

ESTRESSE TOXICOLÓGICO EM UM RIO ALTAMENTE IMPACTADO NO AMBIENTE PORTUÁRIO DE SANTOS, SP

Maria L. S. Ventura^{a,1b}, Isadora D. R. Curraladas^{a,1b}, Marco A. dos Santos^{a,1b}, Mirian A. Boim^{a,1b}, Edgar Maquigusa^{a,1b}, Paula A. S. Bastos^a, Jorge E. S. Sarkis^b, Marcos A. Hortellani^b e Elizabeth B. Oliveira-Sales^{a,*,1b}

^aPós-Graduação Mestrado Profissional em Saúde e Meio Ambiente, Universidade Metropolitana de Santos, 11045-002 Santos – SP, Brasil

^bCentro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN), 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 11/08/2023; aceito em 16/11/2023; publicado na web 19/01/2024

TOXICOLOGICAL STRESS IN A HIGHLY IMPACTED RIVER FROM THE PORT ENVIRONMENT OF SANTOS, SP. There are many stilts and industry, which discharge sewage, domestic garbage and industrial effluents in the Pouca Saúde River from the port environment of Santos, São Paulo (SP) State. However, ecotoxicological studies in this river are rare. In this study, we seek to fill this gap by analyzing physicochemical, toxicological, and chemical conditions. Surface water and sediment samples were collected at 2 sampling sites with riparian community activities and industrial activities in the summer, autumn, winter and spring. The parameters analyzed were pH, alkalinity, turbidity, salinity, oils, greases, dissolved oxygen (DO), toxicological and cytotoxicity with mitotic index (MI) of onion roots using *Allium cepa* roots, and concentration of Pb, Zn, Hg, Ni and Cd. Our results showed alterations in the DO, turbidity, oils/greases and reduction of MI when compared to the respective control. Ni and Zn in sediment samples presented concentrations exceeding levels occasionally associated with adverse biological effects “threshold effect level”. These results suggested that the water quality of the Pouca Saúde River is influenced by both presences of heavy metals contamination and the seasons, *i.e.* by the tide. Thus, the toxic potential monitoring carried out in this study is of paramount importance to this river.

Keywords: *Allium cepa*; cytotoxicity; mitotic index; heavy metals; environmental monitoring.

INTRODUÇÃO

O Sistema Estuarino de Santos é formado por uma vasta e complexa rede de canais, rios, braços de mar, ilhas e ilhotas e está situado na Região Metropolitana da Baixada Santista, litoral do Estado de São Paulo, e inclui os estuários de Santos e São Vicente. Esse sistema se destaca como um dos mais importantes exemplos brasileiros de degradação ambiental causada pela poluição.¹ O Pólo Industrial de Cubatão reúne empresas de cinco grandes setores: petroquímico, siderúrgico, químicos, fertilizantes e logística, além da produção de energia e da prestação de serviços. Muitos dos produtos que abastecem o mercado brasileiro são 100% produzidos em Cubatão, por exemplo, a gasolina de aviação, usada nos aeroportos do Brasil sai exclusivamente da região, além do ácido nítrico 53% e o ácido nítrico concentrado, usados em laboratórios e indústrias, coque calcinado de petróleo, nitrato de amônio (grau fertilizante e grau técnico), resíduo aromático, soda anidra e benzeno.² A cidade de Cubatão fica localizada a 26 km do Porto de Santos. As indústrias dessa região geram muitos efluentes industriais que são lançados em rios que deságuam no estuário de Santos.³ Embora haja diretrizes estabelecidas pela CETESB, não estão disponíveis dados sobre os lançamentos industriais no rio e, portanto, lançamentos indevidos podem ocorrer.

A contaminação dos sedimentos dessa região está diretamente ligada com a poluição das águas e tem origem tanto das contribuições industriais e portuárias, como também de esgoto doméstico e de efluentes de marinas e de chorume de lixões e aterros industriais irregulares.^{4,5}

Os processos de dragagens e alterações ambientais podem disponibilizar os contaminantes presentes no sedimento, tanto para a coluna d'água como para a comunidade bentônica. Os sedimentos são os maiores repositórios de poluentes no ambiente aquático, por

isso, a sua contaminação é utilizada como um importante indicador ambiental de poluição, servindo para mapear, traçar e monitorar fontes antropogênicas de contaminação e/ou anomalias causadas por processos geoquímicos naturais.¹

Além disto, a contaminação com metais tóxicos como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) é bastante comum nessas áreas industriais.⁶ Os metais tóxicos são compostos não biodegradáveis e altamente bioacumulativos que podem colocar em risco a saúde de seres humanos, animais e espécies vegetais devido aos seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos, além da toxicidade a diversos órgãos e tecidos.⁷ O risco de contaminação por metais pode ainda ser potencializado, principalmente em áreas ribeirinhas susceptíveis à inundações por rios que trazem metais de áreas distantes, contaminam o solo local e novamente os rios adjacentes.^{8,9} Adicionalmente, algumas substâncias podem apresentar riscos aos ecossistemas e alterar as características físico-químicas de um ambiente aquático, devido às concentrações em excesso.¹⁰

Na região portuária de Santos localiza-se o Rio Pouca Saúde, no bairro Porto em Guarujá. Ele é designado como uma gamboa, nome dado a um braço de rio de mangue, que não tem nascente e está sempre sob influência da maré, quando a maré está baixa pode ficar completamente seca.¹¹ Ao longo do rio, diversas indústrias e postos de armazenamento coexistem com a comunidade, incluindo uma unidade básica de saúde da família - USAFA Sítio Conceiçãozinha¹² e o Hospital Guarujá. Na parte inicial do rio localiza-se o Armazém verde que dentre os produtos que serão armazenados no novo espaço estão surfactantes (usados em produtos de limpeza, por exemplo), polióis (usados em espumas para colchões e estofados) e biocidas (soluções para controle microbiano).¹² Seguindo o percurso no km 1 do lado direito, encontra-se o terminal portuário da Cargill que transporta grãos e açúcares. Do lado esquerdo da margem estão as Indústrias Dow Química Brasil, Olin e a Sucocitrico Cutrale. As empresas Olin e Dow Química Brasil (mesmo grupo) trabalham

*e-mail: betholiveira@gmail.com

com solventes, resinas, amins, polímeros, epoxi e cloro alcalino. Já a empresa Sucocitricio Cutrale trabalha com fabricação de sucos e óleos.⁴ Passando a ponte da Avenida Santos Dumont, no km 1,5 do lado direito, encontra-se o Hospital Guarujá e do outro lado da margem o Canil São Lazaro. Também há muitas palafitas, as quais lançam esgoto *in natura* e lixo doméstico diretamente nas águas do Rio Pouca Saúde.⁵

A água desse rio é utilizada de forma direta e indireta pela população ribeirinha, desde a utilização para cozimento dos alimentos, como através do consumo de pescados e uso recreativo para população em geral,¹⁰ e, portanto, esta população está diretamente exposta aos possíveis contaminantes do rio.

Substâncias tóxicas presentes em efluentes domésticos, industriais e agrícolas sabidamente causam inúmeros problemas de saúde afetando diversos órgãos e sistemas. Além disto, muitos contaminantes são capazes de provocar danos graves ao DNA de células interferindo na função de diversos órgãos, podendo inclusive influenciar os aspectos genéticos e na sobrevivência de organismos aquáticos e da população ribeirinha.¹³

Os testes ecotoxicológicos são indispensáveis para a avaliação da qualidade da água, das reações dos organismos vivos à poluição ambiental e também para identificar os efeitos potenciais de vários poluentes nos ecossistemas.^{14,15} Sabe-se que citotoxicidade é a capacidade de compostos em promover alteração metabólica nas células, podendo culminar ou não em morte celular. A técnica de análise citotóxica realizada a partir da germinação da raiz da cebola *Allium cepa* L. tem sido recomendada para análises de efluentes como bioindicador genotóxico devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e da utilização de amostras sem tratamento prévio, determinando-se a diminuição do índice mitótico e a formação de aberrações cromossômicas.¹⁶⁻¹⁹

Estudos de avaliação de toxicidade utilizando a técnica da germinação da raiz da *Allium cepa* L. para observar o desenvolvimento genético ainda não foram efetuados na região do Rio Pouca Saúde. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram: (i) investigar a presença de metais tóxicos nas águas e sedimentos do Rio Pouca Saúde, um rio altamente impactado pela atividade industrial e urbana, localizado na margem esquerda do estuário de Santos, contendo interferentes de contaminações portuárias, industriais e de esgoto doméstico; (ii) realizar avaliação ecotoxicológica destas águas através do teste biológico de cebola (*Allium cepa* L.). Deste modo, pretendeu-se identificar possíveis poluentes em amostras de água e sedimentos coletados do Rio Pouca Saúde, para assim orientar essa população e o poder público alertando quanto aos riscos em consequência à utilização do rio.

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta de amostras

As amostras de água foram coletadas em dois pontos distintos do Rio Pouca Saúde em águas superficiais próximas à margem durante as 4 estações do ano de 2021, no primeiro mês de cada estação, março, junho, setembro e dezembro. O ponto 1 (P1), latitude 23.975788, longitude 46.281542, fica próximo da saída do canal do estuário de Santos, uma região chamada de “Prainha”, com muitas palafitas ao redor, onde o esgoto é lançado *in natura* no rio, e com muito lixo. O ponto 2 (P2), latitude 23.969540, longitude 46.278964, fica próximo à Avenida Santos Dumont, uma região mais afastada, com descarte de efluentes industriais e com muitos moradores de baixa ou nenhuma renda, que fazem uso direto da água do rio e dos pescados.¹¹ As amostras de água foram coletadas utilizando um coletor de alumínio adaptado com corda de algodão, sendo o material imediatamente

transferido para diferentes frascos de polipropileno (1 L) com tampa, devidamente limpos, secos e identificados para evitar erros. Posteriormente, as amostras foram armazenadas durante 7 dias, em refrigerador a uma temperatura de 4 °C, até serem analisadas.

Análises físico-químicas

A determinação do pH das amostras foi realizada por medição direta utilizando-se pHmetro (Digimed DM20) equipado com eletrodo combinado modelo Sensotec e calibrado com as soluções-tampão 7 e 10 no momento do uso.²⁰ A alcalinidade foi determinada por volumetria conforme a metodologia 2320 descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.²⁰ A determinação da turbidez foi realizada por método fotométrico utilizando-se turbidímetro modelo Turbidímetro Bancada II / Plus II. A amostra sem tratamento prévio foi transferida para uma cubeta de 8 cm de altura com tampa de rosca e acondicionada no aparelho, sendo a turbidez expressa em NTU (unidade nefelométrica de turbidez).²⁰ A análise da salinidade foi realizada diretamente por refratômetro modelo Quimis 107.1. O aparelho foi calibrado com água destilada no momento do uso e o resultado foi lido no próprio equipamento e expresso em partes por mil (‰).²¹ Os óleos e graxas foram extraídos das amostras utilizando-se extrações sequenciais com *n*-hexano em funil de separação de 2 L. As frações foram transferidas para um balão de destilação, previamente pesado, através de um funil contendo sulfato de sódio para evitar a contaminação por água, o solvente foi evaporado e os óleos e graxas foram quantificados por pesagem do balão com precisão de $\pm 0,1$ mg, sendo expressos em mg L⁻¹. O *n*-hexano usado no ensaio foi recuperado por destilação e reutilizado.²⁰ O oxigênio dissolvido foi quantificado no momento da coleta através do oxímetro modelo AT160 com calibração automática.¹⁹

Análise citotóxica por meio do teste *Allium cepa* L.

A análise citotóxica por meio do teste *Allium cepa* L. foi realizado com base no estudo de Fiskesjö.²¹ Os testes foram realizados com cebolas do tipo pirulito de tamanho e peso previamente padronizados (Tabela 1). Foram cultivadas 11 cebolas para cada amostra, em béquer contendo as amostras de água coletadas dos diferentes pontos do rio e períodos do ano. As amostras de água foram utilizadas em sua forma pura não diluída. Foi usado um grupo controle para comparação dos resultados, constituído de cebolas crescidas em água destilada. Antes de colocá-las no meio para crescimento, as raízes já existentes nos bulbos de *Allium cepa* L. foram retiradas, a fim de que as células analisadas fossem todas de raízes crescidas no meio investigado. Os vegetais foram colocados em recipientes com 60 mL para cada solução, de maneira que apenas a parte inferior do bulbo estivesse em contato com seu meio de cultivo. Os experimentos foram mantidos a temperatura ambiente entre 25 e 27 °C, ciclo de luz normal, sem renovação de água, apenas completando o volume. O crescimento das raízes foi monitorado a cada 24 h durante 72 h. Para avaliação dos aspectos macroscópicos foram analisadas alteração da cor, formato e tamanho da raiz. O comprimento das raízes foi medido utilizando uma régua. Qualquer alteração nos aspectos físicos pode ser indício de substâncias tóxicas na água.²¹ Após esse período, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol e ácido acético (3:1) em temperatura ambiente por 24 h, em seguida transferida para álcool 70% e colocadas na geladeira até o momento da análise. Para preparação das lâminas, os meristemas radiculares de cada amostra foram cuidadosamente submergidos por 5 min em água destilada, em seguida colocados em solução de ácido clorídrico 5 mol L⁻¹, por 20 min e recolocados em água destilada por 5 min, posteriormente colocados em uma lâmina e com auxílio de um bisturi foi seccionada a região meristemática apical.

Após esse procedimento foi adicionado 10 µL de Giemsa 20% por 5 min e lavado com água destilada. Posteriormente, foi adicionada uma gota de balsamo do Canadá, cobrindo com uma lamínula, realizando a técnica de esmagamento.²¹ Para determinação do índice mitótico (IM%) foram analisadas 400 células em microscópio óptico Zeiss, observando a lâmina da esquerda para direita e contabilizando todas as células em mitose. Em seguida, foi calculado o índice mitótico considerando $IM\% = \text{No. de células em mitose} / \text{No. de células analisadas} \times 100$. Considerando que resultados maiores ou iguais a 50% são níveis tóxicos.²¹

Análise dos metais potencialmente tóxicos em águas superficiais e sedimentos

As amostras foram coletadas em campo, preservadas no isopor com gelo até o laboratório da universidade. Posteriormente, foram acidificadas e devidamente acondicionadas em geladeira, e logo após, encaminhadas para a empresa Controle Analítico Análises Técnicas Ltda, Osasco, São Paulo, a qual realizou a análise dos metais Cd, Hg, Ni, Pb e Zn em sedimentos brutos, fração total, em 3 amostras de cada ponto. O método de preparo das amostras utilizado foi de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* EPA SW 846-3050B (1996), trata-se de uma digestão ácida seguida de leitura das amostras por meio do espectrofotômetro de absorção atômica com fonte de plasma, previamente calibrado por curvas de calibração de concentração conhecida e branco (ICP_OES) conforme referência da EPA SW-846-6010D.²⁰

As coletas das amostras de água para análise dos metais tóxicos foram realizadas nos pontos P1 e P2 no outono de maneira dinâmica. Para isso, foi utilizada uma garrafa PET com a parte inferior aberta, a qual foi colocada submersa deitada com a tampa aberta para que a água transpassasse a garrafa. Após 3 min, a tampa da garrafa foi fechada para realizar a coleta da água para análise. A coleta do P1 foi realizada a 0,7 m de profundidade e a 1,1 m da margem com velocidade média de correnteza de 0,5 seg m⁻¹. A velocidade foi calculada limitando 1 m do rio por meio de uma trena, assim com o auxílio de uma garrafa PET de 200 mL amarrada em um rolo de barbante foi cronometrado o tempo que ela levou para sair do ponto de partida e chegar ao ponto final. No P2 a profundidade foi de 0,9 m e 1,5 m de distância da margem com velocidade de correnteza de 0,4 seg m⁻¹. A análise dos metais foi realizada diretamente na água bruta em 3 amostras de cada ponto, sendo que na presença de material particulado foi realizada a digestão ácida das amostras.

Inicialmente a presença de metais pesados foi estimada em amostras de água coletadas em diversos pontos do rio. Entretanto, pelos métodos utilizados, nenhum metal foi identificado. Este achado não foi surpresa considerando que os metais pesados tendem a se acumular nos sedimentos do leito do rio. Assim, em uma segunda etapa foi realizada a análise dos sedimentos, também coletados em diversos pontos, conforme detalhado a seguir.

As coletas de sedimentos do leito do rio para análise de metais tóxicos foram realizadas nos pontos P1 e P2 no inverno e na primavera utilizando uma draga Van Veen para coleta dos sedimentos brutos e acondicionados em sacos incolores identificados e armazenados em isopor. A coleta do P1 foi realizada a 0,1 m de profundidade e 1,1 m de distância da margem com água sem movimentação. No P2 a profundidade era de 0,5 m, 1,5 m de distância da margem e velocidade média de 9 seg m⁻¹. As amostras foram coletadas em campo, preservadas no isopor com gelo até o laboratório. Posteriormente, foram acidificadas e devidamente acondicionadas em geladeira, e logo após encaminhadas para análise dos metais Cd, Hg, Ni, Pb e Zn em sedimentos bruto, 3 amostras de cada ponto, em laboratório especializado.

Para a verificação do impacto causado pela presença desses metais poluentes, foram considerados dois critérios. O primeiro critério foi proposto pela *Environment Canada* e utilizado no relatório técnico da CETESB (Companhia Tecnológica de Saneamento Básico) de 2001: TEL (*threshold effect level*), nível abaixo do qual não ocorre efeito adverso na comunidade biológica e PEL (*probable effect level*), nível acima do qual é provável a ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica, sendo que a faixa entre o TEL e o PEL representa uma possível ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica.⁵ O segundo critério segue a regulamentação dos Estados Unidos e utilizada pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente): o ERL (*effects range - low*), o limite de concentração abaixo do qual os sedimentos raramente são tóxicos, ERM (*effects range - medium*), sedimentos provavelmente são tóxicos, quando algum elemento metálico ultrapassa esse valor e a faixa maior que o ERL e menor que o ERM indica que os sedimentos possivelmente são tóxicos.²²

Análise estatística dos resultados físico-químicos e citotóxicos

A presente análise baseia-se em um experimento executado sob o plano fatorial com dois fatores experimentais, sendo a origem da amostra, na qual a cebola foi cultivada, um fator com três níveis (controle, P1 e P2) e a estação do ano outro fator com quatro níveis (primavera, verão, outono e inverno). Os efeitos dos fatores experimentais sobre cada resposta descrevendo uma medida de toxicidade foram testados individualmente. Sempre que possível, em coerência com a análise exploratória correspondente e a natureza da resposta, foi ajustado um modelo estatístico paramétrico para explicar a oscilação da resposta associada aos fatores experimentais. Cada modelo apresentado teve a adequação do ajuste aos dados ratificada por meio das correspondentes medidas diagnósticas, análise confirmatória e envelope dos resíduos. Via de regra, tal modelagem seguiu o escopo dos modelos lineares generalizados (MLG). Em caso incompatível com a modelagem paramétrica, a significância estatística dos efeitos foi testada em abordagem não paramétrica de ANOVA precedida de transformação por ranques. Quando apropriado, comparações múltiplas *post-hoc* foram empregadas para aprofundar e detalhar a interpretação dos efeitos. Em todas as análises estatísticas, foi adotado o nível de significância usual de $\alpha = 0,05$. Por fim, todos os processamentos e etapas da análise estatística foram realizados no programa R, RStudio versão 2022.07.0.²³

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

As propriedades físico-químicas das amostras estão detalhadas na Figura 1. Para todas essas características avaliadas, observou-se desvios padrão pouco expressivos entre as triplicatas, indicando a precisão do método de mensuração. O pH das amostras P1 e P2 foram equiparáveis durante o verão e outono (Figura 1A). No inverno, a amostra P1 mostrou-se ligeiramente mais ácida que a P2, um padrão que se inverteu na primavera. De todo modo, a oscilação observada manteve-se limitada ao intervalo de referência estabelecido pela Resolução CONAMA No. 357/05, classe 3, sendo pH entre 5 e 9.²⁶ A alcalinidade da água, por sua vez, manteve-se superior na amostra P2 do verão ao inverno, mas diminuiu na primavera, tornando-se inferior ao observado na amostra P1 nesta estação (Figura 1B). A dureza da água é estimada pela concentração de carbonato de cálcio (CaCO₃) e é classificada segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)²⁴ de acordo com as seguintes concentrações: superior a 180 mg L⁻¹ - muito dura; entre 120-180 mg L⁻¹ - dura;

entre 60-120 mg L⁻¹ - moderadamente dura e inferior a 60 mg L⁻¹ - macia. Dureza acima de 180 mg L⁻¹ de CaCO₃ pode induzir à formação de incrustações nas canalizações e água com dureza inferior a 60 mg L⁻¹ pode ser agressiva e provocar fenômenos de corrosão no sistema de abastecimento de água.²⁵ Todos os resultados das análises desse parâmetro no presente estudo foram superiores a 180 mg L⁻¹ sendo caracterizada uma água muito dura. Já a turbidez da água, ainda que em desacordo com a sua ausência conforme preconizada pela Resolução CONAMA No. 357/05,²⁶ mostrou-se substancialmente baixa e estável em ambas as amostras, no verão e no outono, variando de 1,3 a 1,7 NTU (Figura 1C). Contudo, tal medida aumentou consideravelmente nas amostras coletadas durante o inverno, alcançando até 45,5 NTUs na amostra P1. Na primavera, a turbidez da água retornou a níveis ligeiramente superiores àqueles registrados no verão. Sabe-se que a turbidez é provocada por partículas em suspensão, sendo, portanto, reduzida por sedimentação, além da ocorrência de origem natural a turbidez da água pode também ser causada por lançamentos de esgotos domésticos ou industriais.²⁷ No caso da salinidade, observou-se considerável estabilidade entre as mensurações a despeito da origem da amostra e estação do ano (Figura 1D). E ainda, a oscilação observada restringe-se aos limites de referência estabelecidos pela Resolução CONAMA No. 357/05, classe 3, água salobra maior que 0,5 até 30%.²⁶ Além disso, observou-se que a quantidade de óleos e graxas na água é superior na amostra P2 ao longo de todo o ano, mas essa discrepância diminuiu no outono, à medida que a abundância dessas substâncias reduz como um todo (Figura 1E). A partir do inverno, a quantidade de lipídeos nas águas volta a aumentar, sobretudo em P2, resultando em acentuada disparidade entre as amostras na primavera. Nesse contexto, cabe ressaltar que a referência da CONAMA²⁶ é a de ausência de óleos e graxas na água. Por fim, a quantidade de oxigênio dissolvido na água parece sensível à estação do ano, e ainda de modos diferentes

conforme a origem das amostras (Figura 1F). Ao longo do ano, ainda que alcance níveis mais elevados no outono, a quantidade de oxigênio dissolvido nas amostras P2 permanece abaixo dos limites de referência da Resolução CONAMA No. 357/05, não inferior a 3 mg L⁻¹.²⁶ Nas amostras P1, o oxigênio dissolvido até ultrapassa sutilmente o limite inferior de referência no verão e outono, mas diminui abruptamente no inverno, aproximando-se do zero. Na primavera, o oxigênio dissolvido em P1 retorna a níveis próximos ao outono, porém aquém do limite de referência.

Como definido anteriormente, o Rio Pouca Saúde é uma gamboa e, portanto, o fluxo de suas águas é diretamente influenciado pela maré. Sabidamente as oscilações do nível do mar são constantemente influenciadas por ações meteorológicas e, durante o inverno do hemisfério Sul, essas oscilações são mais intensas no litoral Sudeste do Brasil, favorecendo eventos extremos de maré baixa.^{27,28} Essas condições poderiam favorecer o aumento da turbidez e a redução do oxigênio dissolvido nas águas do Rio Pouca Saúde durante o inverno. Interessante observar que essas alterações foram mais proeminentes em P2, ponto de coleta mais distante do mar e, portanto, mais suscetível aos efeitos da maré baixa.

Resultados da análise citotóxica por meio do teste *Allium cepa* L.

A ecotoxicidade da água do Rio Pouca Saúde foi avaliada por meio do efeito de suas amostras sobre o desenvolvimento de cebolas. As biomassas das cebolas utilizadas estão representadas na Tabela 1.

Após a exposição às amostras de água, o desenvolvimento das cebolas foi avaliado, resultando nos dados apresentados na Figura 2. Com relação ao comprimento das raízes, observou-se o encurtamento das raízes em cebolas crescidas em amostras coletadas tanto de P1 como de P2 em comparação com a amostra controle. Além disso, constatou-se também a significância estatística da influência da

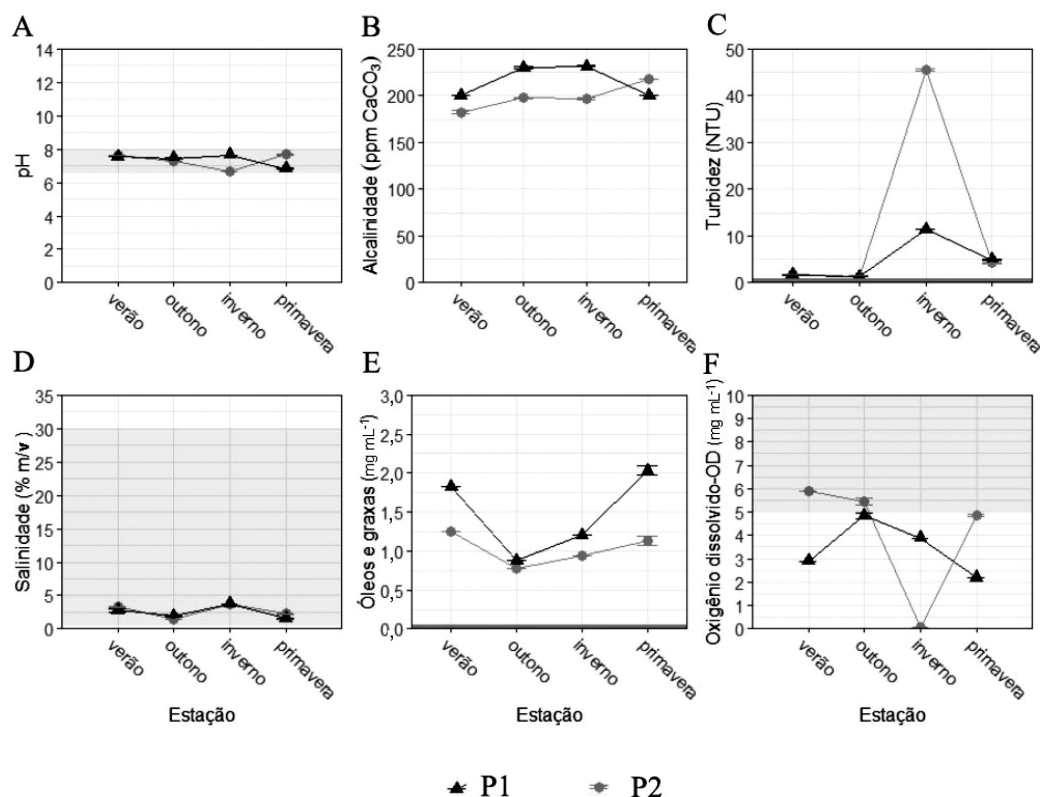


Figura 1. Propriedades físico-químicas das amostras de água conforme o local de coleta e a estação do ano. As barras verticais ilustram o erro padrão entre as triplicatas. A região de cada gráfico destacada em cinza claro corresponde ao limite de referência estabelecido pela Resolução CONAMA No. 357/05, classe 3.²⁶ Para a turbidez e a quantidade de óleos e graxas tal referência é a ausência da medida

Tabela 1. Biomassa das cebolas utilizadas no teste *Allium cepa* L.

	Controle	P1	P2
Verão	38,5 ± 5,1	36,4 ± 4,3	34,3 ± 5,0
Outono	47,2 ± 8,9	40,4 ± 2,1	46,1 ± 7,5
Inverno	22,7 ± 2,7	20,9 ± 1,6	20,8 ± 2,6
Primavera	37,0 ± 1,3	40,1 ± 0,9	36,5 ± 2,8

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

estação do ano sobre o comprimento das raízes, conforme ilustrado na Figura 2A (veja Material Suplementar, Tabelas 1S e 2S).

De maneira análoga ao comprimento, a quantidade de raízes desenvolvidas pelas cebolas mostrou-se sensível à origem da amostra utilizada em seu cultivo. No caso da exposição à amostra P1, estima-se que, no geral, o número médio de raízes reduza significativamente 82% em relação a amostra controle. Por sua vez, a exposição à amostra P2 é estimada em diminuir significativamente, em comparação com a amostra controle, o número médio de raízes em 74%. Além disso, os dados também fornecem evidências consistentes para endossar

a influência da estação do ano no número de raízes das cebolas. Comparado ao verão, estima-se que o outono esteja associado a uma redução média de 32% na quantidade de raízes. O efeito estimado seria ainda maior na primavera (em comparação ao verão), atingindo uma redução média de 53% (Figura 2B). Por fim, o modelo estatístico que embasa toda essa inferência é validado no Material Suplementar (Figura 1S e Tabela 3S), corroborando a conformidade das conclusões derivadas desse modelo. Krüger²⁹ também considerou como efeito de toxicidade, a inibição do crescimento radicular, o que pode estar associado também a queda do número de raízes.

Em virtude da sua relevância no modelo biológico de ecotoxicidade, buscamos investigar quais seriam as principais características físico-químicas da água subjacentes aos efeitos descritos acima da origem da amostra e da estação do ano sobre a quantidade de raízes. Nesse contexto, foi testada e confirmada a significância estatística do efeito da salinidade, bem como dos óleos e graxas sobre a quantidade de raízes da cebola. No caso da salinidade, estima-se que, uma vez mantido constante o nível de óleos e graxas, cada incremento de uma unidade (% m/m) repercute, em média, na redução de 71% no número de raízes. Tal efeito é ilustrado

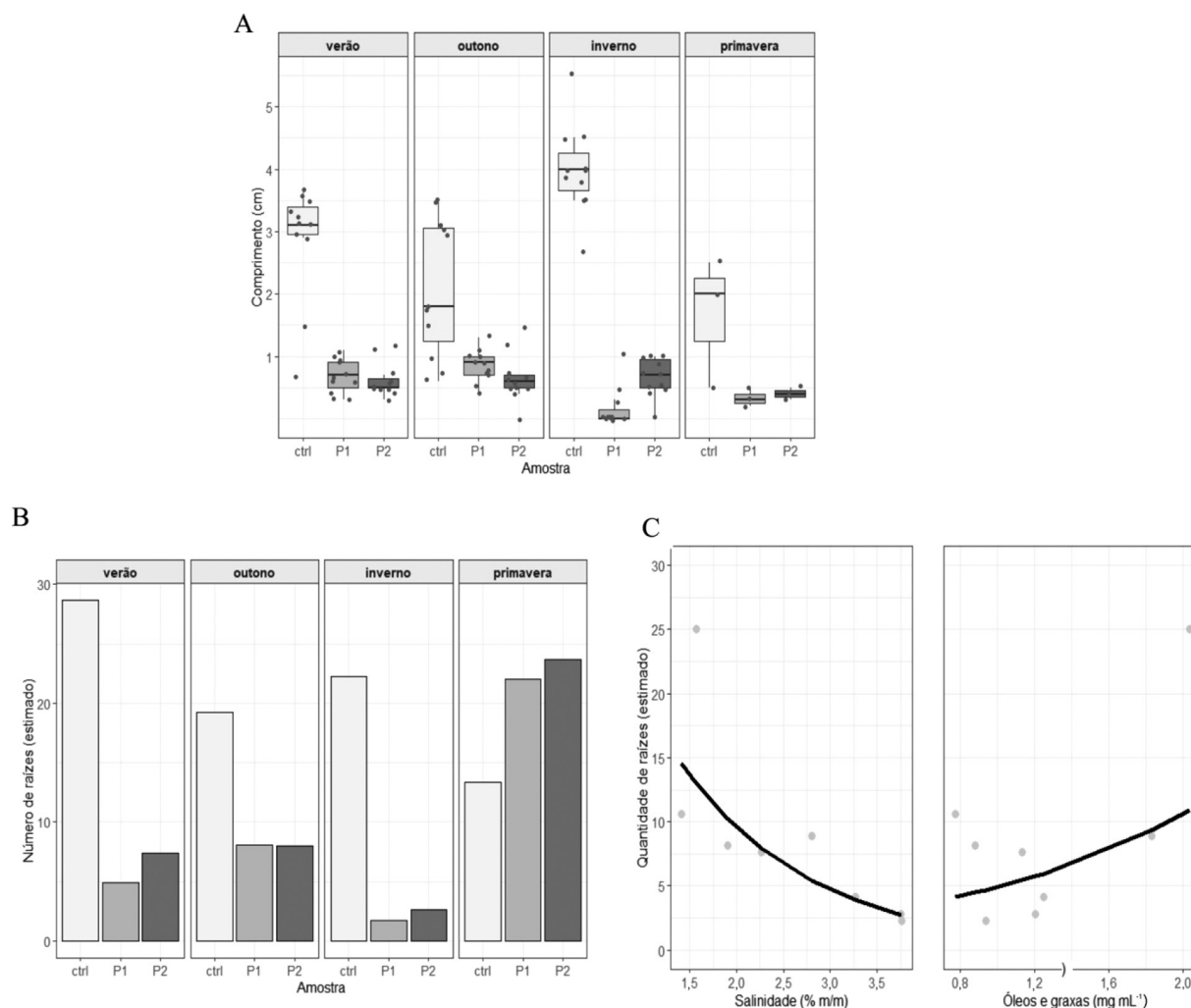


Figura 2. (A) A medida do comprimento das raízes da cebola é apresentada nos diagramas de caixa conforme a estação do ano e origem da amostra de água. Em cada diagrama, as linhas horizontais representam o primeiro, segundo (ou mediana, em destaque) e terceiro quartis da distribuição amostral. E ainda, as linhas verticais indicam os limites esperados da distribuição. Por fim, os pontos sobrepostos aos diagramas indicam as observações individuais. (B) Os efeitos estimados da origem da amostra e estação do ano sobre o número de raízes desenvolvidas pelas cebolas converge nos valores desta resposta estimados pelo modelo estatístico. (C) Os efeitos estimados da salinidade (à esquerda) e dos óleos e graxas (à direita) sobre a quantidade de raízes desenvolvidas pela cebola são ilustrados nas respectivas curvas destacadas. Sobrepostas por essas curvas, encontram-se os números de raízes ajustados pelo modelo a partir da confluência dos efeitos estimados

como a curva destacada na Figura 2C, à esquerda. Por outro lado, estima-se que, enquanto a salinidade é fixada, o aumento de cada unidade (mg mL^{-1}) de óleos e graxas resulte no acréscimo de 115% na abundância de raízes da cebola, efeito este ilustrado pela curva destacada na Figura 2C, à direita. Por fim, a validade do modelo estatístico que sustenta essa inferência é ratificada no Material Suplementar (Figura 2S e Tabelas 4S e 5S), corroborando, assim, as conclusões derivadas da análise.

Embora não tenhamos encontrado um padrão que nos permite associar a presença de graxa e óleos com o fluxo da maré, é possível que as variações encontradas nas concentrações dessas substâncias estejam relacionadas às atividades industriais do entorno, porém essa possibilidade necessita de investigações adicionais.

Qualitativamente, observou-se que todas as cebolas mantidas em amostra controle tiveram suas raízes classificadas como fortes com a ponta branca, em contraste com todas as cebolas expostas à amostra P1 e P2, as quais apresentaram raízes rotuladas como fracas e com a ponta marrom. A Figura 3 mostra imagens representativas das raízes de cada grupo em relação à estação do ano. Segundo Fiskesjö²¹ pontas com coloração marrom indicam agentes tóxicos na água.

O índice mitótico (IM) reflete a velocidade de multiplicação celular e, portanto, de crescimento da raiz. As raízes de cebolas crescidas em amostra controle apresentaram IM de 0,98 enquanto, que esses valores foram significativamente menores nas raízes de cebolas crescidas em amostras coletadas em P1 e P2, conforme mostrado na Figura 4. A validação do modelo estatístico que fundamenta essas inferências é apresentada nos Materiais Suplementares (Figuras S13E e S13F,

além da Tabela S7). Sabe-se que quanto menor for o IM, maior é a toxicidade da amostra de água, assim, como o P1 demonstra uma maior redução do IM comparado com a amostra controle, sugere-se que esse ponto apresente maior toxicidade. Variações do IM são indicadores importantes no monitoramento da poluição ambiental, especialmente, para a avaliação de contaminantes que apresentam potencial citotóxico. Deste modo, podemos inferir que a indicação de toxicidade é observada tanto pela inibição do crescimento das raízes bem como pelos efeitos adversos causados aos cromossomos.²⁴ Além disso, a diminuição no comprimento das raízes das amostras de água do rio, quando comparados ao grupo controle, pode estar relacionado a queda do IM dessas amostras. Estudos prévios constataram o mesmo efeito ao analisar a citotoxicidade de água de rios e demonstraram que a diminuição do IM também causa inibição do crescimento radicular.³⁰⁻³²

Resultados da análise dos metais potencialmente tóxicos em águas superficiais e sedimentos

Em relação as concentrações de metais em águas superficiais do Rio Pouca Saúde, foi observado valores abaixo do limite de quantificação (Tabela 2). A determinação do pH revelou valores entre 6,6 a 7,65 nas análises dos dois pontos. Esses valores englobam a faixa de neutralidade e, dessa forma, representam um baixo potencial de contribuição desse parâmetro na mobilização de metais pesados. Um estudo conduzido por Yi *et al.*,³³ com materiais na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 unidades, revelou o aumento do processo de adsorção de íons mercuriosos e subsequente diminuição do potencial de

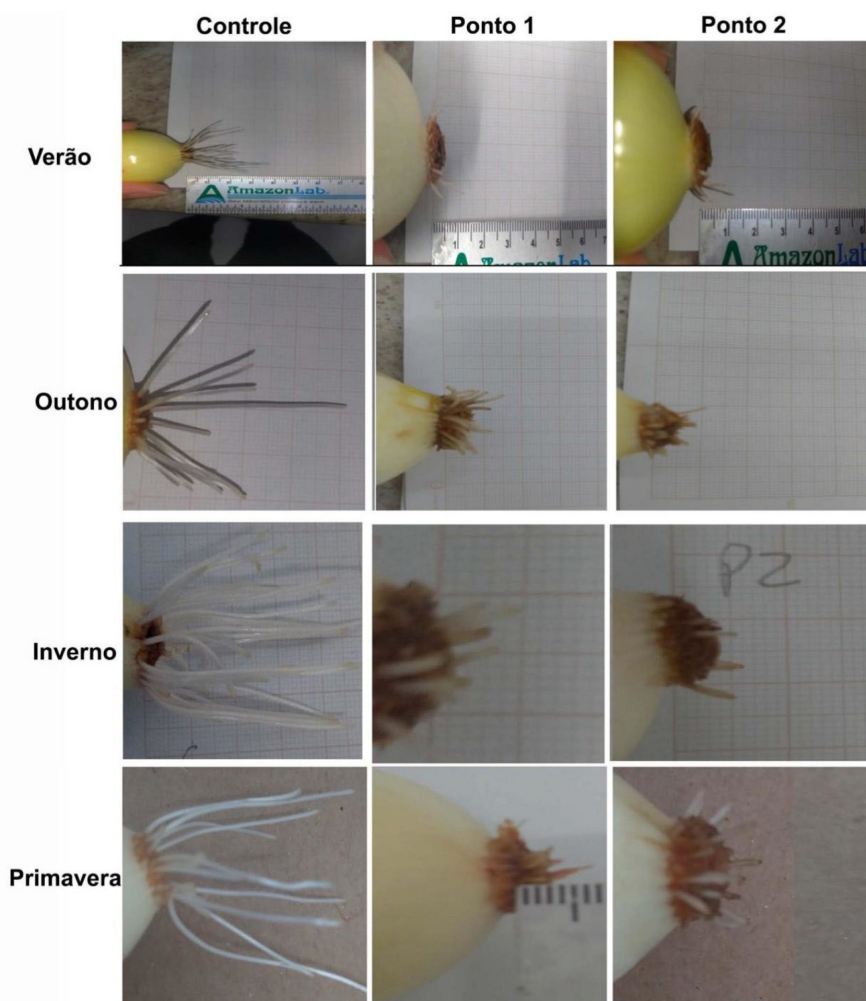


Figura 3. Imagens do crescimento da raiz germinada em amostras de água controle, na água do P1 e na água do P2 durante o verão, primavera, outono e inverno

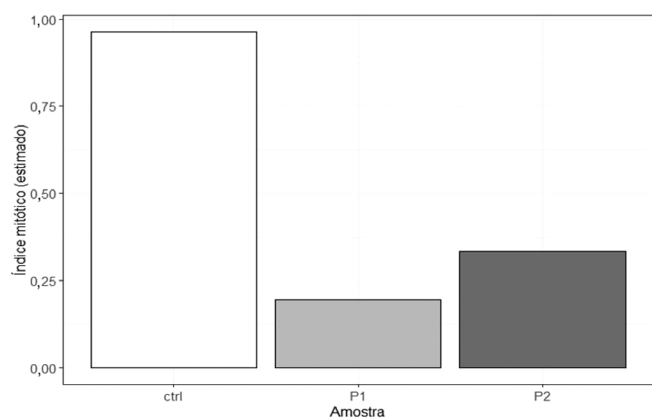


Figura 4. Os efeitos estimados das amostras P1 e P2 são ilustrados pelos valores ajustados (a partir do modelo estatístico) do IM para cada condição

Tabela 2. Concentração de metais em águas superficiais do Rio Pouca Saúde em dois pontos analisados durante o outono

Metal (mg L ⁻¹)	P1	P2	LQ	Referência Resolução CONAMA No. 357/05
Hg	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,0002
Cd	< 0,001	< 0,001	0,001	0,005
Pb	< 0,005	< 0,005	0,005	0,01
Ni	< 0,005	< 0,005	0,025	0,005
Zn	< 0,025	< 0,025	0,025	0,09

Hg: Mercúrio. Cd: Cádmio. Pb: Chumbo. Ni: Níquel. Zn: Zinco. LQ: Limite de quantificação.

disseminação da contaminação proporcional ao aumento do pH.³³ Além disso, é importante ressaltar que as concentrações de metais em águas estuarinas flutuam com os estágios de maré, quantidades de água e variações de descargas pontuais e difusas contendo esses elementos.¹ Análises anteriores realizadas em sedimentos do Rio Santo Amaro próximo ao Rio Pouca Saúde, também não observaram alteração de Zn, Cd, Pb, Hg e Ni.⁵

Já nos sedimentos, concentrações elevadas de Ni e Zn foram encontradas no P1 durante o inverno (Tabela 2). Essas concentrações

foram acima do TEL e abaixo do PEL, portanto, representam uma possível ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica. O Ni está presente na crosta terrestre com um valor médio de 56 µg g⁻¹. O metal é normalmente encontrado em efluentes líquidos industriais, principalmente em refinarias de petróleo, siderúrgicas e fábricas de fertilizantes e de celulose e papel. Na Baixada Santista, as principais fontes do poluente são a Usiminas, a RPBC-Petrobrás, a Ultrafertil-Cubatão e a Dow Química, as quais apresentam o metal em seus efluentes, em geral, dentro dos padrões de lançamento quando analisados individualmente.⁴ Portanto, como há uma tendência de acúmulo dos metais nos sedimentos, esta detecção feita pelos autores, demonstra o lançamento histórico das diferentes fontes industriais neste estuário.³⁴

Já no P2, o Zn encontrou-se acima do TEL e abaixo do PEL e está acima do ERL, indicando que os sedimentos são potencialmente tóxicos. Esse resultado pode ser devido aos rejeitos de indústrias químicas e metalúrgicas.³⁵ O Zn é um metal amplamente distribuído na natureza, ocorrendo nos solos e, como nutriente essencial, nas plantas em geral. Nos solos, os valores de Zn em áreas não poluídas variam de 10 a 30 µg g⁻¹, a concentração média natural deste metal na crosta terrestre é de 65 µg g⁻¹. O uso do Zn em sua forma metálica ou em sais do metal, é comum nos mais diversos ramos industriais. Na Baixada Santista, o Zn é encontrado nos efluentes de grande parte das indústrias, dos terminais e em áreas contaminadas da região.⁵ Além do uso industrial, o Zn está presente nas habitações (telhas, utensílios) e em produtos diversos, ocorrendo, portanto, no lixo e nos esgotos domésticos.⁵ De acordo com estudo realizado pela CETESB⁵ observa-se uma acumulação do Zn nos sedimentos da região, especialmente próximo às fontes industriais. Dentre as fontes existentes, destaca-se a Usiminas, onde o valor de Zn no sedimento encontra-se entre 260 e 957 µg g⁻¹ e na Dow Química próxima ao P2 variando de 183 a 221 µg g⁻¹.⁴ Análises anteriores realizadas em sedimentos do Rio Santo Amaro próximo ao Rio Pouca Saúde também observaram valores acima do normal de Zn, Cd, Pb, Cu, Hg e Ni.⁴ Na coleta efetuada na primavera não foi encontrada nenhuma alteração de metais nos pontos analisados (Tabela 3), estando dentro dos limites permitidos.

CONCLUSÃO

Os principais resultados encontrados nesse trabalho mostram (i) importantes alterações físico-químicas nas águas coletas no Rio Pouca Saúde, incluindo oxigênio dissolvido, turbidez, óleos

Tabela 3. Concentrações de metais em sedimentos brutos no Rio Pouca Saúde em dois pontos analisados durante o inverno e primavera. Valores acima do TEL e abaixo do PEL e acima do ERL estão em negrito

Estação	Coleta	Hg (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Ni (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Inverno	Ponto 1	< 0,002	< 0,02	26,4	19,3	186
	Ponto 2	< 0,002	< 0,02	22,8	11,7	193
	LQ	0,002	0,02	0,1	0,1	0,5
Primavera	Ponto 1	< 0,0005	< 0,005	11,6	4,2	72
	Ponto 2	< 0,0005	< 0,005	12,9	4,4	81
	LQ	0,002	0,02	0,1	0,1	0,5
	TEL	0,13	0,7	30,2	15,9	124
	PEL	0,70	4,21	112	42,8	271
	ERL	0,15	1,2	46,7	20,9	150
	ERM	0,71	9,6	218,0	51,6	410

Hg: Mercúrio. Cd: Cádmio. Pb: Chumbo. Ni: Níquel. Zn: Zinco. LQ: Limite de quantificação. Normas Canadenses de Qualidade do Sedimento e adotado pela CETESB: TEL - *Threshold effect level*. PEL - *Probable effect level*. Critérios americanos adotados pela Resolução CONAMA No. 358/05: ERL - *Effects range low*. ERM - *Effects range medium*.

e graxas, enquanto que os outros parâmetros estavam dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005.²⁶ (ii) As amostras de água do Rio Pouca Saúde apresentaram potencial citotóxico avaliado pelo teste *Allium cepa* L. (iii) Acúmulo de Ni e Zn no sedimento do rio principalmente durante o inverno.

Os resultados deste estudo indicam o potencial ecotóxico das águas do Rio Pouca Saúde devido as alterações físico-químicas, e presença de metais pesados os quais provocam efeitos biológicos danosos evidenciados pelas alterações sobre o crescimento de cebolas e suas raízes. Pode ser substancialmente agressivo e perigoso para todos os organismos e para a população ribeirinha. Portanto, o monitoramento das águas do Rio Pouca Saúde é de suma importância por ser uma área portuária altamente impactada. Ações públicas são imprescindíveis como encanamento e tratamento do esgoto que visam a melhoria da qualidade da água dessa região e a qualidade de vida da população. Além disso, ações de conscientização da população a respeito do descarte de lixo no rio e monitoramento mensal para reavaliar a qualidade da água, diminuindo o tempo de vistoria e detectando mês de maior acúmulo dos metais, com atenção no inverno, sendo a estação de maior índice de metais, também são pertinentes. Adicionalmente, esse estudo é um piloto para áreas portuárias altamente impactadas similares em várias regiões do Brasil e do mundo, que há possivelmente deposição de metais nos sedimentos e acúmulo de matérias orgânicas com população habitacional desprovida de recursos que utilizam a água para consumos diversos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

A validade do modelo estatístico que fundamenta toda a análise é confirmada no material suplementar disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho recebeu apoio financeiro por meio do Auxílio à Pesquisa – Regular, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (No. do Processo: 2019/ 25695-8) e de uma Bolsa de Treinamento Técnico FAPESP TT-1 (No. do Processo: 2020/12760-3).

REFERÊNCIAS

- Carmo, C. A.; Abessa, D. M. S.; Machado Neto, J. G.; *Mundo da Saúde* **2011**, 35, 64. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Centro de Integração e Desenvolvimento (CIDE), Polo de Cubatão, <http://polocide.com.br/cubatao-o-polo-que-abastece-o-brasil/#>, acessado em Dezembro 2023.
- Porto de Santos, <http://www.portodesantos.com.br/institucional/o-porto-de-santos>, acessado em Dezembro 2023.
- Hortellani, M. A.; Sarkis, J. E. S.; Abessa, D. M. S.; Sousa, E. C. P. M.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 10. [Crossref]
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB); *Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, Relatório Técnico*; CETESB: São Paulo, 2001. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Sisinnio, C. L. S.; Oliveira Filho, E. C.; *Princípios de Toxicologia Ambiental*, 1ª ed.; Interciência: Rio de Janeiro, 2013.
- Baan, R. A.; Grosse, Y.; *Mutat. Res.* **2004**, 553, 43. [Crossref]
- Bhatti, S. S.; Kumar, V.; Kumar, A.; Gouzos, J.; Kirby, J.; Singh, J.; Sambyal, V.; Nagpal, A. K.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, 164, 722. [Crossref]
- Oliveira, A.; Silva, N.; *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental* **2013**, 2, 47. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Euba Neto, M.; Silva, W. O.; Rameiro, F. C.; Nascimento, E. S.; Alves, A. S.; *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo* **2012**, 79, 397. [Crossref]
- Histórias e Lendas do Guarujá, Rio Pouca Saúde, <https://www.novomilenio.inf.br/guaruja/index.html>, acessado em Dezembro 2023.
- Lima, M. G. F.; Rocha, L. C.; Silveira, G. L.; Alvarenga, I. F. S.; Vieria, L. F. A.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, 174, 630. [Crossref]
- Bianchi, J.; Espinola, E. L. G.; Marin-Morales, M. A.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, 74, 826. [Crossref]
- Arias, T. L.; Peralta, V. F.; Diana, D. M. F.; Delgado, E. G.; Márquez, F. S. A.; Martínez, M. D. B.; Vera, M. E. L.; Ayala, H. I.; Giménez, N. B.; Resquín, L. M. B.; Bareiro, C. G. M.; *Rev. Ambiente Agua* **2016**, 11, 548. [Crossref]
- Kim, K. H.; Susaya, J. P.; Park, C. G.; Uhm, J. H.; Hur, J.; *Environ. Monit. Assess.* **2013**, 185, 6353. [Crossref]
- Bonciu, E.; Firbas, P.; Fontanetti, C. S.; Wusheng, J.; Karaismailoğlu, M. C.; Liu, D.; Papini, A.; *Caryologia* **2018**, 71, 191. [Crossref]
- Hemachandra, C. K.; Pathiratne, A.; *Water Res.* **2017**, 108, 320. [Crossref]
- Pathiratne, A.; Hemachandra, C. K.; de Silva, N.; *Environ. Monit. Assess.* **2015**, 187, 730. [Crossref]
- Silveira, M. A. D.; Ribeiro, D. L.; Vieira, G. M.; Demarco, N. R.; d'Arce, L. P. G.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2017**, 100, 216. [Crossref]
- Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*, 20th ed.; Amer Public Health Assn: Washington, DC, 2002.
- Fiskesjö, G.; *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1993**, 8, 461. [Crossref]
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA); Resolução No. 358, de 29 de abril de 2005, *Dispõe sobre o Tratamento e a Disposição Final dos Resíduos dos Serviços de Saúde e dá Outras Providências*; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, No. 358, de 04/05/2005. [Link] acessado em Dezembro 2023
- RStudio, versão 2022.07.0; RStudio Integrated Development for R.; PBC, Boston, MA, 2020.
- Organização Mundial de Saúde (OMS); *Diretrizes de Qualidade para Água Potável da OMS, 4ª Edição incorporando o 1º Adendo*; 2017. [Link] acessado em Janeiro de 2024
- Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional; Decreto-lei No. 306, de 27 de agosto de 2007, *Relativo ao Controlo da Qualidade da Água Destinada ao Consumo Humano*; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, No. 164, de 27/08/2007, p. 5758. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA); Resolução No. 357, de 29 de dezembro 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 União (DOU), Brasília, 2005, p. 58. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Stech, J. L.; Lorenzetti, J. A.; *J. Geophys Res.* **1992**, 97, 9507. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Campos, R. M.; Camargo, R. D.; Harari, J.; *Revista Brasileira de Meteorologia* **2009**, 25, 175. [Crossref]
- Krüger, R. A.; *Análise da Toxicidade e da Genotoxicidade de Agrotóxicos Utilizados na Agricultura Utilizando Bioensaios com Allium cepa*; Dissertação de Mestrado, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Brasil, 2009. [Link] acessado em Dezembro 2023
- Motta, L. S.; Damasceno, J. M.; Pereira, I. F. M.; Vidal, A. C. B.; Silva, D. C.; Silva, P. T.; *Semina (Londrina, Braz.)* **2017**, 38, 109. [Crossref]
- Braga, J. R. M.; Lopes, D. M.; *Rev. Ambiente Agua* **2015**, 10, 130. [Crossref]
- Tedesco, S. B.; Laughinghouse, H. D. Em *Environmental Contamination*; Srivastava, J. K., ed.; IntechOpen: London, 2012, cap. 8. [Link] acessado em Janeiro 2024

33. Yi, Y.; Alen, H. E.; Huang, C. P.; Li, Y.; Sanders, P. F.; *J. Environ. Qual.* **1996**, *24*, 837. [Crossref]
34. Siqueira, G. W.; Braga, E. S.; Pereira, S. F. P.; Silva, E. D. A.; *Revista Escola de Minas* **2005**, *58*, 309. [Crossref]
35. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA); Resolução No. 420, de 28 de dezembro de 2009, *Dispõe sobre Critérios e Valores*

Orientadores de Qualidade do Solo quanto à Presença de Substâncias Químicas e Estabelece Diretrizes para o Gerenciamento Ambiental de Áreas Contaminadas por essas Substâncias em Decorrência de Atividades Antrópicas; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, No. 249 de 30/12/2009, p. 81. [Link] acessado em Dezembro 2023