtumes. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, p. 57-61, 2006.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. et al. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- VENTURA, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>
- WALLS, D.; SMITH, P. G.; MANSELL, M. G. Pesticides in groundwater in Britain. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 6, p. 55-62, 1996.
- WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00002-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00002-7)