

**PRESTAÇÃO DE SERVIÇO - ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL**

Bolsista(Outras)	A DEFINIR II	(31) 3409-1947	adefinir@adefinir.com.br	Técnico Mestre - Análises de Microtox e Algas	-	01/08/2020 a 01/08/2021
Bolsista(Outras)	A DEFINIR I	(31) 3409-1947	adefinir@adefinir.com.br	Técnico Mestre - Análises de Mutagenicidade e Genotoxicidade	-	01/08/2020 a 01/08/2021
Bolsista(Outras)	MAYRA THAIS MENEZES	(31) 3409-1019	mayramenezes@gmail.com	Técnico Graduado - Análises com Zebrafish	-	01/08/2020 a 01/08/2021
Bolsista(Outras)	B E A T R I Z GASPARINI REIS		biagasparini@ufmg.br biagasparini@ufmg.br	-	RESIDÊNCIA PÓS-DOCTORAL	01/08/2020 a 01/08/2021
Participante	CARLOS ALBERTO TAGLIATI		carlostagliati@ufmg.br carlostagliati@gmail.com	FACULDADE DE FARMÁCIA	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas	01/08/2020 a 01/08/2021
Participante	KLEBER CAMPOS MIRANDA FILHO		kmiranda2010@ufmg.br kleber08@gmail.com	ESCOLA DE VETERINÁRIA	Departamento de Zootecnia	01/08/2020 a 01/08/2021
Participante	GILCINEA DE CASSIA SANTANA		gcsantana@ufmg.br	ESCOLA DE VETERINÁRIA	Departamento de Clínica e Cirurgia	01/08/2020 a 01/08/2021
Participante	JOÃO PAULO SILVA LORENZINI		lorenzini@ufmg.br	-	ZOOTECNIA/D	01/08/2020 a 01/08/2021

PARCERIAS

CNPJ	Nome	Caracterização	Tipo
------	------	----------------	------

ABRANGÊNCIAS

Nome	Estado	Município	CEP	Detalhes
Bacia Hidrográfica do Rio Paraopeba	Minas Gerais	Brumadinho		





Belo Horizonte, 4 de Junho de 2020

Ao Comitê Científico (CTC) do Projeto Brumadinho UFMG

Prezados membros do Comitê,

Em resposta ao correio eletrônico datado de 01 de junho de 2020, enviado pelos membros desse comitê, apresentamos em anexo a proposta alterada do Sub-projeto: “ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL”, submetida no âmbito da Chamada Interna Induzida n. 15 do Edital Brumadinho-UFMG. Informo que todas as sugestões e comentários feitos pelos membros do CTC foram amplamente contemplados. Neste ofício as modificações e respostas às questões levantadas pelo CTC estão todas compiladas de maneira a facilitar a identificação das mesmas.

Em conformidade com o parecer emitido pelo CTC afirmamos que a proposta foi registrada no SCIEX e o formulário está anexado ao presente documento juntamente com os Termos Éticos e de Confidencialidade assinados pelos pesquisadores membros da equipe proponente.

Afirmamos ainda que a proposta em anexo **substitui** aquela enviada em 25 de maio de 2020.

Cordialmente,

Camila Costa de Amorim Amaral – Coordenadora
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Escola de Engenharia
Universidade Federal de Minas Gerais

camila@desa.ufmg.br

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br





Respostas às perguntas e sugestões feitas pelo CTC

Com relação ao Plano Amostral proposto:

1. Retirar do texto a referência à Chamada 11 (Coleta de Água Superficial), deixando claro somente que os pontos amostrais foram selecionados a partir do Plano Amostral de Águas Superficiais, constante do Anexo III da Chamada 11. Da mesma forma excluir do texto a justificativa que relaciona o número de pontos amostrais ao tempo necessário para os ensaios.

O texto foi alterado em dois pontos da proposta conforme solicitado pelo Comitê e copiado abaixo:

Pág. 15: *Os pontos de amostragem para os ensaios de ecotoxicidade foram selecionados a partir do Plano Amostral de Águas Superficiais constantes no Anexo III da Chamada Interna Induzida Nº 11 do Edital Brumadinho-UFMG. A escolha foi feita de acordo com a proximidade do ponto amostral à antiga barragem e à sua relevância em relação à possíveis impactos ambientais e à saúde humana, como, por exemplo, nas proximidades de pontos de captação de água.*

Pág. 18: *Considerados os 44 pontos de amostragem originalmente propostos no Plano Amostral de Águas Superficiais constantes no Anexo III da Chamada Interna Induzida Nº 11 do Edital Brumadinho-UFMG, a realização de todos os ensaios de toxicidade aqui propostos exigiria um volume total coletado 660 litros de amostra por campanha, o que é inviável em termos de recursos disponíveis para coleta e transporte.*

2. Recomendamos incluir mais um ponto no Rio Paraopeba, à montante da confluência com o Ribeirão Ferro-Carvão.

Uma vez que não existe nenhum ponto no Rio Paraopeba à montante da confluência do Ribeirão Ferro-Carvão que esteja contemplado no Plano Amostral definido no Anexo III da Chamada 11 (Coleta de Água Superficial), o ponto M9, que fica no Rio Macaúbas, à montante da confluência com o Córrego do Feijão foi incluído como ponto de referência. O texto e o Quadro 5 foram modificados na proposta como apresentado abaixo.

Pág. 15: *Dentre os 12 pontos escolhidos, dois deles (M9 e M10) representam locais de referência por se localizarem à montante do rompimento da barragem. Os 10 pontos restantes estão localizados à jusante do rompimento, em sítios afetados pela dispersão do rejeito: Ribeirão Ferro Carvão (F1, F3 e F6) e Rio Paraopeba (6 pontos).*





Pág. 17:

Quadro 5 – Nome, localização e descrição dos pontos selecionados para a realização de coletas de amostras para testes ecotoxicológicos

N.	Ponto	Latitude	Longitude	Curso d'água	Descrição
1	MC9	7753005,78	584777,26	Rio Macaúbas	Sob a ponte no distrito de Santo Antônio da Vargem Alegre
2	MC10	7754237	591594,71	Rio Macaúbas	Ponto de referência à montante do local do rompimento da barragem
3	F1	7774708,05	591614,15	Ribeirão Ferro-Carvão	Pontos localizados à montante e à jusante das barragens de contenção de rejeitos instaladas pela Vale
4	F3	7772556,84	590959,37		
5	F6	7771690,75	589193,72		
6	P1	7771291,76	587024,46	Rio Paraopeba	Ponto de confluência com o Córrego-Feijão
7	P5	7773856,04	582951,59	Rio Paraopeba	À montante do ponto de captação da COPASA, área urbana de Brumadinho
8	P9	7782998,19	583557,82	Rio Paraopeba	Rio Paraopeba, após a confluência com o ribeirão Sarzedo, à jusante da área urbana de Mário Campos.
9	P10	7784026,33	577773	Rio Paraopeba	Ponte sobre o Rio Paraopeba, corresponde ao BP070 (IGAM)
10	P13	7794046,88	572735,59	Rio Paraopeba	Divisa entre Betim e Juatuba, corresponde à BP072 (IGAM) e CPRM (Juatuba)
11	P14	7795289,76	569374,64	Rio Paraopeba	Área urbana de Juatuba, confluência com o reservatório Serra Azul utilização para abastecimento de água da RMBH
12	P20	7859729,5	548687,4	Rio Paraopeba	Captação da COPASA para o município de Paraopeba

3.Recomendamos verificar a possibilidade de excluir um dos pontos no Rio Paraopeba à jusante da confluência com o Ribeirão Ferro-Carvão.

O ponto P17 foi excluído considerando a relevância ambiental desse e dos demais pontos escolhidos visando à manutenção dos pontos próximos as áreas de captação de água para abastecimento humano.





4. Recomendamos verificar a possibilidade de reduzir a frequência de amostragem para trimestral, garantindo, entretanto, a análise de amostras coletadas no período de chuvoso.

O plano amostral foi alterado de bimestral para trimestral, conforme sugestão. Desse modo serão quatro campanhas de amostragem ao longo de 12 meses, totalizando 48 amostras por campanha, conforme alterado no texto da proposta e copiado abaixo:

Pág. 18: Dessa forma, propõe-se que a coleta para os ensaios ecotoxicológicos seja feita a cada três meses nos 12 pontos listados no Quadro 5, totalizando um volume total de 180 litros de amostra por campanha. Logo, ao longo de 12 meses de coleta, serão obtidas 4 amostras de cada ponto para a realização dos ensaios ecotoxicológicos (Quadro 6), duas amostras do período chuvoso e duas do período seco.

Com relação à Metodologia:

1. Apresentar o(s) critério(s) de escolha dos testes de ecotox agudo e crônico e a necessidade dos mesmos para os objetivos propostos.

A justificativa para a escolha dos testes propostos está apresentada no item 6 (JUSTIFICATIVA) adicionado à nova proposta conforme apresentado abaixo:

Pág. 12 – 6. JUSTIFICATIVA

A escolha dos testes de toxicidade que serão realizados no âmbito desse projeto (Quadro 4) se justifica uma vez que a ocasião do rompimento de uma barragem de mineração com lançamento do rejeito no corpo d'água pode ocasionar tanto toxicidade aguda quanto crônica, com efeitos que se manifestam de maneira distinta nos diferentes níveis tróficos. Essa abordagem corrobora com o que é preconizado nas normas ambientais nacionais e internacionais, as quais exigem a realização dos testes em pelo menos dois níveis tróficos distintos (UE, 2000; BRASIL, 2005).

No momento de um episódio de contaminação ambiental, como o rompimento de uma barragem de rejeitos, os poluentes estão presentes na coluna d'água em concentrações elevadas o que leva à exposição dos organismos aquáticos de maneira abrupta, podendo acarretar o efeito de toxicidade aguda, como observado por THOMPSON et al. (2020) para embriões de Zebrafish (Danio rerio) com amostras de água coletadas uma semana após o rompimento de uma barragem. Entretanto, com o passar do tempo, o rejeito tende a decantar e seus constituintes são estocados nos sedimentos dos rios, o que diminui a chance de ocorrência de toxicidade aguda, mas não exclui a possibilidade da toxicidade crônica. Afinal, a transferência de substâncias entre os sedimentos e a coluna d'água pode liberar constituintes do rejeito, causando a exposição frequente dos organismos ali presentes por longos períodos, o que, mesmo em pequenas concentrações, pode gerar efeitos subletais a





longo prazo, caracterizando a toxicidade crônica (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015; SEGURA ET AL, 2016).

Adicionalmente, há de se considerar a possibilidade de revolvimento dos sedimentos presentes no leito dos rios durante a estação chuvosa, o que pode desencadear a liberação de constituintes do rejeito em concentrações mais elevadas levando a recorrência da toxicidade aguda. Dessa forma, é essencial a realização de testes de ecotoxicidade aguda e crônica para os diferentes níveis tróficos presentes no ambiente (por exemplo produtor, consumidores I e II e decompositor). Logo, nesta proposta sugere-se a adoção de dois testes de toxicidade aguda e dois testes de toxicidade crônica, abrangendo, dessa maneira, a investigação em dois níveis tróficos como detalhado no Quadro 4.

Considerando que a variação do efeito detectado pode ocorrer não apenas em relação ao nível trófico, mas também para um mesmo organismo-teste que pode responder de maneira distinta à presença de um mesmo contaminante nas diferentes fases do seu ciclo de vida (WENERSSON ET AL., 2015), justifica-se a realização de dois testes distintos com o Danio rerio. O teste de toxicidade aguda com o peixe adulto e os testes de toxicidade aguda e crônica com o embrião desse mesmo animal, são aqui propostos de maneira complementar uma vez que os estágios iniciais de desenvolvimento de um organismo-teste são mais sensíveis do que os estágios juvenil e adulto. Ressalta-se que tais testes são utilizados rotineiramente por órgãos internacionais de proteção ambiental, conforme detalhado no Quadro 4.

Considerando os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, ressalta-se a complementaridade dos resultados obtidos por meio da realização de ambos os testes com uma mesma amostra. Afinal, o teste de genotoxicidade revela um dano ao DNA celular que pode ou não vir a ser reparado. Ao passo que o teste de mutagenicidade detecta mutações no DNA que são permanentes e hereditárias, afetando também as próximas gerações. Tais testes são realizados tanto pela CETESB quanto pela EPA USA rotineiramente de maneira a obter um diagnóstico robusto sobre o efeito da qualidade da água nos organismos aquáticos.

Dessa forma, o conjunto de testes de toxicidade aqui proposto é suficientemente sensível e abrangente, como recomendado para o monitoramento ambiental (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015). Além disso, como listado no Quadro 4, os testes foram escolhidos com base nos protocolos de monitoramento periódico da qualidade da água adotado e reconhecido por órgãos ambientais de referência nacional e internacional.

Quadro 4 – Justificativa para escolha dos ensaios ecotoxicológicos na presente proposta

Teste	Organismo	Organismo teste	Metodologia	Nível Trófico	Referência de Utilização
Toxicidade Aguda	Bactéria	<i>Allivibrio fischeri</i>	ABNT NBR 15411-3:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Toxicidade aguda	Peixe	<i>Danio rerio</i> (adulto)	15088:2016	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br





Teste	Organismo	Organismo teste	Metodologia	Nível Trófico	Referência de Utilização
Toxicidade crônica	Crustáceo	<i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	Consumidor I	IGAM UE-WFD
Toxicidade crônica	Alga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	Produtor	UE-WFD
Toxicidade aguda e crônica	Peixe	<i>Danio rerio</i> (larvas)	15499/2015	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD
Análises de mutagenicidade	Bactéria	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD 471; ISSO 11350:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Análise de genotoxicidade	Célula Animal	Célula V79 (fibroblastos de pulmão de hamster)	ISO 21427-2:2006	Consumidor II	CETESB EPA-USA

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, EPA-USA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América); IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas; UE-Diretiva da União Europeia WFD2000/60/EC;

2. Caracterização físico-química da água: será realizada para todas as amostras, ANTES dos testes ecotox, conforme Chamada 18+21. Se for necessário algum outro ensaio deverá ser previsto aqui neste projeto. Na página 15, final do primeiro parágrafo, é mencionada a inclusão de análises físico-químicas da água APÓS a exposição aos organismos que serão usados nos testes ecotox. Destacar quais análises serão realizadas APÓS os testes, uma vez que pode haver interferência desses testes nos parâmetros analisados. Também são mencionadas algumas análises que não estão contempladas em outras chamadas (por exemplo DQO e cloro residual). Recomendamos a inclusão dessa etapa na proposta, incluindo consumíveis e recursos humanos para a sua realização. Destacamos que essas análises serão realizadas no CRA – Centro de Referência Ambiental, que está sendo implantado no Projeto Brumadinho-UFMG.

O texto foi modificado de acordo com as instruções do Comitê e o orçamento foi alterado para incluir os consumíveis referentes à realização das análises físico-químicas das amostras provenientes dos ensaios ecotoxicológicos APÓS a exposição dos organismos. As modificações estão copiadas abaixo:

Pag. 18.: A coleta será realizada conforme definido no Anexo III da chamada pública interna induzida nº 11/2019 por equipe selecionada pelo Comitê com o acompanhamento de um membro da equipe proponente da presente proposta nos meses referentes às coletas de amostras para ecotoxicologia, conforme previsto no orçamento. A caracterização físico-química das amostras de acordo com os parâmetros de interesse da CONAMA 357 (BRASIL, 2005) acrescida de metais e metalóides deverá ser realizada para todas as amostras a serem

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br





utilizadas nos ensaios de toxicidade anteriormente aos testes pela equipe responsável de acordo com as Chamadas 18-21 do Edital Brumadinho-UFMG, a ser selecionada pela Comissão-Técnica Brumadinho -UFMG.

Complementarmente, para alguns ensaios, a caracterização analítica sobre a constituição química e física da água deve ser repetida após a exposição dos organismos às amostras, como é o caso da água dos aquários de criação de peixes, conforme determinação e especificações da NBR 15469/2016 e OECD (2019). Os parâmetros a serem analisados após exposição estão apresentados no Quadro 7, sendo que os custos referentes a consumíveis e pessoal responsável por elas estão previstos no orçamento da presente proposta. Tais análises serão realizadas no Centro de Referência em Análises Ambientais da UFMG para a água controle, a amostra de concentração mínima e máxima totalizando 438 amostras (ao final de 12 meses de projeto). Ressalta-se que, caso as análises de caracterização físico-química das amostras de água superficial identifiquem outras espécies químicas que possam afetar os resultados dos estudos de ecotoxicidade, essas espécies poderão ser incluídas na análise da água após exposição.

Quadro 7 – Análises e métodos utilizados na caracterização físico-química das amostras dos aquários no final dos testes com *D. rerio*

Parâmetro	Metodologia
Carbono orgânico total (TOC)	5310 B ¹
Sólidos totais dissolvidos	2540C ¹
Cloro residual	300.1, 1999 ²
Metais (alumínio, arsênio, cádmium, chumbo, cobalto, cobre cromo, ferro, níquel, zinco, mercúrio, prata)	3125 B (ICP-MS) ¹

¹SMWW, 23ª Edição, 2018; ²EPA, 1999

Com relação ao orçamento:

1. Alguns materiais permanentes solicitados devem ser justificados, adaptados e, eventualmente, retirados, tais como microcomputadores, licenças para softwares etc.

Os microcomputadores foram removidos do orçamento. O valor relacionado a Software foi alterado e atualmente contempla apenas o valor para a compra do software que é considerado essencial para condução dos ensaios com as larvas do *Danio rerio* para os ensaios de toxicidade aguda e crônica, uma vez que o software será utilizado na avaliação de efeitos tóxicos em embrião (batimentos cardíacos, comportamento, etc). Sem a aquisição do referido software torna-se inviável a realização do número de amostras no tempo requerido.

Todos os itens permanentes foram cuidadosamente conferidos e as quantidades readaptadas diante da diminuição do número de amostras. O número de incubadoras de DBO e estufas foram proporcionalmente diminuídos.

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br





Com relação a outros itens como lupa, microscópio, leitor de microplacas e contador de células, não foi possível a retirada ou redução uma vez que cada um dos equipamentos será utilizado para objetivos distintos. A lupa será utilizada na contagem dos embriões do *Danio rerio*. O microscópio será necessário para a contagem de células no teste com as algas para avaliação do crescimento. Já o leitor de microplacas é utilizado no Teste de Ames (mutagenicidade), sendo utilizado na quantificação da absorvância e, por consequência, da viabilidade celular. Essa quantificação, por sua vez, é imprescindível na avaliação da toxicidade *in vitro* das substâncias analisadas. Esse equipamento permite obtenção de alta qualidade de análise com resultados robustos, garantindo confiabilidade e reprodutibilidade nas análises realizadas. Com relação ao contador de células trata-se de um equipamento automatizado que substitui a análise visual eliminando o erro humano na contagem de células que é de difícil precisão e reprodutibilidade. Dessa forma esses itens foram mantidos por serem essenciais para condução dos ensaios.

Todos os itens permanentes encontram-se devidamente justificados no Quadro detalhado de orçamento presente na proposta

2. Inserir o acompanhamento de membro(s) da equipe nas coletas, bem como os custos associados (diárias etc.).

As diárias e demais custos relacionados ao acompanhamento das coletas (aluguel de veículos e combustível) por parte de um membro da equipe da presente proposta foram incluídos no orçamento. Ressalta-se que o acompanhamento será realizado apenas nos meses nos quais haverá coleta de amostras para ecotoxicologia, conforme explicitado no projeto. Foi considerado o acompanhamento da coleta de amostras nos 12 pontos selecionados. Considerou-se 5 dias para acompanhamento da coleta de amostras na região de Brumadinho (pontos MC9, MC10, F1, F3, F6, P1, P5, P9, P10, P13, P14) e 2 dias para acompanhamento da coleta de amostras no ponto P20 devido a distância (aprox. 150km). Totalizando dessa maneira 7 dias de acompanhamento de coleta por campanha de amostragem.

Pag. 18: A coleta será realizada conforme definido no Anexo III da chamada pública interna induzida nº 11/2019 por equipe selecionada pelo Comitê com o acompanhamento de um membro da equipe proponente da presente proposta nos meses referentes às coletas de amostras para ecotoxicologia, conforme previsto no orçamento.

3. Considerando as alterações recomendadas, apresentar novo orçamento detalhado.

O novo orçamento detalhado consta na proposta em anexo. Ressalta-se que houve inclusão dos consumíveis relacionadas às análises físico-químicas das amostras após a realização dos testes ecotoxicológicos e que os custos referentes ao acompanhamento das coletas foram adicionados, essas inclusões foram todas sugeridas pelo CTC. Por outro lado, todos os consumíveis foram revisados a fim de atender a redução do número de amostras sugerido, assim como as horas dos bolsistas envolvidos no projeto.

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br





4. Rever método de cálculo das taxas 10/95 seguindo procedimento correto.

As taxas foram recalculadas conforme sugerido e o orçamento foi alterado de acordo com as taxas adequadas.

Algumas recomendações para o texto:

1. Retirar todas as citações no texto que incluam pré-julgamentos não comprovados por referências bibliográficas. Como exemplo: Página 5: “testes ecotoxicológicos permitem a proposição de medidas de recuperação adequadas e funcionais”. Citar uma referência bibliográfica ou retirar a frase; Página 7, final do segundo parágrafo: idem comentário anterior; Página 13: final do primeiro parágrafo: frase “Apesar de não possuir elementos extremamente tóxicos, o rejeito contém...”. A definição de extremamente tóxicos se refere a elementos tóxicos em baixíssimas concentrações, nesse caso não é possível afirmar que o rejeito não possui elementos extremamente tóxicos.

O projeto foi revisado em sua totalidade para a remoção dos trechos exemplificados e todos os demais trechos que se enquadravam na descrição.

2. Retirar a última frase da página 33 – Item 10 orçamento: “Sendo assim, após a conclusão dos 12 meses, tais equipamentos ficarão disponíveis para utilização dos diversos grupos de pesquisa da UFMG e permitirão avanços das pesquisas na área de ecotoxicologia na instituição, proporcionando a continuidade da colaboração entre os pesquisadores proponentes na avaliação ecotoxicológica de diversas amostras ambientais com potencial de formação de recursos humanos e de se tornar referência tanto para pesquisas como para prestação de serviços na área de conhecimento”.

A frase especificada foi retirada conforme sugerido.

Solicitações finais:

Solicita-se, por fim, juntamente com a resposta a este resultado preliminar, dentro do prazo acima estabelecido:

- Envio dos Termos de Compromisso Éticos assinados por todos os componentes da equipe, conforme modelo anexo.
- Envio do registro do projeto no SIEX.

Os Termos de Compromisso Ético assinados e o formulário do SCIEX estão anexados à nova versão do projeto conforme solicitado.

Cordialmente,

Prof. Camila Amorim

Prof. Camila Costa de Amorim Amaral
Av. Antônio Carlos, 6627 - Bloco 1 - Sala 4627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - BRASIL
Tel.: +55 31 34093677- camila@desa.ufmg.br



Re: SOLICITAÇÃO DE ANUÊNCIA PARA SUBMISSÃO NA CHAMADA INTERNA N15/19

Eduardo Coutinho de Paula <ecoutinho.ufmg@gmail.com>

Qui, 21/05/2020 14:00

Para: Camila Amorim <camila@desa.ufmg.br>**Cc:** secdesa <secdesa@desa.ufmg.br>; Maria clara starling <cacastarling@hotmail.com>

Olá Profa. Camila e equipe,

Saudações!

Confirmamos ciência da Chefia do DESA/UFMG a respeito da submissão de proposta para a referida chamada.

Abraços cordiais,

Prof. Eduardo Coutinho de Paula
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
Av. Antonio Carlos, 6.627
Bloco 1 - Sala 4618
Belo Horizonte, Minas Gerais
CEP 31270-901
ecoutinho@desa.ufmg.br
+ 55 31 3409-3630

Em qui., 21 de mai. de 2020 às 13:58, Camila Amorim <camila@desa.ufmg.br> escreveu:

Prezado Vice-Chefe de Departamento,

Venho por meio deste solicitar anuência da Chefia para submissão da proposta: Análise Ecotoxicológica de Águas Superficiais - Chamada Pública Interna Induzida n. 15/2019 no âmbito do Projeto Brumadinho/UFMG-PROEX.

O projeto, se aprovado, estará sob minha Coordenação e terá como sub-Coordenadora a Prof. Maria Clara V.M. Starling, contando ainda com a participação dos seguintes professores:

- Professor Kleber Campos Miranda Filho - Escola de Veterinária / UFMG
- Professora Gilcinéa de Cássia Santana - Escola de Veterinária / UFMG
- Professor Carlos Alberto Tagliati - Faculdade de Farmácia/UFMG

Sem mais peço deferimento,
Cordialmente,

Prof. Camila Costa de Amorim
Associate Professor



21/05/2020

Email – Maria clara Starling – Outlook

Department of Sanitary and Environmental Engineering
Universidade Federal de Minas Gerais
e-mail: camila@desa.ufmg.br
Tel: +55 31 3409-3677

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATZiZmYAZC05MTdiLWY2NgA5LTAwAi0wMAoARgAAA2prHpD42rpOoR%2BxTkAUxd8HAE%2F...> 2/2



Número do documento: 20062615155613900000120531559

<https://pje.tjmg.jus.br:443/pje/Processo/ConsultaDocumento/listView.seam?x=20062615155613900000120531559>

Assinado eletronicamente por: SILVIA MARIA DA MOTA CUNHA DIAS - 26/06/2020 15:15:56

Num. 121856420 - Pág. 108

ATA DA REUNIÃO DE JULGAMENTO DA CHAMADA



ATA DA REUNIÃO DE JULGAMENTO DA CHAMADA 15/2019 NO DIA 01.06.2020

No dia 01 de junho de 2020, às 17h30, reuniram-se virtualmente os membros do Comitê Técnico-Científico do “Projeto Brumadinho-UFMG”, Fabiano Lara, Claudia Mayorga, Ricardo Ruiz, Adriana Monteiro da Costa, Carlos Augusto Gomes Leal, Claudia Carvalhinho Windmöller, Efigênia Ferreira e Gustavo Ferreira Simões e o Secretário Executivo do “Projeto Brumadinho-UFMG”, Tiago Barros Duarte.

Tendo sido previamente encaminhado o Subprojeto para exame, foi avaliada a PROPOSTA submetida pela Professora Camila Amorim para a Chamada 15/2019. Foi identificado que o Subprojeto apresentado cumpriu os requisitos formais de submissão. Examinado e discutido o mérito, conforme item 6.3 do edital, a proposta foi avaliada como relevante e cientificamente robusta e com equipe executora experiente e apta à execução do projeto. Verificou-se, portanto, que a proposta preenche o objetivo completamente, com elevada qualidade, concluindo, por unanimidade pela APROVAÇÃO COM AJUSTES. Observou-se necessidade de adequações, tendo sido identificadas as seguintes recomendações a serem realizadas pela proponente:

Com relação ao Plano Amostral proposto:

1. Retirar do texto a referência à Chamada 11 (Coleta de Água Superficial), deixando claro somente que os pontos amostrais foram selecionados a partir do Plano Amostral de Águas Superficiais, constante do Anexo III da Chamada 11. Da mesma forma excluir do texto a justificativa que relaciona o número de pontos amostrais ao tempo necessário para os ensaios.
2. Recomendamos incluir mais um ponto no Rio Paraopeba, à montante da confluência com o Ribeirão Ferro-Carvão.
3. Recomendamos verificar a possibilidade de excluir um dos pontos no Rio Paraopeba a jusante da confluência com o Ribeirão Ferro-Carvão.
4. Recomendamos verificar a possibilidade de reduzir a frequência de amostragem para trimestral, garantindo, entretanto, a análise de amostras coletadas no período de chuvoso.

Com relação à Metodologia:

1. Apresentar o(s) critério(s) de escolha dos testes de ecotox agudo e crônico e a necessidade dos mesmos para os objetivos propostos.
2. Caracterização físico-química da água: será realizada para todas as amostras, ANTES dos testes ecotox, conforme Chamada 18+21. Se for necessário algum outro ensaio deverá ser previsto aqui neste projeto. Na página 15, final do primeiro parágrafo, é mencionada a inclusão de análises físico-químicas da água APÓS a exposição aos organismos que serão usados nos testes ecotox. Destacar quais análises serão realizadas APÓS os testes, uma vez que pode haver interferência desses testes nos parâmetros analisados. Também são mencionadas algumas análises que não estão



contempladas em outras chamadas (por exemplo DQO e cloro residual). Recomendamos a inclusão dessa etapa na proposta, incluindo consumíveis e recursos humanos para a sua realização. Destacamos que essas análises serão realizadas no CRA – Centro de Referência Ambiental, que está sendo implantado no Projeto Brumadinho-UFMG.

Com relação ao orçamento:

1. Alguns materiais permanentes solicitados devem ser justificados, adaptados e, eventualmente, retirados, tais como microcomputadores, licenças para softwares etc.
2. Inserir o acompanhamento de membro(s) da equipe nas coletas, bem como os custos associados (diárias etc.).
3. Considerando as alterações recomendadas, apresentar novo orçamento detalhado.
4. Rever método de cálculo das taxas 10/95 seguindo procedimento correto.

Também será solicitado, na divulgação do Resultado Preliminar, que a proponente envie os Termos de Compromisso Éticos assinados por todos os componentes da equipe e o registro do projeto no SIEX/UFMG.

Foi definido que o Professor Gustavo Simões será o responsável do CTC pelo acompanhamento da Chamada 15. A Professora Claudia Windmüller será a supervisora da Chamada 14.

Encerrou-se a reunião às 18h30 horas. Eu, Tiago Barros Duarte, Secretário-Executivo do Comitê Técnico-Científico do “Projeto Brumadinho-UFMG” lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais. Belo Horizonte, 01 de junho de 2020.

Adriana Monteiro da Costa

Claudia Mayorga

Carlos Augusto Gomes Leal

Efigênia Ferreira

Claudia Carvalhinho Windmüller

Tiago Duarte

Fabiano Lara

Gustavo Ferreira Simões

Ricardo Machado Ruiz



RECURSOS E ADEQUAÇÕES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
ESCOLA DE VETERINÁRIA
FACULDADE DE FARMÁCIA

SUBPROJETO

ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL

EM ATENDIMENTO À CHAMADA 15/2019 - PROEX/PROJETO BRUMADINHO UFMG

BELO HORIZONTE - MG

JUNHO/2020



SUMARIO

1.	APRESENTAÇÃO	3
2.	EQUIPE PROPONENTE	3
3.	INTRODUÇÃO	5
4.	OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS	6
5.	ESTADO DA ARTE	7
	5.1 Ecotoxicologia no monitoramento da qualidade das águas e como instrumento de perícia ambiental	7
6.	JUSTIFICATIVA	12
7.	MATERIAL E MÉTODOS	14
	7.1 Etapa 1: Formalização do contrato, compras e mobilização da equipe atuante no projeto	14
	7.2 Etapa 2: Treinamento dos bolsistas para realização dos ensaios ecotoxicológicos e calibração de instrumentos	15
	7.3 Etapa 3: Realização dos ensaios ecotoxicológicos com as amostras coletadas na Bacia do Rio Paraopeba	15
	7.3.3 Realização dos testes ecotoxicológicos	19
	7.3.4 Análise de toxicidade aguda com <i>Allivibrio fischeri</i>	21
	7.3.5 Análise de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia spp</i>	21
	7.3.6 Análise de toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	24
	7.3.7 Ensaios de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish) adulto	25
	7.3.8 Toxicidade aguda e crônica em larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	26
	7.3.9 Análises de genotoxicidade e mutagenicidade	27
	7.5. Etapa 4: Análises integrada dos resultados e elaboração de relatórios	28
8.	CRONOGRAMA	28
9.	DEDICAÇÃO E RESPONSABILIDADES DE CADA PROFESSOR PESQUISADOR	29
10.	PLANO DE TRABALHO DOS BOLSISTAS	30
11.	ORÇAMENTO: PLANO DE APLICAÇÃO DOS RECURSOS COM CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO	31
12.	REFERÊNCIAS	45



1. APRESENTAÇÃO

A presente proposta objetiva o desenvolvimento de um Subprojeto que contempla as atividades descritas na Chamada Pública Interna Induzida Nº 15/2019 – Análise Ecotoxicológica em Água Superficial, no âmbito do Projeto Brumadinho-UFMG, que tem como objetivo geral auxiliar o Juízo da 6ª Vara da Fazenda Pública da Comarca de Belo Horizonte a identificar e avaliar os impactos decorrentes do rompimento da Barragem I da Mina Córrego do Feijão.

Nesse contexto, a presente proposta prevê a realização de ensaios ecotoxicológicos para verificar a toxicidade aguda e crônica de amostras de águas superficiais, coletadas ao longo da Bacia do Rio Paraopeba à montante e à jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”.

2. EQUIPE PROPONENTE

A equipe proponente, listada no Quadro 1, será coordenada por professores pesquisadores do departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG (DESA-Escola de Engenharia) e contará com professores e pesquisadores dos departamentos de Análises Clínicas e Toxicológicas (Faculdade de Farmácia), Clínica e Cirurgia Veterinária (Escola de Veterinária), Zootecnia (Escola de Veterinária), compreendendo assim uma equipe multidisciplinar, como sugerido na Chamada Pública. Os professores pesquisadores provenientes desses departamentos terão auxílio de bolsistas de pós-graduação, assim como pesquisadores e técnicos mestres e doutores, que possuem experiência prévia comprovada na condução de ensaios ecotoxicológicos.



Quadro 1- Membros da equipe proponente, participação, atribuição no projeto e link do lattes

Professores					
Nome	Título	Unidade	Participação	Atribuição no Projeto	Link do Lattes
Camila Amorim	Doutora	DESA/EE	Coordenadora	Coordenação e execução das atividades e da equipe	http://lattes.cnpq.br/9940811381309673
Maria Clara Starling	Doutora	DESA/EE	Sub-coordenador Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução das análises com <i>Allivibrio fischeri</i> (bactéria) e <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alga) e realizar a comunicação entre as diferentes equipes	http://lattes.cnpq.br/5732421311917264
Carlos Tagliati	Doutor	ACT/FF	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de mutagenicidade e genotoxicidade	http://lattes.cnpq.br/8464038725747139
Gilcinéa Santana	Doutora	DCCV/EV	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de toxicidade com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish – peixe) adulto e larvas	http://lattes.cnpq.br/8035985522429176
Kleber Miranda Filho	Doutor	DZOO/EV	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia dubia</i> (microcrustáceo)	http://lattes.cnpq.br/9582652974539721
Bolsistas					
Nome	Título	Unidade	Participação	Atribuição no Projeto	Link do Lattes
Mayra Thais Menezes	Graduado	DCCV/EV	Técnico de laboratório	Execução dos ensaios com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish – peixe)	http://lattes.cnpq.br/7661539597668750
João Paulo Lorenzini	Mestre	DZOO/EV	Bolsista de Doutorado	Execução das análises de toxicidade com <i>Ceriodaphnia sp.</i>	lattes.cnpq.br/7815177509865232
Beatriz Reis	Doutora	DESA	Bolsista de Pós-Doutorado	Execução das análises de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i>	lattes.cnpq.br/9454235941494186
Técnico mestre	Mestre	DESA	Técnico de laboratório	Execução das análises de toxicidade com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	a definir
Pós Doutor Júnior	Doutor	ACT/FF	Bolsista de Pós-Doutorado	Execução dos Testes de Ames e dos ensaios de genotoxicidade	a definir
Técnico mestre	Mestre	ACT/FF	Técnico de laboratório	Preparo de material, organização do laboratório e realização dos ensaios in vitro	a definir

DESA - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; ACT - Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia; DZOO - Zootecnia, Escola de Veterinária; DCCV/EV - Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária



3. INTRODUÇÃO

“Em 25 de janeiro de 2019, a Barragem I da Mina “Córrego do Feijão”, em Brumadinho, Minas Gerais, se rompeu. O fato ocasionou o falecimento e desaparecimento de 270 pessoas ao total, além de uma série de consequências e impactos pessoais, sociais, ambientais, econômicos e em patrimônios por longa extensão territorial, em especial na Bacia do Rio Paraopeba” (PRPQ, 2020).

Dentre os inúmeros impactos ambientais decorrentes do rompimento de uma barragem de rejeitos de minério de ferro, como a Barragem I da Mina “Córrego do Feijão” e sua precedente, a Barragem do Fundão da Samarco, destaca-se a deterioração da qualidade da água. O rejeito - composto principalmente por matéria orgânica (MO), sílica (Si) e ferro (Fe), além de outros elementos traço (Pb, Cu, As, Cr, Ni, etc.) possivelmente presentes no solo – é carregado pelas águas dos rios após o rompimento, causando alterações nas características físico-químicas da água superficial compreendendo: elevação da turbidez, da concentração de sólidos em suspensão e dissolvidos, da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), assoreamento do leito do rio, aumento da concentração de Fe e outros metais eventualmente associados ao solo/rejeito, desmatamento e erosão das margens, arraste de organismos flutuantes (nêuston e plêuston) para o fundo e aterramento desses e dos organismos bentônicos (TUNDISI; TUNDISI, 2008; FERNANDES et al., 2016).

Para além dos efeitos diretos, destaca-se também as consequências indiretas como a redução da penetração de luz e da concentração de oxigênio dissolvido na coluna d’água, morte de peixes e organismos sensíveis a componentes do rejeito e às alterações abruptas do ambiente, o que caracteriza um quadro de toxicidade aguda, com consequente perda da biodiversidade (FERNANDES et al., 2016). Não obstante, a dispersão do rejeito, pode desencadear o revolvimento do sedimento depositado no fundo do rio devido à sua elevada massa específica. Como consequência, os elementos traço (Al, Fe, Cd, As, Hg, Pb, etc) estocados no sedimento há décadas são ressuspensos na coluna d’água, causando toxicidade à fauna aquática e aos seres humanos. A longo prazo, a bioacumulação de tais poluentes na cadeia trófica pode vir a provocar efeitos em fases posteriores do ciclo de vida dos animais que habitam o ambiente, efeitos esses caracterizados como toxicidade crônica (KONDURACKA, 2019).

A implementação de um programa de monitoramento que compreenda a avaliação ecotoxicológica de amostras coletadas na bacia atingida é essencial para qualificar e quantificar, ou até mesmo prever, os efeitos tóxicos agudos e crônicos provocados pelo lançamento de rejeito por ocasião do rompimento de uma barragem de mineração. Sendo assim, a realização de análises ecotoxicológicas executadas por equipe tecnicamente capacitada e sem vínculo com a mineradora responsável, possibilitará a um melhor entendimento dos efeitos tóxicos provocados na Bacia do Rio Paraopeba como consequência do Rompimento da Barragem do Córrego Feijão. Além disso os testes ecotoxicológicos permitem a identificação da rota de exposição aos compostos tóxicos. Tal monitoramento deve ser feito em paralelo às análises físico-químicas de qualidade da água superficial, de maneira a subsidiar as análises do impacto ambiental associado ao rompimento da barragem.



4. OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

Avaliar a rota de exposição a contaminantes e a potabilidade das águas superficiais coletadas a montante e a jusante do rompimento da Barragem I da Mina do Córrego Feijão com relação a ensaios ecotoxicológicos.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Realizar testes de toxicidade aguda em relação á bioluminescência emitida por *Allivibrio fischeri* para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade aguda Zebrafish (*Danio rerio*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp.* para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente *Pseudokirchneriella subcapitata*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade aguda e crônica em larvas recém eclodidas de Zebrafish (*Danio rerio*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de mutagenicidade e genotoxicidade para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Elaborar relatórios técnicos (parcial e final) contendo os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos propostos e relacioná-los de maneira integrada com os resultados obtidos para a caracterização físico-química.



5. ESTADO DA ARTE

5.1 Ecotoxicologia no monitoramento da qualidade das águas e como instrumento de perícia ambiental

As análises ecotoxicológicas de águas superficiais, permitem prever, detectar, qualificar e quantificar o(s) efeito(s) agudo(s) e/ou crônico(s) provocado(s) por uma amostra aos organismos teste. Dentre os efeitos, ou “endpoints”, mensurados pelos diversos ensaios ecotoxicológicos estão: mortalidade, motilidade, desregulação endócrina, alteração na taxa de crescimento ou morfológica, comprometimento reprodutivo, etc. (ADAMS; GREELEY, 2000; MARTINEZ-HARO et al., 2015; BOGER et al., 2016). Tais efeitos são detectados e quantificados por meio da realização de testes de toxicidade que consistem na exposição de organismos teste, cuidadosamente selecionados e cultivados, à amostra ambiental sob condições controladas (pH, OD, fotoperíodo, temperatura, etc). Desse modo, os resultados obtidos por meio desses ensaios refletem os efeitos sinérgicos provocados pelas substâncias tóxicas que podem estar presentes em um determinado ambiente ou amostra.

A ecotoxicologia como ferramenta de investigação na mensuração de impactos ambientais pode ser grande aliada em perícias relacionadas a ocorrência de eventos que impactam a fauna. Afinal, tais análises permitem a detecção e quantificação dos efeitos tóxicos agudos e crônicos que estão relacionados à presença do rejeito no rio e seus sedimentos sobre a fauna aquática, de maneira a contribuir para a elucidação do modo de ação dos poluentes.

Adicionalmente, a análise da qualidade da água apenas com base nos parâmetros físico-químicos não reflete o quadro ecológico dos corpos d’água, sendo essencial o monitoramento dos parâmetros ecológicos e ecotoxicológicos (Figura 1) para complementar as informações obtidas a partir dos parâmetros físico-químicos (ADAMS; GREELEY, 2000). De maneira a contribuir para a integridade ambiental das águas europeias, a DIRETIVA WFD 2000/60/EC impõe o monitoramento simultâneo dos parâmetros ecológicos e ecotoxicológicos desde o ano de 2000 (UE, 2000). Similarmente, análises de toxicidade total dos efluentes lançados nos corpos d’água são obrigatórias desde 1991 nos Estados Unidos (USEPA, 1991).

O monitoramento da qualidade da água por análises ecotoxicológicas, objeto da presente proposta, é de extrema importância no contexto de ocorrências ambientais como o rompimento de uma barragem. Os testes ecotoxicológicos visam à avaliação da toxicidade de um poluente, uma mistura de poluentes ou de uma amostra ambiental, para que se possa compreender e quantificar o efeito provocado e o risco apresentado por eles aos organismos aquáticos em diferentes níveis tróficos (MARTINEZ-HARO et al., 2015; WERNERSSON et al., 2015).

Análises ecotoxicológicas podem ser realizadas *in vitro* ou *in vivo* por meio da exposição de uma célula ou organismo teste à amostra avaliada (água superficial, efluente bruto ou tratado, solução sintética, rejeito de mineração, água contaminada com efluente ou rejeito, etc.) por tempo padronizado e em condições definidas (pH, temperatura, oxigênio dissolvido). Desse modo, é possível detectar tanto a toxicidade aguda, – aquela para a qual o efeito é detectado



em horas (24, 48, 96h), – quanto a crônica – quando o efeito é observado em algum momento ao longo do ciclo de vida do organismo teste (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Figura 1 – Parâmetros de monitoramento de qualidade da água



Existem diversos ensaios de toxicidade aguda e crônica já padronizados pelas normas internacionais (ISO) e os mais comumente utilizados para amostras de água e efluentes estão listados no Quadro 2, como o ensaio de Microtox® que avalia a toxicidade aguda para a bactéria marinha *Allivibrio fischeri* (ISO, 2007; ABNT, 2012), e os testes de toxicidade aguda (48 horas) e crônica que utilizam o crustáceo *Daphnia magna* (21 dias) (ISO, 2012; ABNT, 2016a;) ou *Ceriodaphnia spp.* (7 dias) (CETESB, 2017). Os testes de toxicidade aguda têm como principal resultado a CE₅₀ - concentração que causa efeito a 50% da população. Enquanto os ensaios de toxicidade crônica permitem a quantificação da Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) – concentração máxima que não causa efeito - e da Concentração de Efeito Observado (CEO) – concentração mínima que causa efeito. A aplicação ambiental da CENO consiste na sua adoção como concentração segura para determinado poluente no ambiente e na avaliação dos impactos ambientais provocados a longo prazo por determinados poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).



Quadro 2 – Testes ecotoxicológicos padronizados pela ABNT, ISO e OECD

Tipo de teste	Organismo teste	ABNT NBR/OECD	Filo	Nível trófico	Resposta (endpoint)
Toxicidade Aguda	<i>Allivibrio fischeri</i>	15411-3:2012	<i>Proteobacteria</i>	Decompositor	Luminescência
Toxicidade aguda	<i>Danio rerio</i> (adulto)	15088:2016	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Letalidade e comportamento
Toxicidade crônica	<i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	<i>Crustacea</i>	Consumidor I	Mobilidade, letalidade e reprodução
Toxicidade crônica	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	<i>Clorophyta</i>	Produtor	Crescimento
Toxicidade aguda e crônica	<i>Danio rerio</i> (larvas)	15499/2015	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Letalidade e crescimento
Análises de mutagenicidade	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD 471; ISSO 11350:2012	<i>Proteobacteria</i>	Decompositor	Mudança de cor do meio devido mutação celular
Análise de genotoxicidade	Célula V79 (fibroblastos de pulmão de hamster)	ISO 21427-2:2006	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Presença de micronúcleos

No que diz respeito à legislação nacional, a resolução CONAMA 357 de 2005 exige a ausência de toxicidade crônica em águas de Classe 1 e 2 e de toxicidade aguda para as águas de classe 3 e prevê a realização de testes de toxicidade para substâncias que não estejam no escopo da legislação. Entretanto, não há definição dos ensaios de toxicidade que devem ser utilizados no monitoramento (CONAMA, 2005). A CONAMA 430 de 2011, que dispõe sobre o padrão de lançamento de efluentes, estabelece a realização de ensaios ecotoxicológicos no efluente e no ponto de mistura do corpo receptor para pelo menos dois níveis tróficos distintos (CONAMA, 2011), sem contudo especificar o tipo de ensaio. A resolução COPAM CERH 01/2008 também prevê a realização de testes ecotoxicológicos e de bioacumulação (MG, 2008), entretanto sem especificar o tipo e o nível trófico a serem adotados.

O efeito carcinogênico dos mais diversos contaminantes na água, incluindo metais, pode ser avaliado por meio de ensaios *in vitro*, como nos testes de carcinogenicidade. Essa avaliação é fundamental no sentido de determinar o efeito desses contaminantes a longo prazo, pois os mesmos não são imediatos e os mecanismos biológicos, como bioquímicos e genômicos, envolvidos são de extrema complexidade. Porém, considerando que os testes para avaliação da carcinogenicidade demandam tempo e são extremamente onerosos, os testes para avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade são mais empregados, pois determinam o potencial carcinogênico da amostra (HARTWIG *et al.*, 2002; ASMUSS *et al.*, 2000; CHEN & WHITE, 2004; GOODSON *et al.*, 2015; UMBUZEIRO *et al.*, 2017). O emprego de testes validados por *guidelines* internacionais como os da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) são recomendados e aplicados para essa finalidade.

O Quadro 3 traz estudos ecotoxicológicos realizados diante das recentes ocorrências de rompimentos de barragem de mineração de minério de ferro no Estado de Minas Gerais no



Quadro 3 - Estudos que realizaram testes ecotoxicológicos para dimensionar impactos relacionados à atividade de mineração e eventos de rompimentos de barragens contendo rejeito de minério de ferro no Estado de Minas Gerais.

Evento	Amostra	Organismo teste	Tipo de teste e efeito observado	Resultados	Referência
Rompimento da Barragem do Fundão	Água, lama e sedimento do Córrego Gualaxo do Norte	<i>HepG2 e Allium cepa</i>	Agudo (24h) - Citotoxicidade (células humanas), mutagenicidade e genotoxicidade (micronúcleo, anomalias cromossômicas, potencial carcinogênico).	Amostras de água inibiram HepG2 em mais 70% de inibição. Genotoxicidade e mutagenicidade foram observadas para ambos os organismos teste em todas as amostras.	SEGURA et al., 2016
	Água superficial coletada no Rio Doce	<i>Danio rerio</i> (Zebra fish) - embrião	Agudo (96h) - mortalidade e acúmulo de metais nos tecidos	Não houve mortalidade para nenhum dos organismos expostos à amostra de água, descartando toxicidade aguda, mas foi detectada bioacumulação de metais, principalmente para espécimes expostos à água amostrada em Regência.	SARTORI et al., 2016
	Água e sedimento no Córrego Gualaxo do Norte	Macrófitas: <i>Egeria densa</i> e <i>Chara sp.</i>	Agudo (24h) - taxa de produção primária bruta Crônico (90 dias) - crescimento das plantas	O crescimento e a taxa de produtividade primária para <i>Chara sp.</i> apontaram toxicidade do Fe, devido a interferência na atividade de enzimas relacionadas à síntese de clorofila. Houve um aumento na taxa de alongação das duas espécies, devido à presença de elementos traço na água, isso redução do ganho de biomassa e do desenvolvimento de estruturas reprodutivas.	BOTTINO et al., 2017
	Rejeito da Barragem do Fundão e compartimentos geomorfológicos do Córrego Gualaxo do Norte	<i>Eisenia andrei</i>	Agudo (14 dias) - mortalidade e perda de biomassa Crônico (48 h) - Teste de fuga	Ensaio agudo: 20% de mortalidade para os indivíduos expostos ao rejeito que apresentaram ganho de massa corporal, provavelmente devido acúmulo de água por edema devido aos altos teores de sódio do rejeito. As demais amostras não provocaram mortalidade. Amostras do terraço fluvial com rejeito provocaram perda de massa corporal. Ensaio crônico: tanto o rejeito como a amostra de sedimento contaminada comprovam perda de função de hábitat (80% de fuga).	SERRANO et al., 2018



Evento	Amostra	Organismo teste	Tipo de teste e efeito observado	Resultados	Referência
	Água coletada no Rio Doce	<i>Allium cepa</i>	Agudo (24h) - Citotoxicidade (índice mitótico, índice de fases mitóticas, frequência de anomalias cromossômicas)	Concentrações extremamente altas de Fe, Al e Mn encontradas e associadas a alterações na mitose em amostras com diluição a partir de 40%. O índice mitótico caiu entre 25-35% com amostras não diluídas. Houve uma alteração nos ciclos da mitose com prolongação da fase de prófase e redução das demais fases. Aberrações cromossômicas foram observadas para amostras coletadas em locais impactados.	QUADRA et al., 2019
Atividades de mineração	Água superficial, solo e sedimento em áreas próximas a atividades de mineração na bacia do Rio São Francisco (estações seca e chuvosa)	<i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> (normas internacionais) <i>Daphnia laevis</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , <i>Chironomus xanthus</i> (ambientes tropicais)	Agudo (48 - 96h) - imobilidade e mortalidade Crônico (7 dias) - reprodução e mortalidade	Deteção de efeitos agudos e crônicos mesmo em locais onde os poluentes estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação. Para <i>D. similis</i> efeitos agudos foram observados para as amostras de água coletadas em todos os pontos na estação seca e apenas nos pontos onde há influência de mineração de ouro também na estação chuvosa. O organismo tropical <i>D. laevis</i> indicou toxicidade nas amostras sob influência de mineração de ouro em ambas estações. A toxicidade crônica foi observada para as amostras da estação seca coletadas nos pontos sob influência de mineração de ouro para ambos os organismos. A reprodução foi mais afetada pelas amostras de sedimento se comparadas às de água.	MATOS, 2019
Rompimento da Barragem I do Córrego Feijão	Água superficial coletada ao longo de 464 km no Rio Paraopeba na semana seguinte ao rompimento	<i>Danio rerio</i> (Zebra fish) - embrião	Agudo (96h) - mortalidade, má formação.	Alta mortalidade de embriões para os dois grupos de amostras, com aumento da mortalidade (85%) nas amostras. O aumento de mortalidade não pôde ser diretamente vinculado aos poluentes associados ao rompimento da barragem devido à prática de outras atividades na Bacia com eventual eutrofização.	THOMPSON et al., 2020



período de 2015-2019. Os estudos foram realizados no sentido de quantificar os impactos decorrentes desses eventos nas bacias atingidas e contemplaram tanto a análise ecotoxicológica de amostras de água superficial, quanto do rejeito, e de sedimentos dos rios atingidos pelos rompimentos, e nas bacias impactadas pela atividade minerária intensa. Tais estudos utilizaram ensaios realizados com organismos de diferentes níveis tróficos e métodos *in vitro* e *in vivo*, assim como os ensaios que estão sendo sugeridos na presente proposta.

Em relação ao rompimento da barragem de Brumadinho, objeto da presente proposta, há apenas um estudo publicado acerca da avaliação ecotoxicológica das amostras de água coletadas na Bacia do Rio Paraopeba. Nessa pesquisa o teste de toxicidade aguda com o peixe *D. rerio* foi utilizado. Foi detectada alta taxa de mortalidade dos espécimes expostos às amostras do Rio Paraopeba, o que representa um risco à integridade ambiental. Entretanto, os autores afirmam que não é possível associar essa mortalidade diretamente aos componentes do rejeito, uma vez que a região está submetida a diversos outros impactos como, por exemplo, a eutrofização (THOMPSON et al., 2020). Essa dificuldade de segregar os fatores causadores de determinado efeito em amostras ambientais está relacionada ao fato de que elas contêm múltiplos componentes que podem atuar sinergicamente (SEGURA et al., 2016). Desse modo, a utilização de diferentes ensaios ecotoxicológicos em diversos níveis tróficos, associada à uma caracterização físico-química das amostras ambientais, torna-se imprescindível para a obtenção de respostas seguras e precisas quanto ao efeito ecotoxicológico de um episódio de contaminação ambiental.

6. JUSTIFICATIVA

A escolha dos testes de toxicidade que serão realizados no âmbito desse projeto (Quadro 4) se justifica uma vez que a ocasião do rompimento de uma barragem de mineração com lançamento do rejeito no corpo d'água pode ocasionar tanto toxicidade aguda quanto crônica, com efeitos que se manifestam de maneira distinta nos diferentes níveis tróficos. Essa abordagem corrobora com o que é preconizado com as normas ambientais nacionais e internacionais, as quais exigem a realização dos testes em pelo menos dois níveis tróficos distintos (UE, 2000; BRASIL, 2005).

No momento de um episódio de contaminação ambiental, como o rompimento de uma barragem de rejeitos, os poluentes estão presentes na coluna d'água em concentrações maiores, o que leva à exposição dos organismos aquáticos de maneira abrupta podendo acarretar o efeito de toxicidade aguda, como observado por THOMPSON et al. (2020) para embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) com amostras de água coletadas uma semana após o rompimento de uma barragem. Entretanto, com o passar do tempo, o rejeito tende a decantar e seus constituintes são estocados nos sedimentos dos rios, o que diminui a chance de ocorrência de toxicidade aguda, mas não exclui a possibilidade da toxicidade crônica. Afinal, a transferência de substâncias entre os sedimentos e a coluna d'água pode liberar constituintes do rejeito, causando a exposição frequente dos organismos ali presentes por longos períodos, o que, mesmo em pequenas concentrações, pode gerar efeitos a longo prazo, caracterizando a toxicidade crônica (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015; SEGURA ET AL, 2016).

Adicionalmente, há de se considerar o fato do revolvimento dos sedimentos presente do leito dos rios durante a estação chuvosa, que pode desencadear a liberação de constituintes do



rejeito em concentrações mais elevadas, levando a recorrência da toxicidade aguda. Dessa forma, é essencial a realização de testes de ecotoxicidade aguda e crônica para os diferentes níveis tróficos presentes no ambiente (por exemplo produtor, consumidores I e II e decompositor). Nesta proposta sugere-se a adoção de dois testes de toxicidade aguda e dois testes de toxicidade crônica, realizando dessa maneira a investigação em dois níveis tróficos como detalhado no Quadro 4.

Considerando que a variação do efeito detectado pode ocorrer não apenas em relação ao nível trófico, mas também para um mesmo organismo-teste que pode responder à presença de um contaminante de maneira distinta em suas diferentes fases do ciclo de vida (WENERSSON ET AL., 2015), justifica-se a realização de dois testes distintos com o *Danio rerio*. O teste de toxicidade aguda com o peixe adulto e os teste de toxicidade aguda e crônica com o embrião desse mesmo animal, são aqui propostos uma vez que os estágios iniciais de desenvolvimento de um organismo-teste são mais sensíveis do que os estágios juvenil e adulto. Ressalta-se que tais testes são utilizados rotineiramente por órgãos internacionais de proteção ambiental, conforme detalhado no Quadro 4.

Considerando os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, ressalta-se a complementaridade dos resultados obtidos por meio da realização de ambos os testes com uma mesma amostra. Afinal, o teste de genotoxicidade revela um dano ao DNA celular que pode ou não vir a ser reparado. Ao passo que o teste de mutagenicidade detecta mutações no DNA que são permanentes e hereditárias, afetando também as próximas gerações. Tais testes são realizados tanto pela CETESB quanto pela EPA USA rotineiramente de maneira a obter um diagnóstico robusto sobre o efeito da qualidade da água nos organismos aquáticos.

Dessa forma, o conjunto de testes de toxicidade aqui proposto é suficientemente sensível e abrangente, como recomendado para o monitoramento ambiental (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015). Além disso, como listado no Quadro 4, os testes foram escolhidos com base nos protocolos de monitoramento periódico da qualidade da água adotado e reconhecido por órgãos ambientais de referência nacional e internacional.



Quadro 4 – Justificativa para escolha dos ensaios ecotoxicológicos na presente proposta

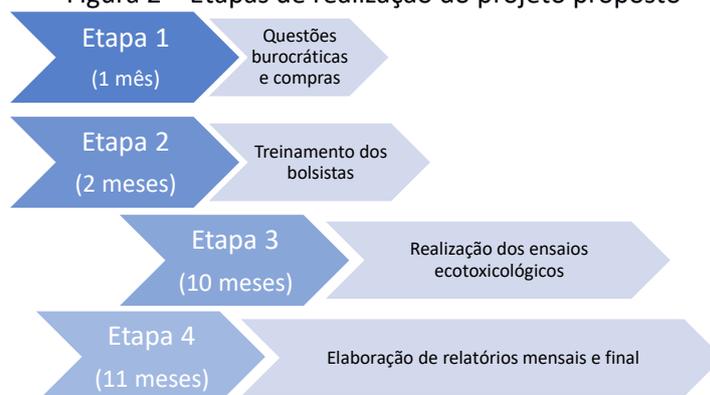
Teste	Organismo	Organismo teste	Metodologia	Nível Trófico	Referência de Utilização
Toxicidade Aguda	Bactéria	<i>Allivibrio fischeri</i>	ABNT NBR 15411-3:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Toxicidade aguda	Peixe	<i>Danio rerio</i> (adulto)	15088:2016	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD
Toxicidade crônica	Crustáceo	<i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	Consumidor I	IGAM UE-WFD
Toxicidade crônica	Alga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	Produtor	UE-WFD
Toxicidade aguda e crônica	Peixe	<i>Danio rerio</i> (larvas)	15499/2015	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD
Análises de mutagenicidade	Bactéria	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD 471; ISSO 11350:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Análise de genotoxicidade	Célula Animal	Célula V79 (fibroblastos de pulmão de hamster)	ISO 21427-2:2006	Consumidor II	CETESB EPA-USA

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, EPA-USA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América); IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas; UE-Diretiva da União Europeia WFD2000/60/EC;

7. MATERIAL E MÉTODOS

De maneira a possibilitar o alcance de todos os objetivos listados acima, a proposta foi dividida em 4 Etapas de acordo com a Figura 2.

Figura 2 – Etapas de realização do projeto proposto



7.1 Etapa 1: Formalização do contrato, compras e mobilização da equipe atuante no projeto

Essa etapa contempla a formalização dos contratos dos bolsistas responsáveis pela execução do projeto com a FUNDEP, bem como a realização dos pedidos de compras dos consumíveis e equipamentos necessários para a realização dos ensaios de ecotoxicologia aqui propostos.



Como alguns testes devem passar por aprovação do Comitê de Ética da UFMG, as declarações constando avaliação e aprovação desse órgão serão requeridas nessa etapa.

7.2 Etapa 2: Treinamento dos bolsistas para realização dos ensaios ecotoxicológicos e calibração de instrumentos

Nessa etapa, cada pesquisador será responsável por treinar os bolsistas vinculados à sua atuação no projeto nos ensaios ecotoxicológicos aqui propostos, bem como nas exigências necessárias para garantir o seguimento das normas da ABNT e a segurança das amostras e dos bolsistas e interpretação adequada dos resultados obtidos. Bolsistas também serão treinados nos softwares necessários, incluindo aquele destinado ao cadastro e rastreamento das amostras que será disponibilizado à equipe do projeto pela UFMG visando ao controle apropriado sobre o andamento do processamento das amostras. Além disso, será nessa etapa que será realizada a calibração dos equipamentos e instrumentos a serem utilizados para a execução dos ensaios ecotoxicológicos (balanças, vidraria, pipetas, etc.) conforme previsto no orçamento.

7.3 Etapa 3: Realização dos ensaios ecotoxicológicos com as amostras coletadas na Bacia do Rio Paraopeba

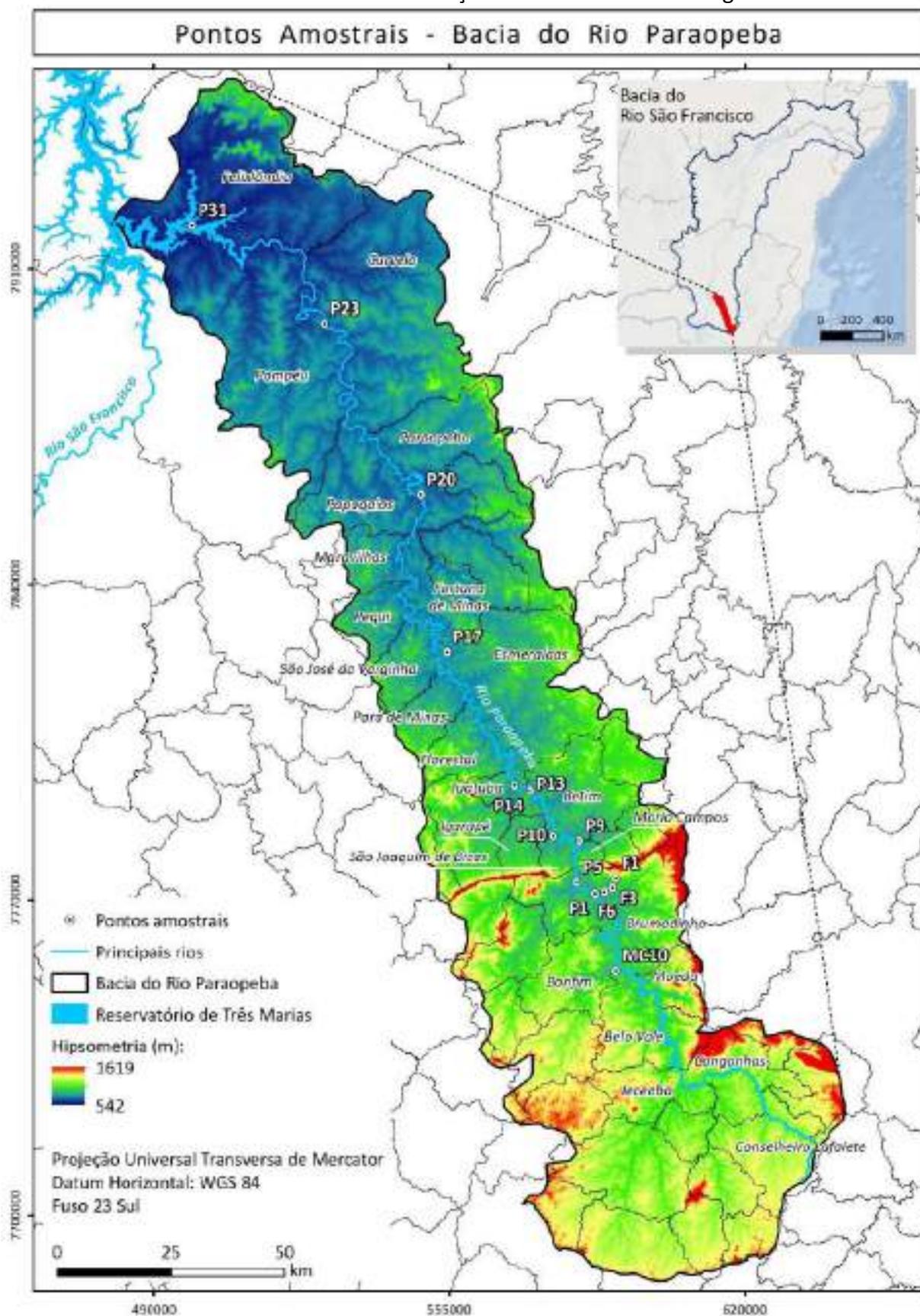
7.3.1. Seleção dos Pontos Amostrais

Os pontos de amostragem para os ensaios de ecotoxicidade foram selecionados a partir do Plano Amostral de Águas Superficiais constantes no Anexo III da Chamada Interna Induzida Nº 11 do Edital Brumadinho-UFMG. A escolha foi feita de acordo com a proximidade do ponto amostral à antiga barragem e à sua relevância em relação à possíveis impactos ambientais e à saúde humana, como, por exemplo, nas proximidades de pontos de captação de água. Foram priorizados, também, pontos que coincidem com estações amostrais já existentes e monitorados por outros órgãos como o Instituto Mineira de Gestão das Águas (IGAM) e a CPRM, uma vez que essa correspondência permite uma análise mais aprofundada acerca das alterações na qualidade da água antes e após o rompimento.

Desse modo, definiu-se que a coleta das amostras para a realização de ensaios ecotoxicológicos deverá ser realizada nos pontos destacados na Figura 3, com detalhes sobre a localização descritos no Quadro 5. Dentre os 12 pontos escolhidos, dois deles (M9 e M10) representam locais de referência por se localizarem à montante do rompimento da barragem. Os 10 pontos restantes estão localizados à jusante do rompimento, em sítios afetados pela dispersão do rejeito: Ribeirão Ferro Carvão (F1, F3 e F6) e Rio Paraopeba (6 pontos).



Figura 3 – Representação da localização geográfica dos pontos propostos para coleta de amostras visando à realização de ensaios ecotoxicológicos



Quadro 5 – Nome, localização e descrição dos pontos selecionados para a realização de coletas de amostras para testes ecotoxicológicos

N.	Ponto	Latitude	Longitude	Curso d'água	Descrição
1	MC9	7753005,78	584777,26	Rio Macaúbas	Sob a ponte no distrito de Santo Antônio da Vargem Alegre
2	MC10	7754237	591594,71		Ponto de referência à montante do local do rompimento da barragem
3	F1	7774708,05	591614,15	Ribeirão Ferro-Carvão	Pontos localizados à montante e à jusante das barragens de contenção de rejeitos instaladas pela Vale
4	F3	7772556,84	590959,37		
5	F6	7771690,75	589193,72		
6	P1	7771291,76	587024,46	Rio Paraopeba	Ponto de confluência com o Córrego-Feijão
7	P5	7773856,04	582951,59	Rio Paraopeba	À montante do ponto de captação da COPASA, área urbana de Brumadinho
8	P9	7782998,19	583557,82	Rio Paraopeba	Rio Paraopeba, após a confluência com o ribeirão Sarzedo, à jusante da área urbana de Mário Campos.
9	P10	7784026,33	577773	Rio Paraopeba	Ponte sobre o Rio Paraopeba, corresponde ao BP070 (IGAM)
10	P13	7794046,88	572735,59	Rio Paraopeba	Divisa entre Betim e Juatuba, corresponde à BP072 (IGAM) e CPRM (Juatuba)
11	P14	7795289,76	569374,64	Rio Paraopeba	Área urbana de Juatuba, confluência com o reservatório Serra Azul utilização para abastecimento de água da RMBH
12	P20	7859729,5	548687,4	Rio Paraopeba	Captação da COPASA para o município de Paraopeba

7.3.2. Volume amostral requerido

De maneira a garantir precisão dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade, permitindo a realização de réplicas e contraprovas, caso requerido pelas partes envolvidas, o volume a ser coletado para a realização das análises aqui propostas será de 15 L, uma vez que o volume necessário para cada ensaio pode variar entre 0,1 (*AlliVibrio fischeri*) e 2 L (*Danio rerio* – teste crônico) por ponto de coleta, conforme listado no Quadro 6.



Quadro 6 – Volume de amostra necessário para a realização de cada teste ecotoxicológico proposto nesse projeto

Ensaio	ABNT NBR	Volume (L)	Número de réplicas	Número de ensaios	Laboratório Responsável
Toxicidade Aguda com <i>Allivibrio fischeri</i>	15411-3:2012	0,1	3	144	Laboratório de Ensaios Biológicos/DESA
Toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia</i> sp	13373:2017	2	10	480	Laboratório de Terapêutica Veterinária, DCCV
Toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	1	3	144	Laboratório de Aquicultura/DZOO
Toxicidade aguda e crônica com <i>Danio rerio</i> (Zebra fish)	15088:2016 e 15469:2016	2	1	48	Lab. Ensaios Biológicos/DESA
Toxicidade aguda e crônica com larvas de <i>Danio rerio</i>	15499/2015	2	4	192	Laboratório de Terapêutica Veterinária, DCCV
Análises de genotoxicidade	ISO 21427-2:2006	0,25	3	144	Análises Clínicas e Toxicológicas – ToxLab/ ACT
Análises de mutagenicidade	OECD 471; ISO 11350:2012	0,25	3	144	Análises Clínicas e Toxicológicas – ToxLab/ ACT

Número de réplicas: número de repetições necessárias para cada amostra. Número de ensaios: número de amostras multiplicado pelo número de réplicas.

As coletas para os ensaios ecotoxicológicos serão realizadas nos 12 pontos amostrais previamente descritos no Quadro 5. Será coletado 1 amostra de cada ponto por campanha amostral, com uma frequência de 4 campanhas ao longo de 12 meses (coleta trimestral) totalizando 48 amostras coletadas. O volume total de amostras por campanha será de 180 litros (Quadro 6) e serão realizadas duas campanhas em período chuvoso e duas em período seco.

Vale ressaltar que a interpretação dos resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos está condicionada ao conhecimento prévio das características físico-químicas das amostras. Logo, é imprescindível a sincronicidade entre as equipes responsáveis pelos três projetos (coleta, caracterização das amostras e ensaios ecotoxicológicos) no que diz respeito ao cronograma de coletas, caracterização apropriada e completa, volume e método de conservação de amostras adequados à caracterização e realização de cada ensaio ecotoxicológico aqui proposto.

A coleta será realizada conforme definido no Anexo III da chamada pública interna induzida nº 11/2019 por equipe selecionada pelo Comitê com o acompanhamento de um membro da equipe proponente da presente proposta nos meses referentes às coletas de amostras para



ecotoxicologia , conforme previsto no orçamento. A caracterização físico-química das amostras de acordo com os parâmetros de interesse da CONAMA 357 (BRASIL, 2005) acrescida de metais e metalóides deverá ser realizada para todas as amostras a serem utilizadas nos ensaios de toxicidade **anteriormente aos testes** pela equipe responsável **de acordo com as Chamadas 18-21 do Edital Brumadinho-UFMG**, a ser selecionada pela Comissão-Técnica Brumadinho - UFMG.

Complementarmente, para alguns ensaios, a caracterização analítica sobre a constituição química e física da água deve ser repetida **após** a exposição dos organismos do teste de Zebrafish às amostras. Nesse subprojeto pretende-se realizar essa análise para a água dos aquários de criação de peixes (*Danio rerio*), cabendo analisar a água do aquário controle, a amostra de concentração mínima e para a amostra de concentração máxima, totalizando 432 amostras (3 aquários/amostra x 3 réplicas x 12 pontos/campanha x 4 campanhas/ano), conforme determinação e especificações da NBR 15469/2016 e OECD (2019). Os parâmetros a serem analisados após exposição estão apresentados no Quadro 7, sendo que os custos referentes a consumíveis e pessoal responsável por elas estão previstos no orçamento da presente proposta. Ressalta-se que tais análises serão realizadas no Centro de Referência em Análises Ambientais (CRA) da UFMG e será disponibilizado um bolsista técnico mestre para realização destas, com experiência em análises físico-químicas de qualidade de água, e o mesmo receberá treinamento prévio a fim de cumprir todos os protocolos e requisitos adotados no CRA. Caso as análises de caracterização físico-química das amostras de água superficial identifiquem outras espécies químicas que possam afetar os resultados dos estudos de ecotoxicidade, essas espécies poderão ser incluídas na análise da água **após** exposição.

Quadro 7 – Análises e métodos utilizados na caracterização físico-química das amostras dos aquários no final dos testes com *D. rerio*

Parâmetro	Metodologia
Carbono orgânico total (TOC)	5310 B ¹
Sólidos totais dissolvidos	2540C ¹
Cloro residual	300.1, 1999 ²
Metais (alumínio, arsênio, cádmium, chumbo, cobalto, cobre cromo, ferro, níquel, zinco, mercúrio, prata)	3125 B (ICP-MS) ¹

¹SMWW, 23ª Edição, 2018; ²EPA, 1999

7.3.3 Realização dos testes ecotoxicológicos

A realização dos ensaios propostos nesse projeto está prevista para ocorrer nos Laboratórios já existentes nos Departamentos de Engenharia Sanitária e Ambiental, Análises Clínicas e Toxicológicas, Clínica e Cirurgia Veterinária e Zootecnia, uma vez que estes possuem a estrutura adequada, como biotério, instalações específicas de biossegurança (capelas, barreiras de contenção), equipamentos calibrados necessários à realização dos ensaios. A aquisição de infraestrutura similar à existente nos Departamentos, implica no aumento de custos da presente proposta e também demandaria espaço físico considerável.

O Quadro 8 apresenta uma relação dos equipamentos já existentes nas Unidades e que serão utilizados para a realização dos ensaios ecotoxicológicos aqui propostos. A demanda por adaptação de algumas instalações, conforme previsto no orçamento, será necessária em alguns para garantir a segurança das análises com amostras de mando judicial.



Quadro 8 – Equipamentos já existentes nos laboratórios aonde serão desenvolvidos os ensaios ecotoxicológicos aqui propostos

Departamento e Laboratório	Equipamento	Utilização	Valor estimado (R\$)
DESA/Laboratório de Ensaio Biológicos	Espectrofotômetro Shimadzu	Teste com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	63.200,00
	Turbidímetro	Acompanhamento da qualidade da água nas amostras ao longo dos ensaios de toxicidade	30.000,00
	Sonda multiparâmetro YSI (2 sondas)		200.000,00
ACT, ToxLab	Espectrofotômetro	Realização dos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade	10.000,00
	Centrífuga refrigerada		22.000,00
	Autoclave Vertical		6.000,00
	Balança Analítica		7.500,00
	Shaker de bactérias		6.500,00
	Estufa de CO2		23.000,00
	Estufa de cultura de bactérias		5.000,00
	Fluxo laminar - 3		55.000,00
	Freezers		5.500,00
Geladeiras	5.000,00		
DZOO, Laboratório de Aquacultura	Instalações de biotério, biossegurança, salas de cultivo (investimento FINEP)	Realização dos ensaios com microcrustáceos	2.000.000,00
	Compressor de ar radial 2 cv	Manutenção do nível de OD nos aquários de cultivo	2.950,00
	Grupo gerador a diesel, cabinado, com potência aproximada de 100 kVA, fator de potência 0,8, trifásico, 220 V, dotado de painel de comando e controle automático, microprocessado, com quadro de transferência automática	Fornecimento de energia para garantia de condições adequadas ao cultivo dos animais	44.200,00
DCCV/EV, Laboratório de Terapêutica Veterinária	Estufa de secagem	Testes de toxicidade com Zebrafish	2.500,00
	Analisador hemograma digital Thermo Scientific		38.000,00
	Leitor de Elisa MultiSkan Thermo Scientific		64.000,00
	Aquários de vidro 3 L (7 unidades)		455,00
	Aquário de vidro 10 L (3 unidades)		360,00
	Aquário de vidro 35L		300,00
	Aquário de plástico de 5L (12 unidades)		600,00
	Compressores de ar Boyu (3 unidades)		180,00
	Termostato para aquário (5		300,00



Departamento e Laboratório	Equipamento	Utilização	Valor estimado (R\$)
	unidades)		
	Compressor de ar eletromagnético Boyu		400,00
	Balança digital (precisão 0,001)		400,00
	Medidor de Fé digital (2 unidades)		700,00
	Repipetador Mecânico Rhythm (0,1-50,0 ml)		3.700,00
	Geladeira frostfree 345 L		2.900,00
	Estufa de secagem Fanem 315 se		1.000,00
Total			2.601.645,00

7.3.4 Análise de toxicidade aguda com *Allivibrio fischeri*

A toxicidade aguda será avaliada utilizando o procedimento descrito na norma técnica da ABNT NBR 15411-3:2012 (ABNT, 2012; ISO, 2007) e as instruções do fabricante do Microtox® Model 500 Analyser (SDI). Nesse ensaio, a bactéria luminescente *Allivibrio fischeri* é exposta à amostra e a luminescência é avaliada antes e após a exposição de maneira a identificar se há algum efeito agudo ao organismo teste. Para tal, a bactéria liofilizada em uma concentração de 10⁸ células por ampola é ressuspensa em solução de reconstituição. Na sequência, faz-se o ajuste da salinidade da amostra e uma diluição seriada (Diluyente: NaCl 2%) é realizada (concentração máxima 81,9%). Lê-se a luminescência da bactéria ressuspensa e, em seguida, as soluções diluídas das amostras são adicionadas à bactéria com leituras subsequentes após 5, 15 e 30 minutos de exposição à diferentes diluições. A partir dos valores obtidos para a luminescência das amostras, é realizado o cálculo do efeito tóxico por meio do Software MicrotoxOmni 4.1 que gera os valores de CE50 (%) para cada amostra.

7.3.5 Análise de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp*

Preparo e preservação das amostras conforme ABNT NBR 15469

Amostras representativas deverão ser coletadas em frasco plástico descartável, de polímero inerte, preenchendo-o totalmente com a amostra, de maneira a evitar a presença de ar. O estoque das amostras deverá ser feito sob refrigeração sendo o prazo de validade de amostras resfriadas em gelo equivalente a 12 h. Caso as amostras sejam refrigeradas à temperatura menor que 10°C ou congeladas abaixo de -10°C, os prazos são de 48 horas e 60 dias, respectivamente. Após o congelamento, as amostras devem ser analisadas dentro de 12 h, não podendo haver recongelamento para uso futuro.

Cultivo de *Ceriodaphnia spp.* conforme ABNT NBR 13373:2017

Os organismos serão mantidos em lotes de até 70 adultos por litro (recipientes de até 1 000 mL) ou individualmente (recipiente com aproximadamente 15 mL) em água de diluição e mantidos em ambiente com luminosidade difusa, fotoperíodo de 12-16 h de luz e temperatura de 23-27°C. Nestas condições, espera-se que a primeira reprodução ocorrerá entre o terceiro e o quinto dias de vida. Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para o



ensaio, matrizes de diferentes faixas etárias (por exemplo, 0 a 7 dias, 7 a 14 dias e 14 a 21 dias) serão mantidas semanalmente.

A substituição da água de cultivo será feita totalmente no mínimo uma vez por semana, evitando diferença de temperatura maior que 2°C, dependendo da quantidade de organismos e do recipiente utilizado para o cultivo com utilização de pipeta de diâmetro adequado com ponta arredondada. Caso ocorra letalidade superior a 20% dos organismos adultos entre renovações consecutivas de água, não serão utilizar no ensaio os neonatos produzidos neste lote.

No caso se ocorrência de machos e, conseqüentemente efípios, devido a condições ambientais desfavoráveis, incluindo superpopulação e falta ou excesso de alimento, poderão afetar o cultivo de *Ceriodaphnia spp*, os organismos neonatos produzidos neste lote não serão utilizados no ensaio e será reavaliado o procedimento de cultivo. A alimentação dos organismos ao longo do cultivo será feita diariamente por fornecimento de algas (*Raphidocelis subcapitata*) respeitando a proporção de 1 a 5 x 10⁵ células por organismo. Adicionalmente, será fornecido aos organismos um complemento alimentar à base de ração fermentada ou outros meios nutritivos de acordo com a ABNT NBR 13373:2017.

Testes de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia spp* (conforme ABNT NBR 13373:2017)

Serão usados neonatos do gênero *Ceriodaphnia*, com idade de aproximadamente 6-24 h, obtidos por partenogênese de fêmeas adultas com idade entre 7 dias e 21 dias, durante pelo menos três gerações cultivadas sob as mesmas condições estabelecidas (temperatura, fotoperíodo e alimentação); conforme a ABNT NBR 13373:2017. A *Ceriodaphnia* utilizada no ensaio deverá ter idade inferior a 24 h e ser originada a partir de uma ninhada compreendendo no mínimo oito organismos recém-nascidos.

Um teste preliminar (TP) será realizado anteriormente ao definitivo com tempo de exposição equivalente a 24h e nas mesmas condições descritas a seguir para o teste definitivo com o objetivo de estabelecer um intervalo de soluções-teste a ser utilizado no teste de toxicidade definitivo. Serão utilizados no mínimo cinco organismos-teste por réplica. Ao final do ensaio será determinada a menor solução-teste que causa imobilidade a 100% dos organismos e a maior solução-teste na qual não será observada imobilidade.

De posse dos resultados obtidos pelo teste preliminar, será preparada uma série de soluções-teste intermediárias, cuja razão de diluição esteja entre 1,2 e 2. O controle será preparado com o mesmo número de réplicas das soluções-teste, somente com água de diluição. Oxigênio dissolvido e pH serão medidos, no mínimo, na maior e na menor concentrações das soluções-teste e no controle. Este procedimento será realizado no início e ao final do ensaio.

Para cada diluição e controle, serão preparadas 10 réplicas com aproximadamente 15 mL da solução teste em cada recipiente-teste, com alimento. Será adicionado um organismo-teste por réplica. No caso da determinação da CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado), serão utilizadas, no mínimo, cinco soluções-teste, além do controle. Os organismos serão transferidos de forma aleatória para as soluções-teste com uso de pipetas, evitando a alteração da concentração final. Deve-se ter cuidado ao liberar o



organismo o mais próximo possível da superfície da solução, sem tocá-la. Evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua consequente flutuação.

A exposição será mantida a 23 a 27°C, durante 7 dias, não ultrapassando o oitavo dia, com fotoperíodo de 12-16 h de luz difusa. Os recipientes-teste devem ser cobertos. Recomenda-se utilizar uma faixa de 100 lux a 1.000 lux. A alimentação será diária, evitando deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação (R. subcapitata, $2,0 \times 10^5$ células/mL por organismo). Os detalhes referentes à organização desse ensaio estão expostos no Quadro 9, abaixo.

Quadro 9 – Detalhes referentes à organização do Teste crônico com *Ceriodaphnia* spp.

Duração do teste crônico	7-8 dias
Concentrações - Tratamentos	5 + controle
Réplicas	10
Nº de animais por réplica	1
Total de animais por teste	60 + 30 (TP)
Total de animais por campanha (12 pontos)	1.080
Volume mínimo de meio	15 mL
Volume de amostra a ser usado	150 x 6 = 900 mL
Analisar a CEO, CENO, VC, FT	Dados subletais
Animais do Teste preliminar (TP)	5/tratamento
Duração TP	24 h
Tratamentos TP	6

As soluções-teste serão renovadas diariamente ou no mínimo duas vezes (a cada dois a três dias) com transferência do organismo adulto para aproximadamente 15 mL da solução nova, já com alimento. Nesse momento, será registrado o número de jovens vivos e de organismos adultos sobreviventes em cada recipiente-teste. Oxigênio dissolvido e pH serão determinadas pelo menos na maior e na menor concentrações das soluções-teste e no controle. Este procedimento será realizado nas soluções-teste recém-preparadas e naquelas que devem ser descartadas.

O ensaio terminará após sete dias, sendo possível sua prorrogação até o oitavo dia, caso não se obtenha a média de 15 jovens/adulta no controle. Ao término do ensaio, não serão reutilizados os organismos adultos sobreviventes e os jovens nascidos durante o ensaio. Será utilizado um microscópio estereoscópico na contagem. Algumas características da amostra, como, por exemplo, dureza total, oxigênio dissolvido, pH e material particulado, poderão interferir no resultado do teste. Caso seja necessário evidenciar a influência destas características, um ensaio em paralelo deverá ser realizado, com modificações ou ajustes efetuados na amostra. Valores de oxigênio dissolvido inferiores a 3,0 mg/L e pH fora da faixa de 5,0 a 9,0 poderão interferir no resultado do ensaio.

Os resultados serão considerados válidos se, no término do período de ensaio, atenderem aos seguintes requisitos: a letalidade dos organismos adultos no controle for inferior ou igual a 20%; o número médio de neonatos produzidos por fêmea no controle for igual ou maior que 15. Mantidas essas condições, os resultados serão compilados e expressos em CENO, CEO, VC (Valor Crônico), CEp (Concentrações de Efeito reais ou nominais), FT (Fator de toxicidade) ou de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico) e/ou efeito agudo, referenciando o período de exposição do ensaio.



Para cada réplica, será determinado o número total de neonatos produzidos por fêmea adulta, inclusive daquelas que morreram durante o ensaio, excluindo-se organismos mortos devido manipulação inadequada e machos. Será verificada a existência de diferença significativa entre os dados de sobrevivência dos organismos em cada solução-teste com os do controle de acordo com o número médio obtido no controle.

No caso da determinação da CENO e da CEO, serão excluídas do cálculo estatístico as soluções-teste, onde foi verificado efeito tóxico significativo na sobrevivência dos organismos-teste. Para amostras sujeitas à determinação qualitativa, onde for verificado efeito tóxico significativo na sobrevivência, será desnecessário avaliar o efeito na reprodução. A análise dos dados, será avaliada de acordo com a sobrevivência e reprodução dos organismos, usando a Prova Exata de Fisher (dados de sobrevivência), Teste de Hipótese e Interpolação Linear. Além dos métodos estatísticos propostos, outros podem ser utilizados, se preenchidos os requisitos necessários para sua aplicação. Algumas análises estatísticas são recomendadas e descritas na USEPA (EPA-821-R-02-13 - 2002). A CENO, a CEO e a CEp obtidas estatisticamente serão expressas em porcentagem para amostras líquidas. O valor crônico (VC) será calculado pelos valores da CENO e CEO. Sendo VC, a média geométrica dos valores de CENO e CEO, reais ou nominais.

7.3.6 Análise de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata*

As análises de toxicidade crônica com a alga *Raphidocelis subcapitata* serão realizadas de acordo com a ABNT 12648:2018. O efeito tóxico (ou endpoint) avaliado nesse ensaio durante 72 a 96 horas de exposição das algas às amostras é a inibição de crescimento da biomassa. A coleta das amostras para esse ensaio deve ser realizada em frasco plástico sem entrada ou presença de ar. O armazenamento das amostras pode ser feito em gelo (12 horas), sobre refrigeração (<10° C; 48 horas) ou a partir de congelamento (60 dias). O processamento das amostras após descongelamento deve ser realizado dentro de 12 horas. Caso as amostras contenham alta concentração de material particulado ou turbidez, elas podem ser filtradas (200 – 300 µm) ou submetidas à decantação por 30 min- 2 horas para a remoção dos sólidos.

As amostras serão diluídas em meio de cultura LC Oligo em cinco diluições diferentes. O preparo do inóculo será feito após o cultivo da alga a partir de estoque sólido ressuspenso em meio líquido e mantido por 3-7 dias sob iluminação e agitação até atingir fase exponencial de crescimento. A solução líquida estoque deve ser centrifugada por 15 minutos a 1500 rpm, com descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em 15 mL de meio Oligo C. A contagem de células pode ser feita em microscópio óptico com utilização de câmera de Neubauer após diluição ou por meio de espectrofotômetro para o cálculo da concentração por m³. A densidade algácea de cada ensaio deve ser de cerca de 1 X 10⁵ células.

Após preparo, o inóculo deve ser adicionado aos frascos contendo amostra em diferentes diluições (%) que serão mantidos sob agitação (150 rpm) e iluminação (5000 LUX) em mesa agitadora sobre temperatura regulada de 25 ± 2 °C. O controle positivo será constituído apenas de meio Oligo C e inóculo. Passadas 72 ou 96h, o crescimento das algas será avaliado a partir de contagem das células em microscópio óptico ou em espectrofotômetro. pH, OD, temperatura e condutividade devem ser monitorados ao longo dos ensaios. Os resultados são expressos em relação ao Fator de Toxicidade (FT). Os testes só serão validos caso o



crescimento de algas no controle for equivalente a 16 ou 100 vezes a concentração inicial de algas após 72 e 96 h, respectivamente.

7.3.7 Ensaios de toxicidade aguda com *Danio rerio* (Zebrafish) adulto

As análises de toxicidade com o Zebrafish serão realizadas de acordo com a ABNT 15088:2016. Zebrafish (*Danio rerio*) com comprimento médio de $2,0 \pm 1,0$ cm serão mantidos em aquários de policarbonato cumprindo a relação massa/volume de 1g de organismo/L de água de cultivo. Os parâmetros da água serão controlados com: 23 a 27° C de temperatura do ar e da água, respectivamente, pH entre 6,5 e 7,5, oxigênio dissolvido (OD) médio de 5,0 mg/L- (não inferior a 60% do valor da saturação do ar), dureza entre 10-60 mg de CaCO_3 /L em ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Cada aquário receberá água reconstituída preparada de acordo com especificações da NBR 15088/2016 Os peixes serão alimentados duas vezes por dia com ração comercial para peixes contendo 36% de proteína bruta. Os peixes selecionados para o ensaio estarão livres de qualquer malformação aparente, sem sinais de estresse, sangramento ao longo do corpo, mucosidade excessiva, natação atípica, parasitoses nos 14 dias anteriores à experimentação etc. Peixes doentes e previamente tratados com algum medicamento não serão utilizados nos ensaios.

Após a seleção eles serão transferidos para os aquários -teste e aleatoriamente subdivididos em grupos: (1) controle (água reconstituída – 1L N=10); (2) amostra (várias diluições da amostra em solução de diluição, em intervalos de concentrações seriadas estabelecido em ensaio preliminar, em uma série de cinco subgrupos com razão de diluição entre 1,2 a 2,2- 1L N=10/subgrupo); (3) Controle positivo: substância de referência de acordo com NBR 15088/2015 1L-N=10). Todas as soluções-teste serão aeradas 24 horas antes do ensaio e da renovação das amostras. Quando necessário, o OD e o pH das amostras do efluente serão ajustadas para as condições estabelecidas. Um ensaio paralelo com estas modificações será realizado para comparação.

As amostras do grupo 2 serão fornecidas por agente independente contratado pelo próprio proponente (CHAMADA PÚBLICA INTERNA INDUZIDA Nº 11/2019- Projeto Brumadinho UFMG).

Amostras da água dos aquários de criação/manutenção no biotério, dos aquários- testes, e da reposição das amostras/testes serão coletadas antes da colocação dos peixes e após o término do ensaio toxicológico. Todas elas serão devidamente acondicionadas em tubos de polipropileno ou vidro, devidamente identificados/cadastradas no laboratório e enviados para a caracterização físico-química no Centro de Referência em Análises Ambientais, localizado no Departamento de Química, conforme especificado no Quadro 5. O armazenamento das amostras pode ser feito em gelo (12 horas), sobre refrigeração ($<10^{\circ}\text{C}$; 48 horas) ou a partir de congelamento (60 dias). O processamento das amostras após descongelamento deve ser realizado dentro de 12 horas.

A mortalidade e as alterações comportamentais indicativas de toxicidade serão registradas $2 \pm 0,5$ h, 5 ± 1 h e 24 ± 2 h nas primeiras 24 horas após o início das experimentações (dia 0-1). Nos dias subsequentes os ensaios serão observados 2 vezes ao dia (manhã e ao final da tarde). Os resultados serão plotados em tabelas e gráficos com limites de confiança de 95% em todos os grupos experimentais. Ao final do ensaio será calculado a porcentagem de letalidade em



relação ao controle e a todos os grupos. Os animais que morrerem devido a manipulação inadequada ou eventuais mortes durante o ensaio serão excluídos do cálculo. Os resultados serão expressos em CL₅₀ ou FT. Os resultados serão considerados válidos se a porcentagem de peixes mortos no grupo controle for inferior ou igual a 10% conforme estabelecido pela NBR 15088 (ABNT, 2016). A realização dessas análises está sujeita à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG.

7.3.8 Toxicidade aguda e crônica em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*)

O ensaio será realizado conforme o protocolo descrito na NBR 15499/2015 e baseia-se na avaliação de toxicidade crônica durante 168 horas de exposição, utilizando larvas recém eclodidas de Zebrafish (*Danio rerio*) em amostras das águas superficiais coletadas a montante e a jusante do rompimento da Barragem I da Mina do Córrego Feijão.

As larvas de Zebrafish serão obtidas de casais reprodutores com idade superior a um ano. Os reprodutores serão mantidos em sistema de fluxo com renovação contínua observando a relação massa/volume de 1g de organismo/L de água de cultivo. Os peixes serão mantidos conforme especificações do Anexo B da NBR 15499/2016. Os casais de reprodutores serão transferidos para o aquário de reprodução externo de policarbonato com divisor um dia antes na proporção de 2 machos e 1 fêmea (grupo de reprodução). Durante a noite os peixes reprodutores serão colocados juntos e no dia seguinte serão coletados todos os ovos depositados pelas fêmeas.

Os ovos serão limpos com água do sistema (reconstituída) e acondicionados em placas de petri para seleção em lupa estereoscópica (ampliação ≥ 80 vezes). Os ovos fertilizados serão mantidos em uma incubadora DBO., com ciclo claro-escuro de 14/10 horas. Os parâmetros de qualidade da água dos aquários estão de acordo com o especificado no Anexo B da NBR 15088/2016. Serão utilizados no ensaio somente as larvas (embriões) recém eclodidas, com menos de 24 horas (antes do início da clivagem do blastodisco ou, o mais tardar, na fase de 16 células) que não apresentarem sinais de estresse. As larvas serão aleatoriamente subdivididas em grupos: (1) Controle (solução de diluição) (250 mL /placa, N=10); (2) Amostra: (volume final de 250 mL, contendo várias diluições da amostra em solução diluição, em intervalos de concentrações seriadas estabelecido em ensaio preliminar, em uma série de cinco subgrupos com razão de diluição entre 1,2 a 2,2) N=10/subgrupo); 3) Controle positivo (solução de referência - 250 mL/placa- N=10).

As soluções teste serão renovadas diariamente (6X) ou a cada dois (3X) ou três dias (2X). Antes da renovação das soluções-teste, os organismos mortos serão removidos. Todas as soluções-teste serão aeradas 24 horas antes ao ensaio e a renovação das amostras. Quando necessário, o OD e o pH das amostras do efluente serão ajustadas para as condições estabelecidas. Um ensaio paralelo com estas modificações será realizado para comparação. Os ensaios serão realizados em 4 réplicas.

A mortalidade e o crescimento serão avaliados através de parâmetros indicativos de letalidade (endpoints após 24 e 48 horas e 72 a 114 horas de exposição). A ocorrência de mortalidade, alterações morfológicas e funcionais no embrião serão expressas como porcentagem em cada amostra. Os resultados serão plotados em tabelas e gráficos com limites de confiança de 95% em todos os grupos experimentais e especificamente em relação ao grupo controle (grupo 1).



Os resultados serão expressos como CL₅₀ para letalidade e CE₅₀ para crescimento. As experimentações serão consideradas válidas quando: (a) a sobrevida global de embriões no controle positivo for ≥90% até o final da exposição; (b) a exposição ao controle negativo deve resultar em mortalidade mínima de 30% no final da exposição. Este protocolo será encaminhado ao CEUA para avaliação.

7.3.9 Análises de genotoxicidade e mutagenicidade

Teste de Micronúcleos in vitro (OECD 487)

Os ensaios de genotoxicidade será realizada de acordo com as normas da ABNT, seguindo a ISO 21427-2 (2006). Linhagens celulares V79 serão semeadas em frascos de 25 cm² em quantidade determinada na curva de crescimento juntamente com 5 mL de DMEM e incubadas por 24 horas. Após esse período, adiciona-se o tratamento correspondente à cada garrafa da seguinte forma: um controle negativo, um controle positivo e de três a cinco concentrações da substância-teste. Todos os tratamentos serão realizados com (S9 - ativador metabólico) e sem ativação metabólica. Os frascos serão incubados por 20 horas e depois serão lavados com *phosphate buffered saline* (PBS) para retirada do sobrenadante. Meio DMEM fresco acrescido de citocalasina será adicionado ao frasco e incubado por mais 28 horas. Após esse tempo, todo o material dos frascos será coletado em tubos tipo Falcon, colocado em contato com citrato de sódio gelado, formol e depois será fixado com solução de metanol acético. Três lâminas, ao menos, serão preparadas para cada tratamento. Esse experimento será realizado em triplicata. As lâminas serão coradas com laranja de acridina, observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência em filtro específico. As células serão contadas e lançadas em arquivo para comparação das substâncias testadas com os controles positivo e negativo e também será avaliado o efeito da ativação metabólica sobre as amostras.

Teste de mutação reversa em bactérias (Teste de Ames - OECD 471)

A avaliação da mutagenicidade de amostras de água e resíduos será feita de acordo com a ABNT (ISO 11350:2012), a partir da realização do ensaio de mutação de bactérias. Será utilizado o kit de Ensaio de Mutagenicidade Ames MPF™ 98/100 (contendo as linhagens TA98 e TA100 de *S. Typhimurium*) da Xenometrix. A amostra e as culturas bacterianas (TA98 e TA100) serão colocadas em microplacas de 24 poços com meio mínimo e meio de exposição, com e sem metabolização (S9). Após 90 minutos sob agitação a 37 °C, o conteúdo das microplacas será transferido para microplacas de 384 poços e incubado por 48 horas a 37 °C. Os poços contendo colônias revertentes (que sofreram mutação decorrente da exposição à amostra) se apresentarão com a cor amarela, visto que o crescimento bacteriano provoca mudança de pH do meio, e os poços restantes cor roxa. O aumento do número de poços amarelos em relação às placas controle representará, então, a presença de compostos mutagênicos na amostra avaliada. As amostras serão filtradas em membrana de polietersulfona (PES) com poro de 0,22 µm (Sterifil) e testadas *in natura*.

Nesse teste, as linhagens bacterianas em suspensão serão expostas a 6 diferentes concentrações de cada amostra (curva dose/resposta) em microplacas de 24 poços contendo também meio mínimo e meio de exposição com traços de histidina. Cada concentração será em triplicata, permitindo a análise estatística dos dados. Após pré-incubação de 90 minutos a



37°C e agitação de 250 rpm, a amostra será diluída adicionando-se o meio indicador de pH. A mistura contendo a amostra, as linhagens (com e sem S9) e os diferentes meios serão transferidos para placas de 384 poços com o auxílio de pipetas multicanal. Em seguida, as amostras serão incubadas em estufa a 37°C e o resultado do teste será lido após 48 horas. As colônias revertentes causarão a redução do pH do meio indicador com mudança da sua coloração para amarelo, permitindo sua identificação. Será feita a contagem dessas colônias e a análise dos resultados. O aumento no número de colônias revertentes após exposição da amostra testada em relação ao controle negativo indica a presença de compostos mutagênicos.

7.5. Etapa 4: Análises integrada dos resultados e elaboração de relatórios

Os relatórios mensais serão elaborados com os resultados obtidos para cada ensaio ecotoxicológico realizado para cada amostra. Nesses relatórios serão expostas também as limitações e dificuldades relacionadas à execução das análises.

Ao longo dos 12 meses de projeto (11 meses de coleta e obtenção de resultados) pela equipe proponente e por aquela responsável pela caracterização físico-química das amostras, as equipes trabalharão na confecção de um documento que abrange a síntese de todos os resultados obtidos ao longo do projeto com integração desses e discussão com a literatura vigente.

8. CRONOGRAMA

Etapas	Mês												Indicador de cumprimento	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1 – Formalização do contrato, contratação dos bolsistas e compras	X													- Contrato assinado; - Bolsistas contratados; - Pedidos de compra realizados
2 - Treinamento dos bolsistas	X	X												- Bolsistas treinados de acordo com Normas ABNT;
3 - Realização dos testes ecotoxicológicos		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		- Resultados dos testes realizados; - Dados Analisados;
4 - Elaboração de relatório parcial							X							- Entrega do Relatório parcial
4 – Elaboração de relatório final										X	X	X		- Entrega do Relatório final;
4 – Entrega e Apresentação de relatório final												X		- Apresentação dos resultados



9. DEDICAÇÃO E RESPONSABILIDADES DE CADA PROFESSOR PESQUISADOR

Nome	Dedicação	Atribuição
Camila Costa de Amorim Amaral	6h/semana	a) Responsabilizar-se pela execução das atividades do Subprojeto, b) Responsabilizar-se pela alocação de todos os recursos do projeto. c) Constituir a equipe de execução do Subprojeto d) Coordenar, orientar e supervisionar a equipe do Subprojeto. e) Coordenar, orientar e supervisionar a execução de serviços terceiros contratados pelo Subprojeto. f) Responsabilizar-se pela elaboração de relatórios e apresentação de resultados. g) Responsabilizar-se pelo atendimento das demandas do Comitê Técnico-Científico do Projeto Brumadinho-UFGM e do Juízo.
Maria Clara Vieira Martins Starling	6h/semana	Etapa 1: Comunicação com a agência responsável pela gestão financeira do projeto; supervisão dos processos de compra de consumíveis e equipamentos e andamento da formalização da contratação dos bolsistas; Comunicação com e supervisão dos diferentes pesquisadores e subgrupos. Etapa 2: treinamento dos alunos envolvidos nos ensaios de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i> . Etapa 3: coordenação e supervisão da realização dos ensaios ecotoxicológicos a serem realizados no DESA; acompanhamento dos testes em realização nos laboratórios dos demais parceiros; compilação dos resultados obtidos por todos os pesquisadores envolvidos. Etapa 4: revisão dos relatórios mensais; desenvolvimento do relatório final e prestação de contas.
Carlos Alberto Tagliati	4h/semana	Etapa 1: acompanhamento do processo de compra de consumíveis e equipamentos. Etapa 2: treinamento dos alunos envolvidos nos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> Etapa 4: envio de resultados em relatórios mensais e compilação dos resultados referentes aos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> no relatório final e prestação de contas.
Gilcinéa de Cássia Santana	6 h/semana	Etapa 1: acompanhamento do processo de compra de consumíveis e equipamentos. Etapa 2: treinamento dos alunos envolvidos nos ensaios de toxicidade aguda e crônica em Zebrafish e a toxicidade aguda e crônica em larvas de Zebrafish. Etapa 3: coordenação e supervisão dos alunos responsáveis pelos ensaios com Zebrafish Etapa 4: envio de resultados em relatórios mensais e compilação dos resultados referentes aos ensaios com Zebrafish no relatório final e prestação de contas.
Kleber Campos Miranda Filho	6 h/semana	Etapa 1: Especificação e compra de materiais (consumíveis e permanentes). Etapa 2: Treinamento do bolsista nos ensaios de toxicidade com microcrustáceos. Etapa 3: coordenação e execução do teste de toxicidade crônico com microcrustáceos e cultivo dos animais em laboratório. Etapa 4: Elaboração de relatórios técnicos parciais e final.



10. PLANO DE TRABALHO DOS BOLSISTAS

O prazo de execução das tarefas listadas abaixo para cada bolsista será de 12 meses após a implementação das bolsas.

Nome e nível de Bolsa	Etapa de dedicação	Dedicação semanal	Descrição do trabalho
Técnico Graduado (P6) - Mayra Thais Menezes	2 a 4	30 h	Recebimento e registro das amostras e compras; etiquetagem, cadastramento e acondicionamento dos frascos para caracterização química; limpeza das vidrarias, pesagem de reagentes e preparo de soluções, calibração dos equipamentos, limpeza e descontaminação dos aquários e fômites (baldes, puxas, etc.); responsável pelos cuidados e manuseio dos peixes no laboratório; monitoramento do funcionamento do Rack, auxílio e participação técnica na execução das atividades laborais junto ao bioensaio; gerenciamento do uso e funcionamento dos equipamentos do projeto; gerenciamento do uso de EPIs, preenchimento dos formulários, auxílio na elaboração do relatório final. Participação em reuniões e encontros com o grupo de pesquisa envolvido com ensaio do Zebrafish e com outras equipes do projeto.
Bolsista de Doutorado (D1) – João Paulo Silva Lorenzini - PPG em Zootecnia (UFMG)	1 a 4	15 h	Etapa 1: Auxílio na compra de materiais (consumíveis e permanentes). Etapa 2: Treinamento nos ensaios de toxicidade com microcrustáceos; Etapa 3: lavagem e preparo da vidraria e das soluções, organização do laboratório, controle e supervisão do uso de EPI, cultivo da <i>Ceriodaphnia spp.</i> , organização e limpeza dos aquários de cultivo, controle e manutenção das condições de cultivo (OD, pH, fotoperíodo, temperatura), preparo e diluição das amostras e execução do teste de toxicidade crônico com microcrustáceos. Etapa 4: Elaboração de relatórios técnicos parciais e final.
Bolsista de Pós-Doutorado Júnior (P3) - Beatriz Gasparini Reis	1 a 4	30 h	Etapa 1: Auxílio na compra de materiais (consumíveis e permanentes). Etapa 2: Treinamento do técnico nos ensaios e preparação de materiais de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i> ; Etapa 3: Acompanhamento das coletas de amostras de água superficial nos 12 pontos escolhidos. Recebimento, cadastramento e estoque das amostras a serem utilizadas nos ensaios. Organização do laboratório, controle e supervisão do uso de EPI, controle do estoque de kits de toxicidade, preparação de material e soluções para o teste, execução e interpretação dos resultados dos testes de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i> . Participação em reuniões e encontros com o grupo de pesquisa envolvido, bem como com outras equipes do projeto. Etapa 4: Elaboração de relatórios técnicos parciais e final.
Técnico mestre (P5)- Laboratório de Ensaio Biológicos e CRA	2 a 4	40	Etapa 2: Treinamento nos ensaios e preparação de materiais de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i> ; Treinamento em técnicas de química analítica e preparo de amostras (Centro de Referência em Análises Ambientais da UFMG).



Nome e nível de Bolsa	Etapa de dedicação	Dedicação semanal	Descrição do trabalho
			<p>Etapa 3: organização do laboratório de bioensaios, lavagem e preparação da vidrarias, das soluções e dos materiais, diluição das amostras, cultivo de algas e execução e interpretação dos testes de toxicidade <i>Raphidocelis subcapitata</i>, auxílio na realização dos ensaios com <i>Allivibrio fischeri</i>. Realização das análises físico-químicas após os testes com <i>Danio rerio</i> no Centro de Referência em Análises Ambientais da UFMG.</p> <p>Etapa 4: Elaboração de relatório parcial.</p>
Bolsista de Pós-Doutorado Júnior (P3)- Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas	2 a 4	30	<p>Etapa 2: Treinamento nos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade.</p> <p>Etapa 3: Recebimento das amostras, cadastramento e estocagem em local apropriado. Controle e supervisão do uso de EPI no laboratório. Realização dos testes de Ames e os experimentos de genotoxicidade <i>in vitro</i>, incluindo leitura de lâminas e análise de resultados. Trabalhar em cooperação com o técnico, coordenando as demandas e a realização dos experimentos dentro dos prazos estipulados. Interpretação dos resultados obtidos nos testes. Participação em reuniões e encontros com o grupo de pesquisa envolvido, bem como com outras equipes do projeto.</p> <p>Etapa 4: Elaboração de relatórios técnicos parciais e final.</p>
Técnico Mestre (P5)- Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas	2 a 4	20	<p>Etapa 2: Treinamento nos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade.</p> <p>Etapa 3: Separação, lavagem e preparo de vidrarias para a realização dos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade. Cuidar dos suprimentos e cuidados laboratoriais, preparando meios de cultura, soluções, além de limpeza de bancadas e cuidados com equipamentos. Executar ensaios básicos de cultura celular e bacteriana (viabilidade e citotoxicidade, dentre outros).</p> <p>Etapa 4: Elaboração de relatórios técnicos parciais.</p>

11. ORÇAMENTO: PLANO DE APLICAÇÃO DOS RECURSOS COM CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO

Ressalta-se que o material permanente requerido no orçamento e que será adquirido durante a Etapa 1 do projeto é essencial para a realização dos ensaios ecotoxicológicos considerando o número de amostras a serem processadas durante a realização do presente projeto. Apesar da maior parte dos testes ecotoxicológicos aqui propostos já serem realizados pelos proponentes em laboratórios existentes e equipados na UFMG, a demanda rotineira é reduzida em relação àquela prevista para esse Edital e os equipamentos já existentes atendem a diversos pesquisadores de um mesmo departamento. Além disso, é importante ressaltar que existe uma estrutura instalada considerável que dará suporte para as análises a serem realizadas como já citado no Quadro 8.



ORÇAMENTO DETALHADO E QUADRO DE DESEMBOLSO

MATERIAL DE CONSUMO						MESES/DESEMBOLSO												
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Combustível - gasolina ou Álcool	Combustível para acompanhamento de coleta de amostras (considerou-se 1300 km por campanha de amostragem)	400	R\$ 4,50	R\$ 1.800,00	X			X				X					X
2	Consumíveis a serem utilizados nos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade (Citocalasina B, Citrato de sódio, Formaldeído, Laranja de Acridina, Metil Metano Sulfonato, vidraria (balão volumétrico: 5, 10 e 25 e 1000), CO2, microplaca de 384 poços (Corning®), placas de 24 e 96 poços, volume 50 mL, estéril (Mini biorreator Corning®), Tubos de biorreator TPP® Tube Spin com capacidade de 50 mL, membrana de polietersulfona (PES) com poro de 0,22 µm (Sterifil), meio de cultura (DMEM), antibióticos, soro fetal bovino, ponteiras, meio indicador de pH, garrafas para cultivo celular, phosphate buffered saline (PBS), tubos Falcon, citrato de sódio, metanol acético, lâminas, lamínulas e caixas para lâminas)	Realização das amostras para testes de mutagenicidade e genotoxicidade	1	R\$ 41.540,00	R\$ 41.540,00	X												
3	Consumíveis a serem utilizados no ensaio com Zebrafish (frasco ambar com tampa, pipeta Pasteur, Eppendorf estéril, Tubo Falcon, ponteiras para pipetas automáticas, frasco para coleta de amostra, Parafilm etc)	Consumíveis para condicionamento e processamento de amostras no ensaio com Zebrafish (Danio rerio)	1	R\$ 2.464,00	R\$ 2.464,00	X												



MATERIAL DE CONSUMO						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4	Consumíveis de laboratório e vidrarias para ensaios de <i>Microtox</i> e <i>Raphidocelles subcptata</i> (câmaras Neubauer, cubeta de espectofotômetro, frascos de lavagem de plástico, escovas para limpeza, pipetas pasteur, ponteiras estéreis de volumes variados, tampas de algodão, béqueres, enlemeyers, provetas, balões volumétricos)	Preparação dos meios de cultivo e manuseio e contagem dos organismos durante os ensaios de <i>Microtox</i> e <i>Raphidoceles subcaptata</i>	1	R\$ 4.000,00	R\$ 4.000,00	X											
5	Consumíveis de laboratório para cultivo e ensaios de <i>Ceriodaphnia</i> (câmaras Sedgwick-Rafter, frascos de lavagem de plástico, escovas para limpeza, de mangueira de ar de silicone, Emendas p/ mangueira de ar para aquário, Divisores de ar, pedras porosas, pilhas, bombona graduada com torneira, etc)	Consumíveis de laboratório para cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 2.960,00	R\$ 2.960,00	X											
6	Consumíveis para análises químicas e ecotoxicológicas em geral (Pacotes de tubos falcon , microtubos, ponteiras para micropipetas)	Diluição, manipulação e preparo de amostras	9	R\$ 60,00	R\$ 540,00	X											
7	Equipamentos de proteção individual (luvas, óculos de proteção, máscaras, jalecos, protetor auricular, touca, bota, etc.)	Proteção dos analistas durante as atividades com produtos químicos perigosos e com materiais biológicos	1	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00	X											
8	Frasco de vidro âmbar de aprox. 100 ml	A ser utilizado na conservação de amostras para os ensaios de <i>Microtox</i> ® e <i>Raphicocoles subcaptata</i> .	700	R\$ 10,00	R\$ 7.000,00	X											
9	Gás Argônio alta pureza (99,999%) para ICP-MS para análises de detecção de metais. Cilindro 10m3	Análises das amostras de peixe por ICP-MS	3	R\$ 500,00	R\$ 1.500,00	X											
10	Kit de toxicidade <i>Microtox</i> caixa com 10 ampolas	Frascos contendo <i>Allivibrio fischeri</i> liofilizada para ensaios <i>Microtox</i>	2	R\$ 3.725,00	R\$ 7.450,00	X											



MATERIAL DE CONSUMO						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
11	Kits Ames: A10-210-S2-P - Lyophilized rat liver S9, Phenobarbital/ β -Naphthoflavone induced; PC-0800 - 20 ml S9-Buffer-Salts, 0.9 ml S9-G-6-P, 3.5 ml S9-NADP Fabricante: Xenometrix	O teste de Ames é extremamente trabalhoso e envolve diversas etapas em seu processo de realização. O uso dos kits, além de permitir a realização do teste de forma mais dinâmica, gera maior confiabilidade nos resultados por se tratar de produtos de alta performance. Somado a isso, os mesmos são validados e utilizados por diversos laboratórios internacionais para análise de amostras como a água	5	R\$ 21.734,28	R\$ 108.671,40	X											
12	Kits para medição da qualidade da água (compostos nitrogenados, dureza, alcalinidade, etc) do cultivo e dos ensaios toxicológicos com <i>Ceriodaphnia</i>	Monitoramento da qualidade da água dos cultivos e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 1.360,00	R\$ 1.360,00	X											
13	Kit para medição de cloro livre e cloro total (pct 100 unid)	Monitoramento da qualidade da água após os ensaios com <i>Danio rerio</i>	4	R\$ 450,00	R\$ 1.800,00	X											
14	Material de escritório e serviços de impressão (canetas, lápis, papel sulfite, tonner e cartucho de impressora, etc)	Itens de consumo para detalhamento dos dados obtidos, confecção de relatórios, etc	1	R\$ 2.010,00	R\$ 2.010,00	X											
15	Microcústáceo Artêmia salina liofilizado. Frasco 100g	Alimentação dos alevinos de Zebrafish	10	R\$ 8,00	R\$ 80,00	X											
16	Padrão analítico multielementar para ICP-MS contendo Al, As, B, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Ti, V e Zn, com certificado que atenda a ISO 17025 - 100 mL	Preparo de curvas de calibração do ICP-MS para quantificação de metais e metalóides	1	R\$ 1.486,00	R\$ 1.486,00	X											



MATERIAL DE CONSUMO						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
17	Padrões analíticos para medição de Condutividade 1412 µS/cm +/- 0,5% à 25°C+/-0,2°C. 1 Litro	Calibração de sonda para quantificação de condutividade nas análises com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 155,00	R\$ 155,00	X											
18	Pasta de microalga (em pó ou pasta) 1 kg	Microalga para alimentação de <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 220,00	R\$ 220,00	X											
19	Pipetas automáticas monocanal e multicanal de volumes variados	para realização de diluições seriadas para ensaios de <i>Microtox</i> e <i>Raphidoceles subcaptata</i>	4	R\$ 2.500,00	R\$ 10.000,00	X											
20	Pipetas automáticas monocanal e multicanal de volumes variados	para realização de diluições seriadas para ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade	2	R\$ 2.500,00	R\$ 5.000,00	X											
21	Reagentes padrão analítico para cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i> (ác. nítrico, ác. clorídrico, acetona, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de cálcio di-hidratado, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, sulfato de magnésio heptahidratado, Tiosulfato de Sódio, etc.)	Reagentes para cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00	X											
22	Reagentes químicos para ensaios com Zebrafish (Ácido nítrico, ácido clorídrico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, etc.)	Reagentes utilizado no processamento amostras para ensaio com Zebrafish	1	R\$ 2.800,00	R\$ 2.800,00	X											
23	Reagentes para <i>Microtox</i> e Ensaio com <i>Raphidoceles subcaptata</i> (NaCl de alta pureza, Sulfato de Zinco de alta pureza, soluções de diluição, ajuste osmótico e reconstituição, reagentes do meio de cultura LC Oligo, ácido nítrico)	Resuspensão da bactéria, cultivo de algas, diluição das amostras e testes com substância de referência, lavagem de frascos,	1	R\$ 4.000,00	R\$ 4.000,00	X											



MATERIAL DE CONSUMO						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
24	Repipetador Multicanal	para realização de diluições seriadas para ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade. melhora a qualidade de pipetagem e diminui o erro	1	R\$ 9.500,00	R\$ 9.500,00	X											
25	Soluções padrão para calibração (pH 4,00, pH 7,00 e Condutividade)	Solução de calibração de sonda multiparâmetros	1	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00	X											
26	Tanque para reprodução externo de Zebrafish em policarbonato transparente.	Aquário necessário para obtenção dos embriões de Zebrafish	4	R\$ 200,00	R\$ 800,00	X											
27	Tubo tipo falcon graduado e estéril (volume variado).Caixa com 100 unid	Consumível a ser utilizado nos ensaios de toxicidade com Raphidoceles subcaptata e Microtox	40	R\$ 50,00	R\$ 2.000,00	X											
28	Vidraria laboratorial para estudo com <i>Ceriodaphnia</i> (béqueres, provetas, vidro relógio, pipetas graduadas de vidro, balão volumétrico, etc)	Vidraria laboratorial para cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 3.720,00	R\$ 3.720,00	X											
29	Vidrarías laboratoriais para ensaio com Zebrafish (balões volumétricos, béqueres, provetas, placas de petri, funil de decantação, placa de vidro de cristalização, placas de vidro de relógio, etc)	Medição e diluição de amostras e preparo soluções, Placa para cultivo dos embriões	1	R\$ 5.750,00	R\$ 5.750,00	X											
30	Vidrarías laboratoriais para análises físico-químicas	Realização de análises físico-químicas	1	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00	X											
SUB-TOTAL MATERIAL DE CONSUMO					R\$ 244.006,40												



MATERIAL PERMANENTE						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Analizador Microtox LX Analyzer com computador acoplado (Windows 10), controle de temperatura -1 a 5º C, 110-240V, 200 watts	Leitora de toxicidade para o ensaio de microtox	1	R\$ 136.800,00	R\$136.800,00	X											
2	Ar condicionado Split Hi Wall 9000Btus frio e 12000 Btus 220v	Climatização de ambiente em sala de embriões, e sala para manutenção dos Racks de cultivo Zebrafish	1	R\$ 2.000,00	R\$2.000,00	X											
3	Balança analítica (precisão 0,001) 600g x 0,001g	Pesagem de reagentes para cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 8.400,00	R\$8.400,00	X											
4	Câmara de germinação com fotoperíodo e controle de temperatura	Incubação de larvas-teste no ensaio com Zebrafish e para obtenção dos peixes adultos	1	R\$ 6.500,00	R\$6.500,00	X											
5	Centrífuga angular, capacidade para 12 tubos (15 mL), 4000 RPM, BIVOLT	Necessário pra realização dos ensaios de toxicidade com algas	1	R\$ 5.000,00	R\$5.000,00	X											
6	Compressores de ar eletromagnéticos	Geração de ar para os ambientes de cultivo de <i>Ceriodaphnia</i>	2	R\$ 560,00	R\$1.120,00	X											
7	Contador de Células (Contador de Células Automático SMART, mod.: 6749 - Marca Corning):	Equipamento automatizado que substitui análise visual eliminando o erro humano na contagem de células que é de difícil acertabilidade e reprodutibilidade	1	R\$ 35.000,00	R\$35.000,00	X											
8	Destilador de água (tipo pilsen) em aço inox com vasão de 10l/h 220v	Obtenção de água para diluição das amostras em ensaio com Zebrafish e preparo de soluções	1	R\$ 2.500,00	R\$2.500,00	X											
9	Estufa Híbrida Bacteriológica, capacidade para 40L	Cultivo de microrganismos para cultivo de algas	1	R\$ 4.200,00	R\$4.200,00	X											



MATERIAL PERMANENTE						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10	Geladeira Duplex, frost free, capacidade para 384 L ou superior, duas portas, 127 V	Conservação de amostras	2	R\$ 2.500,00	R\$5.000,00	X											
11	Incubadora de DBO, com controle de temperatura e fotoperíodo, capacidade de 340 L, 110v, Modelo: CE-300/350-FA - Marca: CIENLAB	Incubadora para manter o ambiente controlado para o cultivo e realização dos testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia</i>	3	R\$ 6.720,00	R\$20.160,00	X											
12	Incubadora shaker com inversor de frequência e controle de temperatura, capacidade de até 34 frascos de 25 ml ou 50 ml; ou 20 frascos de 125 ou 250 ml; ou 10 frascos de 500 ml ou 6 frascos de 1.000 ml ou plataforma mista, temperatura de operação de 5 a 60o C, 240 RPM, BIVOLT	Realização de ensaios de toxicidade com <i>Raphidoceles subcapitata</i>	1	R\$ 13.600,00	R\$13.600,00	X											
13	Leitor de microplacas multimodal Varioskan LUX	Utilizado na quantificação da absorbância e, por consequência, da viabilidade celular. Essa, por sua vez, é imprescindível na avaliação da toxicidade in vitro das substâncias analisadas. Esse equipamento permite obtenção de alta qualidade de análise com resultados robustos, garantindo confiabilidade e reprodutibilidade nas análises realizadas	1	R\$ 45.000,00	R\$45.000,00	X											



MATERIAL PERMANENTE						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	Lupa estereoscópica trinocular com sistema Zoom 1 – 8,0x, base plana para iluminação episcópica, Tubo binocular giratório inclinado a 20 graus, objetivas Plan 1x Iluminação LED (Equivalente a 6v30w halogênio);Par oculares 10x com campo 22mm, Tensão de alimentação 110V.com sistema de captura de imagens e video MOTICAM: Câmera digital para microscopia com sensor CMOS e interface C-MOUNT; Resolução de 8 Mb para captura através do cartão SD e 1080p através da saída HDMI;Lente focalizável para macro vídeo/fotografia; Adaptadores de 30 e 38mm para oculares;Lâmina de calibração com quatro pontos;Cabo de conexão mini USB;	Avaliação dos embriões e larvas de Zebrafish	1	R\$ 49.000,00	R\$49.000,00	X											
15	Medidor multiparâmetro pH/Cond/OD + soluções calibração	Avaliação da qualidade da água de cultivo em ensaios com Zebrafish	1	R\$ 3.500,00	R\$3.500,00	X											
16	Medidor portátil de pH, condutividade, TDS e temperatura (HANNA modelo HI 98129)	Monitoramento da qualidade da água de cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	3	R\$ 1.120,00	R\$3.360,00	X											
17	Microcópico confocal, binocular ângulo de 30 graus com iluminação LED200, ponto de visão giratório 180 graus, revolver investido de 4 posições, incluso objetivas de aumento de 4, 10, 40 e 100 x.	Contagem de células de <i>Raphidoceles subcaptata</i>	1	R\$ 50.000,00	R\$50.000,00	X											
18	Nobreaak para Rack, 3000 VA	Garantir o funcionamento do Rack de criação do Zebrafish em caso de ausência de luz	1	R\$ 6.000,00	R\$6.000,00	X											



MATERIAL PERMANENTE						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19	Oxímetro - Sensor polarográfico, 4m de cabo, OD% 0 - 500%; OD mg/L 0 - 50; Temperatura (-)5 até 45°C	Monitoramento da qualidade da água de cultivo e ensaios com <i>Ceriodaphnia</i>	1	R\$ 14.500,00	R\$14.500,00	X											
20	pHmetro	Medição de pH nos testes de mutagenicidade e genotoxicidade	1	R\$ 4.000,00	R\$4.000,00	X											
21	Rack completo em aço inoxidável com 55 aquários (5 aquários de 10L; 30 aquários de 3L e 20 aquários de 1,5L) em policarbonato e sistema de osmose reversa e filtragem (filtro químico com carvão ativado, filtro biológico , filtro grosso lavavel e filtro mecanico lavavel e sistemade descontaminação da água UV) para criação de Zebrafish. Inclui sistema de controle automatizado pH, temperatura, OD e condutividade; alarme de nivel de reservatório, controle de troca de agua automatizado. Voltagem 220V proposta Inclui aquarios avulsos para troca	Criação e manutenção do Zebrafish conforme parametros de qualidade especificadas pelo CONCEA e ABNTs	1	R\$ 120.000,00	R\$120.000,00	X											
22	Termostato com aquecedor (50 a 500w) 110 e 220v	Controle da temperatura dos ambientes de cultivo de <i>Ceriodaphnia</i> , e monitormento de temperatura dos aquarios testes	9	R\$ 110,00	R\$990,00	X											
SUB-TOTAL MATERIAL PERMANENTE					R\$536.630,00												



SOFTWARE						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Licença de software Danio Scope	Software necessário para avaliação e registro de parâmetros de desenvolvimento de embriões e larvas de peixe-zebra, (atividade embrionária, medidas cardiovasculares e morfologia, etc)	1	R\$ 22.750,00	R\$22.750,00	X											
SUB-TOTAL SOFTWARES					R\$22.750,00												
DESPESAS DE IMPORTAÇÃO						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Estimativa	Valor dos itens a serem importados (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	DESPESAS ACESSÓRIAS DE IMPORTAÇÃO	Pagamento de frete, despesas aduaneiras, desembaraço internacional, etc para importação de equipamentos e softwares como: equipamento Microtox, medidor multiparâmetros, software)	20%	R\$162.910,00	R\$32.582,00	X											
SUB-TOTAL DESPESAS DE IMPORTAÇÃO					R\$32.582,00												



SERVIÇOS DE TERCEIROS						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Manutenção e reparo de equipamentos	Eventuais reparos de equipamentos que estão sendo utilizados no projeto	1	R\$ 30.000,00	R\$ 30.000,00	X											
2	Montagem de estruturas	Adaptação e proteção do espaço para instalação dos equipamentos e ensaios.	1	R\$ 20.000,00	R\$ 20.000,00	X											
3	Serviços de aquisição de imagens microscópicas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG - Centro de Microscopia	Utilização de microscópio de fluorescência para leitura das lâminas no teste de Micronúcleos in vitro	1	R\$ 13.510,00	R\$ 13.510,00	X											
4	Calibração de equipamentos, vidrarias e aparatos instrumentais	Garantir a confiabilidade dos resultados	1	R\$ 6.300,00	R\$ 6.300,00	X											
5	Aluguel de veículos	Aluguel de veículo para acompanhamento da coleta das amostras - Veículo intermediário, motor acima 1.4 (Tipo Logan, Voayge, FordKa, Hb20, etc). Acompanhamento de coleta de amostras nos 12 pontos selecionados. Considerou-se 5 dias para coleta de amostras na região de Brumadinho (pontos MC9, MC10, F1, F3, F6, P1, P5, P9, P10, P13, P14). No ponto P20 devido a distância (aprox. 150km) considerou-se 2 dias por campanha de coleta.	28	R\$ 101,60	R\$ 2.844,80	X			X				X				X
SUB-TOTAL SERVIÇOS DE TERCEIROS					R\$72.654,80												



BOLSAS						MESES/DESEMBOLSO											
Nº	Categoria	Nome	C.H. semanal	Valor da Bolsa	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Professor pesquisador (P2)	Camila Costa de Amorim Amaral	6	R\$7.030,08	R\$ 84.360,96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Professor pesquisador (P2)	Maria Clara Vieira Martins Starling	6	R\$7.030,08	R\$ 84.360,96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	Professor pesquisador (P2)	Carlos Alberto Tagliati	4	R\$4.686,72	R\$ 56.240,64	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	Professor pesquisador (P2)	Gilcinéia de Cassia Santana	6	R\$7.030,08	R\$ 84.360,96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	Professor pesquisador (P2)	Kleber Campos Miranda Filho	6	R\$7.030,08	R\$ 84.360,96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	Pós-Doutorado Júnior (P4)	a ser selecionado	30	R\$6.290,06	R\$ 75.480,75	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	Pós-Doutorado Júnior (P4)	Beatriz Gasparini Reis	30	R\$6.290,06	R\$ 75.480,75	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	Técnico Mestre (P5)	a ser selecionado	20	R\$3.946,71	R\$ 47.360,52	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	Técnico Mestre (P5)	a ser selecionado	40	R\$7.893,42	R\$ 94.721,04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	Técnico Graduado (P6)	Mayra Thais Menezes	30	R\$5.550,06	R\$ 66.600,72	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	Bolsista Estudante de Doutorado (D1)	João Paulo Silva Lorenzini	15	R\$4.736,10	R\$ 56.833,20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SUB-TOTAL BOLSAS					R\$810.161,46												



PASSAGENS E DIÁRIAS						MESES/DESEMBOLSO												
Nº	Descrição do item	Finalidade/Justificativa	Quant.	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Diárias	Diárias para acompanhamento de coleta de amostras nos pontos 12 pontos selecionados. Considerou-se 5 diárias para coleta de amostras na região de Brumadinho (pontos MC9, MC10, F1, F3, F6, P1, P5, P9, P10, P13, P14). No ponto P20 devido a distância (aprox. 150km) previu-se 2 diárias por campanha de coleta.	28	R\$ 177,00	R\$ 4.956,00	X			X				X					X
SUB-TOTAL PASSAGENS E DIÁRIAS					R\$4.956,00													
SUB-TOTAL GERAL					R\$1.723.740,66													
TAXAS RESOLUÇÃO 10/95 - UNIDADE (10%)					R\$195.879,62													
TAXAS RESOLUÇÃO 10/95 - UFMG (2%)					R\$39.175,92													
TOTAL GERAL COM AS TAXAS					R\$1.958.796,20													



12.REFERÊNCIAS

- ABNT. ABNT NBR 15411-3:2012: Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Brasil, 2012.
- ABNT. ABNT NBR 12713:2016 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Brasil, 2016a.
- ABNT. ABNT 15088:2016 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Brasil, 2016b.
- ABNT. ABNT 15499:2015 - Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com peixes. Brasil, 2016b.
- ABNT 11350:2012. Qualidade da água -- Determinação da genotoxicidade da água e efluentes - - Método com *Salmonella*/Teste de flutuação em microcosmo (Ames fluctuation test). Brasil 2012.
- ISO 21427-2:2006. Water quality — Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei — Part 2: Mixed population method using the cell line V79. ISO, 2006.
- ADAMS, S. M.; GREELEY, M. S. Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 123, n. 1–4, p. 103–115, 2000.
- ARAUJO, S. F. et al. Versatility of iron-rich steel waste for the removal of high arsenic and sulfate concentrations in water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 5, p. 4266–4276, 2019.
- ASMUS M., MULLANDERS, L H; HARTWIG, A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. **Carcinogenesis**, 21, 2097–2104, 2000.
- BADERNA, D.; CALONI, F.; BENFENATI, E. Investigating landfill leachate toxicity in vitro: A review of cell models and endpoints. **Environment International**, v. 122, n. November 2018, p. 21–30, 2019.
- BOGER, B. et al. Micro-poluente emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil – Uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 725–739, 2016.
- BOTTINO, F. et al. Influence of the residue from an iron mining dam in the growth of two macrophyte species. **Chemosphere**, v. 186, p. 488–494, 2017.
- BRASIL. Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9433.htm. Acessado em Agosto de 2019.
- BRASIL. 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. Conselho Nacional do meio Ambiente, Brasília, DF. Acesso em 09/08/2019. URL: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.
- BRASIL. RESOLUÇÃO No 430, DE 13 DE MAIO DE 2011 - Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Conselho Nacional do meio



CETESB. Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo. São Paulo, SP, Governo do Estado de São Paulo, Secretária do Meio Ambiente, 2017.

CHEN G, WHITE PA. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. v. 567(2-3), p. 151-225, 2004.

FERNANDES, G. W. et al. Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. **Natureza e Conservação**, v. 14, n. 2, p. 35–45, 2016.

FRAZIER, J. M. In vitro models for toxicological research and testing. **Toxicology Letters**, v. 68, n. 1–2, p. 73–90, 1993.

GOODSON, W. H.; LOWE, L.; CARPENTER, D. O.; GILBERTSON, M.; MANAF ALI, A.; LOPEZ DE CERAIN SALSAMENDI, A.; LASFAR, A.; CARNERO, A.; AZQUETA, A.; AMEDEI, A.; CHARLES, A. K.; COLLINS, A. R.; WARD, A.; SALZBERG, A. C.; COLACCI, A.; OLSEN, A. K.; BERG, A.; BARCLAY, B. J.; ZHOU, B. P.; BLANCO-APARICIO, HU, Z.. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. **Carcinogenesis**, v. 36(Suppl 1),p S254–S296, 2015.

HARTWIG, A.; ASMUSS, M.; EHLEBEN, I.; HERZER, U.; KOSTELAC, D.; PELZER, A.; SCHWERDTLE, T.; BÜRKLE, A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ. Health Perspect.*, v. 110(Suppl 5), p. 797–799, 2002.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Acute selenium selenite exposure effects on oxidative stress biomarkers and essential metals and trace-elements in the model organism zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 33, p. 68–72, 2016.

IGAM. Resumo Executivo Anual - Avaliação da qualidade das águas superficiais de Minas Gerais em 2017: resumo executivo anual / Instituto Mineiro de Gestão das Águas.--- Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Gestão das Águas, 189 p., 2018.

IGAM. Resumo Executivo Anual - Avaliação da qualidade das águas superficiais de Minas Gerais em 2018: resumo executivo anual / Instituto Mineiro de Gestão das Águas.--- Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Gestão das Águas, 189 p., 2019.

ISO. ISO 11348-3:2007 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria, 2007.

ISO. ISO 6341:2012 - Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test, 2012.

KONDURACKA, E. A link between environmental pollution and civilization disorders: A mini review. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, n. 3, p. 227–233, 2019.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. a Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008.

MARTINEZ-HARO, M. et al. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: What might be the added value of their combination? **Ecological Indicators**, v. 48, p. 8–16, 2015.

MATOS, M. DE F. A Ecotoxicologia como ferramenta para o monitoramento e perícia ambiental em áreas de mineração. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.



MELETTI, P. C. Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. 2003. Tese de Doutorado. 231f. Universidade de São Paulo.

MG. COPAM CERH 01 de 2008 - 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. . 2008.

MICHAEL-KORDATOU, I.; KARAOLIA, P.; FATTA-KASSINOS, D. The role of operating parameters and oxidative damage mechanisms of advanced chemical oxidation processes in the combat against antibiotic-resistant bacteria and resistance genes present in urban wastewater. **Water Research**, v. 129, p. 208–230, 2018.

OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: 471, Bacterial Reverse Mutation Test. **Organisation for Economic Co-operation and Development publishing**, n. July, p. 11, 1997.

OCDE. Organisation for Economic Cooperation and Development. Test Guideline No. 236- Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. .

OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: 487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. **Organisation for Economic Co-operation and Development publishing**, n. July, p. 29, 2016.

OCDE. Organisation for Economic Cooperation and Development. Test Guideline No. 203- Fish, Acute Toxicity Testing. 2019. .

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 5, 2016.

QUADRA, G. R. et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753–757, 2019.

RENIERI, E. A.; SFAKIANAKIS, D. G.; ALEGAKIS, A. A.; SAFENKOVA, I. V.; BUHA, A.; MATOVIĆ, V.; TZARDI, M.; DZANTIEV, B. B.; DIVANACH P.; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A. M. Nonlinear responses to waterborne cadmium exposure in zebrafish. An in vivo study. **Environmental Research**, v. 157, p. 173–181, 2017.

SARTORI, É. et al. Uso da ABNT NBR 15088/2011 para avaliação da toxicidade da água do rio Doce e do potencial de acumulação de metais em peixes. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, 2016.

SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813–825, 2016.

SERRANO, A. F. et al. Geomorfológicos Impactados Pelo Rompimento Da Barragem De Fundão Em Mariana (Mg) Toxicity of Distinct Geomorphic Compartments Impacted By the Breaking of the Fundão Dam in Mariana (Mg). p. 1–5, 2018.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, n. October 2017, p. 17–36, 2019.

THOMPSON, F. et al. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135914, 2020.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. 1. ed. [s.l.] Oficina de Textos, 2008.



UE, U. E. DIRECTIVE 2000/60/EC - Establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Community, 2000

UMBUZEIRO G A; HERINGA M, ZEIGER E. In Vitro Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring. Livro: Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. v. 157, p. 59-80, 2017.

USEPA. Technical support document for water quality-based toxics control. Washington, 1991.

VON SPERLING, M. **Estudos e modelagem da qualidade da água de rios**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2007.

WERNERSSON, A. S. et al. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2015.

ZARCO-FERNÁNDEZ, S.; GARCÍA-GARCÍA, A.; SANZ-LANDALUZE, J.; PECHEYRAN, C; MUÑOZ-OLIVAS; R. In vivo bioconcentration of a metal mixture by Danio rerio Eleutheroembryos. **Chemosphere**, v. 196, p. 87-94, 2018.



**ATA DA REUNIÃO
DE JULGAMENTO DE
RECURSO E
RESULTADO FINAL**



**ATA DA REUNIÃO DE JULGAMENTO DOS RECURSOS DA CHAMADA 15/2019 NO DIA
08.06.2020**

No dia 8 de junho de 2020, às 16h30 horas, reuniram-se virtualmente os membros do Comitê Técnico-Científico do “Projeto Brumadinho-UFMG”, Claudia Mayorga, Fabiano Teodoro Lara, Ricardo Machado Ruiz, Adriana Monteiro da Costa, Carlos Augusto Gomes Leal, Claudia Carvalhinho Windmüller, Efigênia Ferreira e Gustavo Ferreira Simões e o Secretário Executivo do “Projeto Brumadinho-UFMG”, Tiago Barros Duarte. A divulgação do resultado preliminar da Chamada 15/2019 ocorreu no dia 1 de junho, tendo sido informado à Professora Camila Amorim a APROVAÇÃO COM AJUSTES do Subprojeto. A proponente não interpôs recursos contra as recomendações do Comitê, enviando novo Subprojeto com atendimento aos ajustes sugeridos. A proposta foi reexaminada e decidiu-se, por unanimidade, por sua APROVAÇÃO PARA RECOMENDAÇÃO. Sendo assim, o Comitê Técnico-Científico requererá a divulgação do RESULTADO FINAL na forma prevista na Chamada 15/2019. Encerrou-se a reunião às 17h30. Eu, Tiago Barros Duarte, Secretário-Executivo do Comitê Técnico-Científico do “Projeto Brumadinho-UFMG” lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais. Belo Horizonte, 8 de junho de 2020.

Fabiano Teodoro Lara

Claudia Mayorga

Ricardo Machado Ruiz

Adriana Monteiro da Costa

Carlos Augusto Gomes Leal

Claudia Carvalhinho Windmüller

Gustavo Ferreira Simões

Efigênia Ferreira

Tiago Barros Duarte



CHAMADA PÚBLICA INTERNA INDUZIDA N. 15/2019

ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICO EM ÁGUA SUPERFICIAL

Resultado Final

Proponente	Unidade	Resultado
Camila Amorim	Escola de Engenharia	Proposta aprovada





PROPOSTA DE PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS

Fundep 328359

Projeto Brumadinho – Chamada 15
Subprojeto: “ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL”

UFMG
Escola de Engenharia

Coordenação: Profa. Camila Amorim

Junho 2020



Sumário

PROPOSTA DE PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS	1
1. DADOS CADASTRAIS	3
2. HISTÓRICO	4
3. DESCRIÇÃO DA PROPOSTA	7
3.1. Objeto	7
3.2. Justificativa	7
3.3. Detalhamento dos Serviços	7
4. RESPONSABILIDADE TÉCNICA	9
5. VALOR DA PROPOSTA	9
6. PRAZO DE EXECUÇÃO	9
7. APROVAÇÃO DA PROPOSTA	9
8. VALIDADE DA PROPOSTA	9



1. DADOS CADASTRAIS

Denominação

Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa – Fundep

Endereço

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – Pampulha Cep 31 270-901
– Caixa Postal 6990 - Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409.6572

E-mail: novosprojetos@fundep.ufmg.br

Home page: <http://www.fundep.ufmg.br>

Dirigente

Prof. Alfredo Gontijo de Oliveira – Presidente

Constituição

A Fundep é uma entidade de direito privado, sem fins lucrativos, com sede e foro na cidade de Belo Horizonte. Foi instituída por escritura pública em 28 de fevereiro de 1975, no Cartório do 1º Ofício de Notas (Tabelião Ferraz), à folha 01 do livro 325 B, devidamente aprovada pela Curadoria de Fundações (Ministério Público) em 30 de janeiro de 1975. Registrada no Cadastro Nacional da Pessoas Jurídica, sob o número 18.720.938/0001-41 e com registro no Cartório Jero Oliva, no Livro A 42, Folhas 83v., sob o número de ordem 29.218, em 13 de fevereiro de 1975.

Declarada de “Utilidade Pública” pela Lei nº 7.075, do Governo do Estado de Minas Gerais, de 28.09.77 e pela Lei nº 2.958, da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, rege-se pelas normas de seu estatuto.



2. HISTÓRICO

Na década de setenta, professores da Universidade Federal de Minas Gerais empenharam-se, com êxito, na constituição de uma fundação de apoio para as atividades acadêmicas de pesquisa, extensão e de desenvolvimento tecnológico. Fazia-se necessária a criação de um instrumento ágil, dotado de estrutura operacional especializada e adequada às necessidades de captação e gestão dos projetos da Universidade.

A Fundep – Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa – foi então criada no dia 29 de novembro de 1974, por aprovação do Conselho Universitário da UFMG, como entidade de direito privado, com personalidade jurídica própria e autonomia financeira e administrativa.

Em sua relação com o ambiente externo, as IFES (Instituição Federal de Ensino Superior) e ICTs (Institutos de Ciência e Tecnologia) tanto podem atuar em projetos próprios quanto participar conjuntamente de projetos com outros órgãos e entidades, e ainda, prestar serviços.

A Fundep, neste contexto e amparada pela Lei Federal 8.958/94 e seus decretos, cumpre funções específicas, complementares àquelas da UFMG e demais apoiadas, especializando-se no conhecimento de políticas de atuação e procedimentos das agências de financiamento e fomento, zelando para que os projetos contemplem os objetivos de todos os partícipes e atuando como gestora administrativo-financeira das atividades acadêmicas de pesquisa, ensino, extensão e desenvolvimento tecnológico da UFMG e de vários outros Institutos e Centros de Pesquisa.

Em decorrência de sua experiência e excelência reconhecida como gestora de Projetos da UFMG em cumprimento à sua finalidade estatutária de cooperar com outras instituições nos campos da ciência, pesquisa e cultura em geral, em conformidade com a Portaria Interministerial 191 de 2012, a Fundep hoje tem autorização do MEC/MCTI e atua como Fundação de Apoio das seguintes instituições:

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

AMAZUL - Amazônia Azul Tecnologias de Defesa

CETEM - Centro de Tecnologia Espacial

CETENE - Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais - Serviço Geológico do Brasil

EBSERH/UFRN - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares na Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UNIFAL - Fundação de apoio à Universidade Federal de Alfenas

EBSERH/HC UFMG - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HUMAP-UFMS-EBSERH - Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian

IBICT - Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IAE - Instituto de Aeronáutica e Espaço

IEAv - Instituto de Estudos Avançados

IFI - Instituto de Fomento e Coordenação Industrial

IFMG - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais



INCA - Instituto Nacional de Câncer
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
INT - Instituto Nacional de Tecnologia
INSA - Instituto Nacional do Semiárido
ITA - Instituto Tecnológico de Aeronáutica
LNA - Laboratório Nacional de Astrofísica
MPEG - Museu Paraense Emílio Goeldi
NIT-MB - Núcleo de Inovação Tecnológica da Marinha do Brasil
ON - Observatório Nacional
UNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Americana
UFAL - Universidade Federal de Alagoas
UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto
UFSM - Universidade Federal de Santa Maria
UFABC - Universidade Federal do ABC

QUALIFICAÇÃO FUNDEP

Com uma estrutura operacional altamente especializada, a Fundep atua como gestora administrativo-financeira das atividades acadêmicas de pesquisa, ensino, extensão e desenvolvimento tecnológico da UFMG e demais Centros de Pesquisa, além de prestar serviços a órgãos públicos e privados, e realizar concursos públicos.

Através de sua expertise em gestão administrativa e financeira de projetos a FUNDEP vem contribuindo para o desenvolvimento da sociedade tanto no setor público quanto no setor privado, priorizando a busca do conhecimento dentro da UFMG e a transferência do mesmo para o mercado.

A Fundação também atua como interface entre as organizações públicas e privadas, nas negociações e nas contratações de projetos, buscando tecnologias e inovações dentro das Universidades e/ou por meio de parcerias.

Entre 2014 e 2017 foram mais de 1,2 bilhões de reais movimentados em projetos de ensino, pesquisa e extensão, sendo tudo isso possível a partir de uma estrutura robusta, qualificada e tecnologicamente avançada, onde as demandas administrativas e operacionais do projeto são realizadas através de um sistema on-line, disponível 24 horas por dia e acessível de qualquer parte do mundo, seja através do computador, tablete ou smartphone.

Possuímos um portal de compras próprio, garantindo economia e agilidade nas aquisições.

A Fundep disponibiliza serviço de importação especializado sendo credenciada junto ao CNPq, no âmbito da Lei Federal n.º 8.010/90, para efetuar importação de equipamentos e materiais destinados à pesquisa científica e tecnológica, com isenção de tributos, sendo a segunda maior importadora do Estado de Minas Gerais em volume de recursos e a primeira em número de itens importados.



A Fundação é gestora do Embrapii DCC e INT e operadora do Sibratec Redes de Centros de Inovação em Nanomateriais, Nanocompósitos e em Nanodispositivos e Nanosensores.

Ao apoiar os parceiros na busca pela inovação, realizando uma eficiente gestão dos projetos de pesquisa, inovação, ensino e extensão, a Fundep se revela uma importante agente no processo de PD&I no Brasil.

Nosso relatório de atividades está disponível em nossa página na Internet.

Estrutura de Governança

O corpo gestor da Fundep é composto pelos conselhos Fiscal, Curador e Diretor, sendo presidida pelo Presidente do Conselho Diretor, o Prof. Dr. Alfredo Gontijo de Oliveira. Por exigência estatutária, as demonstrações contábeis da Fundep são auditadas regularmente. Atualmente a empresa de Auditoria contratada é a Fernando Motta e Associados. Além da empresa de auditoria, a Fundep tem as contas analisadas pelos seus Conselhos Curador e Fiscal, bem como pelo Conselho Universitário da Universidade Federal de Minas Gerais.

Depois de apreciada pelo Conselho Curador, a prestação de contas é encaminhada ao órgão competente do Ministério Público de Minas Gerais. Ver o Art. 26º do Estatuto da Fundep.

Processos Certificados

Os processos da Fundep referentes à gestão de projetos, apoio institucional, prestação de serviços e outros foram avaliados pelo Conselho de Acreditação Holandês – Raad voor Accreditatie (Rva) em junho de 2018 que os atestou em conformidade aos requisitos estabelecidos pela norma ISO 9001:2015.



3. DESCRIÇÃO DA PROPOSTA

3.1. Objeto

Prestação de serviços técnicos especializados, para dar apoio ao projeto “ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL”, sob coordenação da Profa. Camila Amorim, recomendado pelo Comitê Técnico Científico do Projeto Brumadinho, no valor de R\$ 1.958.796,20 (um milhão, novecentos e cinquenta e oito mil, setecentos e noventa e seis reais e vinte centavos), no âmbito da Lei n.º 8-958 e Termo de Cooperação Técnica nº 037/19.

3.2. Justificativa

Ente de cooperação da UFMG, a FUNDEP é capaz de agilizar o desenvolvimento das atividades do projeto em questão, pois é dotada de estrutura operacional especializada e adequada às necessidades da Universidade Federal de Minas Gerais. Atuando como interface junto aos vários agentes que participarão do projeto, a FUNDEP poderá zelar para que o referido trabalho contemple seus objetivos e metas.

3.3. Detalhamento dos Serviços

3.1. Gerenciar o recebimento de recursos destinados à realização da proposta em questão:

- ✓ Efetuar pagamentos comandados pela (o) Coordenador(a), utilizando-se dos recursos previstos;
- ✓ Monitorar e acompanhar administrativamente e analiticamente o cronograma físico-financeiro;
- ✓ Adquirir materiais e serviços, contratar pessoal especializado, administrar de forma contábil e financeira e prestar contas dos recursos;
- ✓ Recolher os impostos, taxas, contribuições e outros encargos porventura devidos em decorrência do projeto, apresentar os respectivos comprovantes ao setor competente da (o) ESCOLA DE ENGENHARIA;
- ✓ Contratar, fiscalizar e pagar pessoal, porventura necessário à execução do objeto da proposta;
- ✓ Aplicar no mercado financeiro, através de instituições oficiais, os recursos administrados, devendo posteriormente revertê-los para o projeto, junto com o respectivo rendimento;
- ✓ Transferir, de imediato, à (o) ESCOLA DE ENGENHARIA, a posse e uso dos materiais de consumo e bens duráveis adquiridos para execução da proposta;
- ✓ A Fundep disponibilizará ao Comitê Técnico Científico relação de bens permanentes adquiridos no Projeto e Subprojetos para que este recomende a Reitoria da UFMG a destinação dos equipamentos;
- ✓ Formalizar doação sem qualquer encargo, ao final da execução da Proposta do Projeto Brumadinho UFMG, dos bens duráveis, adquiridos para execução da proposta para unidade indicada pela Reitoria da UFMG, conforme Termo de Cooperação Técnica nº 037/19;



- ✓ Restituir ao Juízo, ao final do projeto, se for o caso, eventual saldo remanescente, monetariamente corrigido e acrescido dos rendimentos percebidos;
 - ✓ Solucionar, judicialmente ou extrajudicialmente, quaisquer litígios com terceiros, decorrentes da execução desta proposta;
 - ✓ Conceder bolsas de pesquisa e extensão de acordo com a Lei n.º 8.958 e Termo de Cooperação Técnica n° 037/19, quando for o caso.
- Oferecer serviço de acesso direto para o coordenador, disponibilizando software próprio, via Internet, que permite acessar a qualquer momento, de qualquer lugar, os dados relativos ao projeto, composto dos seguintes módulos:
 - ✓ Módulo Financeiro:
 - Extrato “inteligente”, via Internet / e-mail
 - Balancetes
 - Faturas
 - Demonstrativo de despesas
 - Prestação de contas
 - ✓ Módulo compras
 - Controle de solicitações de compras nacionais e importadas
 - Custo de importação
 - Autorização e justificativa para aquisição de bens
 - ✓ Módulo pessoal
 - Custo de pessoal
 - Responsabilizar-se por:
 - ✓ Prestar os serviços na forma e condições definidas no projeto, responsabilizar-se pela sua perfeita e integral execução;
 - ✓ Responder pelos prejuízos causados à (o) ESCOLA DE ENGENHARIA, em razão de culpa ou dolo de seus empregados ou prepostos;
 - ✓ Respeitar e fazer com que seu pessoal cumpra as normas de segurança do trabalho e demais regulamentos vigentes nos locais em que estiverem trabalhando;
 - ✓ Facilitar, por todos os meios ao seu alcance, a ampla ação fiscalizadora da (o) ESCOLA DE ENGENHARIA, atendendo prontamente às observações por ele apresentadas;
 - Oferecer estrutura gerencial e operacional com pessoal especializado para acompanhar individualmente os processos e atender coordenadores.
 - Disponibilizar ao coordenador, via Internet, formulários *on line*, para solicitações de serviços.
 - Responsabilizar-se pela guarda dos documentos relativos a proposta;
 - Disponibilizar para a proposta sistema de gestão (software) com os módulos – compras, financeiro, pessoal, cursos e eventos, integrados para dar maior segurança, transparência, rapidez e confiabilidade aos processos.
 - Observar rigorosamente o disposto na Lei 8958 de 1994 e ao Decreto 8241 de 2014.



4. RESPONSABILIDADE TÉCNICA

O gerenciamento das atividades acima propostas ficará a cargo da CIA – Centro Integrado de Atendimento Fundep.

5. VALOR DA PROPOSTA

Para a execução das atividades previstas nesta proposta, a Contratante pagará á Fundep a importância de R\$ 195.879,60 (cento e noventa e cinco mil, oitocentos e setenta e nove reais e sessenta centavos), referente a remuneração pelos serviços prestados, conforme anexo I).

6. PRAZO DE EXECUÇÃO

O prazo estimado para realização do serviço proposto será definido no contrato a ser firmado entre as partes.

7. APROVAÇÃO DA PROPOSTA

Em caso de aprovação da presente Proposta, solicitamos a emissão ou o pedido de emissão do contrato por parte da FUNDEP.

8. VALIDADE DA PROPOSTA

Esta proposta tem a validade de 30 (trinta) dias a contar de sua data de assinatura.

Belo Horizonte, 10 de junho de 2020

ALFREDO GONTIJO DE OLIVEIRA:04512421653
Assinado de forma digital por ALFREDO GONTIJO DE OLIVEIRA:04512421653
Dados: 2020.06.10 17:03:50 -03'00'

Prof Alfredo Gontijo de Oliveira
Presidente

Anexo I

Custos Fundep para Gestão do Projeto ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL

Envolvimento da Fundação	Vigência (em meses)												Encerramento		CUSTOS	Total		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Mês + 1	Mês + 2				
Direto																		
1. Gerência de Proposta																	1.958,80	1.958,80
2. Gerência de Projetos																	3.357,94	47.011,10
3. Financeiro																	1.958,80	25.464,35
4. Contas a Pagar																	489,70	5.876,39
5. Prestação de Contas																	489,70	1.958,80
6. Contabilidade																	452,03	5.876,39
7. Assessoria Jurídica																	163,23	1.958,80
8. Divulgação/matrícula																		-
Necessidade do Projeto																		-
1. Pessoal																	2.448,50	29.381,94
2. Compras Nacionais																	2.611,73	31.340,73
3. Importação																		-
Suporte																		-
1. Informática																	979,40	13.711,57
2. Apoio																	139,91	1.958,80
3. Material de Expediente																	326,47	3.917,59
Manutenção																	326,47	3.917,59
Custos Indiretos																	326,47	3.917,59
Arquivo: 05 anos após a aprovação das contas da UFMG pelo TCU																	293,82	17.629,16
Total																		195.879,60



**PROPOSTA RECOMENDADA
E
TERMO DE COMPROMISSO
ÉTICO E DE
CONFIDENCIALIDADE**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
ESCOLA DE VETERINÁRIA
FACULDADE DE FARMÁCIA

SUBPROJETO

ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA EM ÁGUA SUPERFICIAL

EM ATENDIMENTO À CHAMADA 15/2019 - PROEX/PROJETO BRUMADINHO UFMG

BELO HORIZONTE - MG

JUNHO/2020



SUMARIO

1.	APRESENTAÇÃO	3
2.	EQUIPE PROPONENTE	3
3.	INTRODUÇÃO	5
4.	OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS	6
5.	ESTADO DA ARTE	7
	5.1 Ecotoxicologia no monitoramento da qualidade das águas e como instrumento de perícia ambiental	7
6.	JUSTIFICATIVA	12
7.	MATERIAL E MÉTODOS	14
	7.1 Etapa 1: Formalização do contrato, compras e mobilização da equipe atuante no projeto	14
	7.2 Etapa 2: Treinamento dos bolsistas para realização dos ensaios ecotoxicológicos e calibração de instrumentos	15
	7.3 Etapa 3: Realização dos ensaios ecotoxicológicos com as amostras coletadas na Bacia do Rio Paraopeba	15
	7.3.3 Realização dos testes ecotoxicológicos	19
	7.3.4 Análise de toxicidade aguda com <i>Allivibrio fischeri</i>	21
	7.3.5 Análise de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia spp</i>	21
	7.3.6 Análise de toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	24
	7.3.7 Ensaios de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish) adulto	25
	7.3.8 Toxicidade aguda e crônica em larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	26
	7.3.9 Análises de genotoxicidade e mutagenicidade	27
	7.5. Etapa 4: Análises integrada dos resultados e elaboração de relatórios	28
8.	CRONOGRAMA	28
9.	DEDICAÇÃO E RESPONSABILIDADES DE CADA PROFESSOR PESQUISADOR	29
10.	PLANO DE TRABALHO DOS BOLSISTAS	30
11.	ORÇAMENTO: PLANO DE APLICAÇÃO DOS RECURSOS COM CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO	31
12.	REFERÊNCIAS	45



1. APRESENTAÇÃO

A presente proposta objetiva o desenvolvimento de um Subprojeto que contempla as atividades descritas na Chamada Pública Interna Induzida Nº 15/2019 – Análise Ecotoxicológica em Água Superficial, no âmbito do Projeto Brumadinho-UFMG, que tem como objetivo geral auxiliar o Juízo da 6ª Vara da Fazenda Pública da Comarca de Belo Horizonte a identificar e avaliar os impactos decorrentes do rompimento da Barragem I da Mina Córrego do Feijão.

Nesse contexto, a presente proposta prevê a realização de ensaios ecotoxicológicos para verificar a toxicidade aguda e crônica de amostras de águas superficiais, coletadas ao longo da Bacia do Rio Paraopeba à montante e à jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”.

2. EQUIPE PROPONENTE

A equipe proponente, listada no Quadro 1, será coordenada por professores pesquisadores do departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG (DESA-Escola de Engenharia) e contará com professores e pesquisadores dos departamentos de Análises Clínicas e Toxicológicas (Faculdade de Farmácia), Clínica e Cirurgia Veterinária (Escola de Veterinária), Zootecnia (Escola de Veterinária), compreendendo assim uma equipe multidisciplinar, como sugerido na Chamada Pública. Os professores pesquisadores provenientes desses departamentos terão auxílio de bolsistas de pós-graduação, assim como pesquisadores e técnicos mestres e doutores, que possuem experiência prévia comprovada na condução de ensaios ecotoxicológicos.



Quadro 1- Membros da equipe proponente, participação, atribuição no projeto e link do lattes

Professores					
Nome	Título	Unidade	Participação	Atribuição no Projeto	Link do Lattes
Camila Amorim	Doutora	DESA/EE	Coordenadora	Coordenação e execução das atividades e da equipe	http://lattes.cnpq.br/9940811381309673
Maria Clara Starling	Doutora	DESA/EE	Sub-coordenador Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução das análises com <i>Allivibrio fischeri</i> (bactéria) e <i>Raphidocelis subcapitata</i> (alga) e realizar a comunicação entre as diferentes equipes	http://lattes.cnpq.br/5732421311917264
Carlos Tagliati	Doutor	ACT/FF	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de mutagenicidade e genotoxicidade	http://lattes.cnpq.br/8464038725747139
Gilcinéa Santana	Doutora	DCCV/EV	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de toxicidade com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish – peixe) adulto e larvas	http://lattes.cnpq.br/8035985522429176
Kleber Miranda Filho	Doutor	DZOO/EV	Pesquisador	Orientar e supervisionar a execução dos testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia dubia</i> (microcrustáceo)	http://lattes.cnpq.br/9582652974539721
Bolsistas					
Nome	Título	Unidade	Participação	Atribuição no Projeto	Link do Lattes
Mayra Thais Menezes	Graduado	DCCV/EV	Técnico de laboratório	Execução dos ensaios com <i>Danio rerio</i> (Zebrafish – peixe)	http://lattes.cnpq.br/7661539597668750
João Paulo Lorenzini	Mestre	DZOO/EV	Bolsista de Doutorado	Execução das análises de toxicidade com <i>Ceriodaphnia sp.</i>	lattes.cnpq.br/7815177509865232
Beatriz Reis	Doutora	DESA	Bolsista de Pós-Doutorado	Execução das análises de toxicidade com <i>Allivibrio fischeri</i>	lattes.cnpq.br/9454235941494186
Técnico mestre	Mestre	DESA	Técnico de laboratório	Execução das análises de toxicidade com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	a definir
Pós Doutor Júnior	Doutor	ACT/FF	Bolsista de Pós-Doutorado	Execução dos Testes de Ames e dos ensaios de genotoxicidade	a definir
Técnico mestre	Mestre	ACT/FF	Técnico de laboratório	Preparo de material, organização do laboratório e realização dos ensaios in vitro	a definir

DESA - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; ACT - Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia; DZOO - Zootecnia, Escola de Veterinária; DCCV/EV - Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária



3. INTRODUÇÃO

“Em 25 de janeiro de 2019, a Barragem I da Mina “Córrego do Feijão”, em Brumadinho, Minas Gerais, se rompeu. O fato ocasionou o falecimento e desaparecimento de 270 pessoas ao total, além de uma série de consequências e impactos pessoais, sociais, ambientais, econômicos e em patrimônios por longa extensão territorial, em especial na Bacia do Rio Paraopeba” (PRPQ, 2020).

Dentre os inúmeros impactos ambientais decorrentes do rompimento de uma barragem de rejeitos de minério de ferro, como a Barragem I da Mina “Córrego do Feijão” e sua precedente, a Barragem do Fundão da Samarco, destaca-se a deterioração da qualidade da água. O rejeito - composto principalmente por matéria orgânica (MO), sílica (Si) e ferro (Fe), além de outros elementos traço (Pb, Cu, As, Cr, Ni, etc.) possivelmente presentes no solo – é carregado pelas águas dos rios após o rompimento, causando alterações nas características físico-químicas da água superficial compreendendo: elevação da turbidez, da concentração de sólidos em suspensão e dissolvidos, da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), assoreamento do leito do rio, aumento da concentração de Fe e outros metais eventualmente associados ao solo/rejeito, desmatamento e erosão das margens, arraste de organismos flutuantes (nêuston e plêuston) para o fundo e aterramento desses e dos organismos bentônicos (TUNDISI; TUNDISI, 2008; FERNANDES et al., 2016).

Para além dos efeitos diretos, destaca-se também as consequências indiretas como a redução da penetração de luz e da concentração de oxigênio dissolvido na coluna d’água, morte de peixes e organismos sensíveis a componentes do rejeito e às alterações abruptas do ambiente, o que caracteriza um quadro de toxicidade aguda, com consequente perda da biodiversidade (FERNANDES et al., 2016). Não obstante, a dispersão do rejeito, pode desencadear o revolvimento do sedimento depositado no fundo do rio devido à sua elevada massa específica. Como consequência, os elementos traço (Al, Fe, Cd, As, Hg, Pb, etc) estocados no sedimento há décadas são ressuspensos na coluna d’água, causando toxicidade à fauna aquática e aos seres humanos. A longo prazo, a bioacumulação de tais poluentes na cadeia trófica pode vir a provocar efeitos em fases posteriores do ciclo de vida dos animais que habitam o ambiente, efeitos esses caracterizados como toxicidade crônica (KONDURACKA, 2019).

A implementação de um programa de monitoramento que compreenda a avaliação ecotoxicológica de amostras coletadas na bacia atingida é essencial para qualificar e quantificar, ou até mesmo prever, os efeitos tóxicos agudos e crônicos provocados pelo lançamento de rejeito por ocasião do rompimento de uma barragem de mineração. Sendo assim, a realização de análises ecotoxicológicas executadas por equipe tecnicamente capacitada e sem vínculo com a mineradora responsável, possibilitará a um melhor entendimento dos efeitos tóxicos provocados na Bacia do Rio Paraopeba como consequência do Rompimento da Barragem do Córrego Feijão. Além disso os testes ecotoxicológicos permitem a identificação da rota de exposição aos compostos tóxicos. Tal monitoramento deve ser feito em paralelo às análises físico-químicas de qualidade da água superficial, de maneira a subsidiar as análises do impacto ambiental associado ao rompimento da barragem.



4. OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

Avaliar a rota de exposição a contaminantes e a potabilidade das águas superficiais coletadas a montante e a jusante do rompimento da Barragem I da Mina do Córrego Feijão com relação a ensaios ecotoxicológicos.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Realizar testes de toxicidade aguda em relação á bioluminescência emitida por *Allivibrio fischeri* para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade aguda Zebrafish (*Danio rerio*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp.* para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente *Pseudokirchneriella subcapitata*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de toxicidade aguda e crônica em larvas recém eclodidas de Zebrafish (*Danio rerio*) para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Realizar testes de mutagenicidade e genotoxicidade para amostras coletadas a montante e a jusante do ponto de rompimento da Barragem I da Mina do “Córrego Feijão”;
- Elaborar relatórios técnicos (parcial e final) contendo os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos propostos e relacioná-los de maneira integrada com os resultados obtidos para a caracterização físico-química.



5. ESTADO DA ARTE

5.1 Ecotoxicologia no monitoramento da qualidade das águas e como instrumento de perícia ambiental

As análises ecotoxicológicas de águas superficiais, permitem prever, detectar, qualificar e quantificar o(s) efeito(s) agudo(s) e/ou crônico(s) provocado(s) por uma amostra aos organismos teste. Dentre os efeitos, ou “endpoints”, mensurados pelos diversos ensaios ecotoxicológicos estão: mortalidade, motilidade, desregulação endócrina, alteração na taxa de crescimento ou morfológica, comprometimento reprodutivo, etc. (ADAMS; GREELEY, 2000; MARTINEZ-HARO et al., 2015; BOGER et al., 2016). Tais efeitos são detectados e quantificados por meio da realização de testes de toxicidade que consistem na exposição de organismos teste, cuidadosamente selecionados e cultivados, à amostra ambiental sob condições controladas (pH, OD, fotoperíodo, temperatura, etc). Desse modo, os resultados obtidos por meio desses ensaios refletem os efeitos sinérgicos provocados pelas substâncias tóxicas que podem estar presentes em um determinado ambiente ou amostra.

A ecotoxicologia como ferramenta de investigação na mensuração de impactos ambientais pode ser grande aliada em perícias relacionadas a ocorrência de eventos que impactam a fauna. Afinal, tais análises permitem a detecção e quantificação dos efeitos tóxicos agudos e crônicos que estão relacionados à presença do rejeito no rio e seus sedimentos sobre a fauna aquática, de maneira a contribuir para a elucidação do modo de ação dos poluentes.

Adicionalmente, a análise da qualidade da água apenas com base nos parâmetros físico-químicos não reflete o quadro ecológico dos corpos d’água, sendo essencial o monitoramento dos parâmetros ecológicos e ecotoxicológicos (Figura 1) para complementar as informações obtidas a partir dos parâmetros físico-químicos (ADAMS; GREELEY, 2000). De maneira a contribuir para a integridade ambiental das águas europeias, a DIRETIVA WFD 2000/60/EC impõe o monitoramento simultâneo dos parâmetros ecológicos e ecotoxicológicos desde o ano de 2000 (UE, 2000). Similarmente, análises de toxicidade total dos efluentes lançados nos corpos d’água são obrigatórias desde 1991 nos Estados Unidos (USEPA, 1991).

O monitoramento da qualidade da água por análises ecotoxicológicas, objeto da presente proposta, é de extrema importância no contexto de ocorrências ambientais como o rompimento de uma barragem. Os testes ecotoxicológicos visam à avaliação da toxicidade de um poluente, uma mistura de poluentes ou de uma amostra ambiental, para que se possa compreender e quantificar o efeito provocado e o risco apresentado por eles aos organismos aquáticos em diferentes níveis tróficos (MARTINEZ-HARO et al., 2015; WERNERSSON et al., 2015).

Análises ecotoxicológicas podem ser realizadas *in vitro* ou *in vivo* por meio da exposição de uma célula ou organismo teste à amostra avaliada (água superficial, efluente bruto ou tratado, solução sintética, rejeito de mineração, água contaminada com efluente ou rejeito, etc.) por tempo padronizado e em condições definidas (pH, temperatura, oxigênio dissolvido). Desse modo, é possível detectar tanto a toxicidade aguda, – aquela para a qual o efeito é detectado



em horas (24, 48, 96h), – quanto a crônica – quando o efeito é observado em algum momento ao longo do ciclo de vida do organismo teste (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Figura 1 – Parâmetros de monitoramento de qualidade da água



Existem diversos ensaios de toxicidade aguda e crônica já padronizados pelas normas internacionais (ISO) e os mais comumente utilizados para amostras de água e efluentes estão listados no Quadro 2, como o ensaio de Microtox® que avalia a toxicidade aguda para a bactéria marinha *Allivibrio fischeri* (ISO, 2007; ABNT, 2012), e os testes de toxicidade aguda (48 horas) e crônica que utilizam o crustáceo *Daphnia magna* (21 dias) (ISO, 2012; ABNT, 2016a;) ou *Ceriodaphnia spp.* (7 dias) (CETESB, 2017). Os testes de toxicidade aguda têm como principal resultado a CE₅₀ - concentração que causa efeito a 50% da população. Enquanto os ensaios de toxicidade crônica permitem a quantificação da Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) – concentração máxima que não causa efeito - e da Concentração de Efeito Observado (CEO) – concentração mínima que causa efeito. A aplicação ambiental da CENO consiste na sua adoção como concentração segura para determinado poluente no ambiente e na avaliação dos impactos ambientais provocados a longo prazo por determinados poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).



Quadro 2 – Testes ecotoxicológicos padronizados pela ABNT, ISO e OECD

Tipo de teste	Organismo teste	ABNT NBR/OECD	Filo	Nível trófico	Resposta (endpoint)
Toxicidade Aguda	<i>Allivibrio fischeri</i>	15411-3:2012	<i>Proteobacteria</i>	Decompositor	Luminescência
Toxicidade aguda	<i>Danio rerio</i> (adulto)	15088:2016	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Letalidade e comportamento
Toxicidade crônica	<i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	<i>Crustacea</i>	Consumidor I	Mobilidade, letalidade e reprodução
Toxicidade crônica	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	<i>Clorophyta</i>	Produtor	Crescimento
Toxicidade aguda e crônica	<i>Danio rerio</i> (larvas)	15499/2015	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Letalidade e crescimento
Análises de mutagenicidade	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD 471; ISSO 11350:2012	<i>Proteobacteria</i>	Decompositor	Mudança de cor do meio devido mutação celular
Análise de genotoxicidade	Célula V79 (fibroblastos de pulmão de hamster)	ISO 21427-2:2006	<i>Chordata</i>	Consumidor II	Presença de micronúcleos

No que diz respeito à legislação nacional, a resolução CONAMA 357 de 2005 exige a ausência de toxicidade crônica em águas de Classe 1 e 2 e de toxicidade aguda para as águas de classe 3 e prevê a realização de testes de toxicidade para substâncias que não estejam no escopo da legislação. Entretanto, não há definição dos ensaios de toxicidade que devem ser utilizados no monitoramento (CONAMA, 2005). A CONAMA 430 de 2011, que dispõe sobre o padrão de lançamento de efluentes, estabelece a realização de ensaios ecotoxicológicos no efluente e no ponto de mistura do corpo receptor para pelo menos dois níveis tróficos distintos (CONAMA, 2011), sem contudo especificar o tipo de ensaio. A resolução COPAM CERH 01/2008 também prevê a realização de testes ecotoxicológicos e de bioacumulação (MG, 2008), entretanto sem especificar o tipo e o nível trófico a serem adotados.

O efeito carcinogênico dos mais diversos contaminantes na água, incluindo metais, pode ser avaliado por meio de ensaios *in vitro*, como nos testes de carcinogenicidade. Essa avaliação é fundamental no sentido de determinar o efeito desses contaminantes a longo prazo, pois os mesmos não são imediatos e os mecanismos biológicos, como bioquímicos e genômicos, envolvidos são de extrema complexidade. Porém, considerando que os testes para avaliação da carcinogenicidade demandam tempo e são extremamente onerosos, os testes para avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade são mais empregados, pois determinam o potencial carcinogênico da amostra (HARTWIG *et al.*, 2002; ASMUSS *et al.*, 2000; CHEN & WHITE, 2004; GOODSON *et al.*, 2015; UMBUZEIRO *et al.*, 2017). O emprego de testes validados por *guidelines* internacionais como os da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) são recomendados e aplicados para essa finalidade.

O Quadro 3 traz estudos ecotoxicológicos realizados diante das recentes ocorrências de rompimentos de barragem de mineração de minério de ferro no Estado de Minas Gerais no



Quadro 3 - Estudos que realizaram testes ecotoxicológicos para dimensionar impactos relacionados à atividade de mineração e eventos de rompimentos de barragens contendo rejeito de minério de ferro no Estado de Minas Gerais.

Evento	Amostra	Organismo teste	Tipo de teste e efeito observado	Resultados	Referência
Rompimento da Barragem do Fundão	Água, lama e sedimento do Córrego Gualaxo do Norte	<i>HepG2 e Allium cepa</i>	Agudo (24h) - Citotoxicidade (células humanas), mutagenicidade e genotoxicidade (micronúcleo, anomalias cromossômicas, potencial carcinogênico).	Amostras de água inibiram HepG2 em mais 70% de inibição. Genotoxicidade e mutagenicidade foram observadas para ambos os organismos teste em todas as amostras.	SEGURA et al., 2016
	Água superficial coletada no Rio Doce	<i>Danio rerio</i> (Zebra fish) - embrião	Agudo (96h) - mortalidade e acúmulo de metais nos tecidos	Não houve mortalidade para nenhum dos organismos expostos à amostra de água, descartando toxicidade aguda, mas foi detectada bioacumulação de metais, principalmente para espécimes expostos à água amostrada em Regência.	SARTORI et al., 2016
	Água e sedimento no Córrego Gualaxo do Norte	Macrófitas: <i>Egeria densa</i> e <i>Chara sp.</i>	Agudo (24h) - taxa de produção primária bruta Crônico (90 dias) - crescimento das plantas	O crescimento e a taxa de produtividade primária para <i>Chara sp.</i> apontaram toxicidade do Fe, devido a interferência na atividade de enzimas relacionadas à síntese de clorofila. Houve um aumento na taxa de alongação das duas espécies, devido à presença de elementos traço na água, isso reduziu o ganho de biomassa e do desenvolvimento de estruturas reprodutivas.	BOTTINO et al., 2017
	Rejeito da Barragem do Fundão e compartimentos geomorfológicos do Córrego Gualaxo do Norte	<i>Eisenia andrei</i>	Agudo (14 dias) - mortalidade e perda de biomassa Crônico (48 h) - Teste de fuga	Ensaio agudo: 20% de mortalidade para os indivíduos expostos ao rejeito que apresentaram ganho de massa corporal, provavelmente devido acúmulo de água por edema devido aos altos teores de sódio do rejeito. As demais amostras não provocaram mortalidade. Amostras do terraço fluvial com rejeito provocaram perda de massa corporal. Ensaio crônico: tanto o rejeito como a amostra de sedimento contaminada comprovam perda de função de habitat (80% de fuga).	SERRANO et al., 2018



Evento	Amostra	Organismo teste	Tipo de teste e efeito observado	Resultados	Referência
	Água coletada no Rio Doce	<i>Allium cepa</i>	Agudo (24h) - Citotoxicidade (índice mitótico, índice de fases mitóticas, frequência de anomalias cromossômicas)	Concentrações extremamente altas de Fe, Al e Mn encontradas e associadas a alterações na mitose em amostras com diluição a partir de 40%. O índice mitótico caiu entre 25-35% com amostras não diluídas. Houve uma alteração nos ciclos da mitose com prolongação da fase de prófase e redução das demais fases. Aberrações cromossômicas foram observadas para amostras coletadas em locais impactados.	QUADRA et al., 2019
Atividades de mineração	Água superficial, solo e sedimento em áreas próximas a atividades de mineração na bacia do Rio São Francisco (estações seca e chuvosa)	<i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> (normas internacionais) <i>Daphnia laevis</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , <i>Chironomus xanthus</i> (ambientes tropicais)	Agudo (48 - 96h) - imobilidade e mortalidade Crônico (7 dias) - reprodução e mortalidade	Deteção de efeitos agudos e crônicos mesmo em locais onde os poluentes estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação. Para <i>D. similis</i> efeitos agudos foram observados para as amostras de água coletadas em todos os pontos na estação seca e apenas nos pontos onde há influência de mineração de ouro também na estação chuvosa. O organismo tropical <i>D. laevis</i> indicou toxicidade nas amostras sob influência de mineração de ouro em ambas estações. A toxicidade crônica foi observada para as amostras da estação seca coletadas nos pontos sob influência de mineração de ouro para ambos os organismos. A reprodução foi mais afetada pelas amostras de sedimento se comparadas às de água.	MATOS, 2019
Rompimento da Barragem I do Córrego Feijão	Água superficial coletada ao longo de 464 km no Rio Paraopeba na semana seguinte ao rompimento	<i>Danio rerio</i> (Zebra fish) - embrião	Agudo (96h) - mortalidade, má formação.	Alta mortalidade de embriões para os dois grupos de amostras, com aumento da mortalidade (85%) nas amostras. O aumento de mortalidade não pôde ser diretamente vinculado aos poluentes associados ao rompimento da barragem devido à prática de outras atividades na Bacia com eventual eutrofização.	THOMPSON et al., 2020



período de 2015-2019. Os estudos foram realizados no sentido de quantificar os impactos decorrentes desses eventos nas bacias atingidas e contemplaram tanto a análise ecotoxicológica de amostras de água superficial, quanto do rejeito, e de sedimentos dos rios atingidos pelos rompimentos, e nas bacias impactadas pela atividade minerária intensa. Tais estudos utilizaram ensaios realizados com organismos de diferentes níveis tróficos e métodos *in vitro* e *in vivo*, assim como os ensaios que estão sendo sugeridos na presente proposta.

Em relação ao rompimento da barragem de Brumadinho, objeto da presente proposta, há apenas um estudo publicado acerca da avaliação ecotoxicológica das amostras de água coletadas na Bacia do Rio Paraopeba. Nessa pesquisa o teste de toxicidade aguda com o peixe *D. rerio* foi utilizado. Foi detectada alta taxa de mortalidade dos espécimes expostos às amostras do Rio Paraopeba, o que representa um risco à integridade ambiental. Entretanto, os autores afirmam que não é possível associar essa mortalidade diretamente aos componentes do rejeito, uma vez que a região está submetida a diversos outros impactos como, por exemplo, a eutrofização (THOMPSON et al., 2020). Essa dificuldade de segregar os fatores causadores de determinado efeito em amostras ambientais está relacionada ao fato de que elas contêm múltiplos componentes que podem atuar sinergicamente (SEGURA et al., 2016). Desse modo, a utilização de diferentes ensaios ecotoxicológicos em diversos níveis tróficos, associada à uma caracterização físico-química das amostras ambientais, torna-se imprescindível para a obtenção de respostas seguras e precisas quanto ao efeito ecotoxicológico de um episódio de contaminação ambiental.

6. JUSTIFICATIVA

A escolha dos testes de toxicidade que serão realizados no âmbito desse projeto (Quadro 4) se justifica uma vez que a ocasião do rompimento de uma barragem de mineração com lançamento do rejeito no corpo d'água pode ocasionar tanto toxicidade aguda quanto crônica, com efeitos que se manifestam de maneira distinta nos diferentes níveis tróficos. Essa abordagem corrobora com o que é preconizado com as normas ambientais nacionais e internacionais, as quais exigem a realização dos testes em pelo menos dois níveis tróficos distintos (UE, 2000; BRASIL, 2005).

No momento de um episódio de contaminação ambiental, como o rompimento de uma barragem de rejeitos, os poluentes estão presentes na coluna d'água em concentrações maiores, o que leva à exposição dos organismos aquáticos de maneira abrupta podendo acarretar o efeito de toxicidade aguda, como observado por THOMPSON et al. (2020) para embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) com amostras de água coletadas uma semana após o rompimento de uma barragem. Entretanto, com o passar do tempo, o rejeito tende a decantar e seus constituintes são estocados nos sedimentos dos rios, o que diminui a chance de ocorrência de toxicidade aguda, mas não exclui a possibilidade da toxicidade crônica. Afinal, a transferência de substâncias entre os sedimentos e a coluna d'água pode liberar constituintes do rejeito, causando a exposição frequente dos organismos ali presentes por longos períodos, o que, mesmo em pequenas concentrações, pode gerar efeitos a longo prazo, caracterizando a toxicidade crônica (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015; SEGURA ET AL, 2016).

Adicionalmente, há de se considerar o fato do revolvimento dos sedimentos presente do leito dos rios durante a estação chuvosa, que pode desencadear a liberação de constituintes do



rejeito em concentrações mais elevadas, levando a recorrência da toxicidade aguda. Dessa forma, é essencial a realização de testes de ecotoxicidade aguda e crônica para os diferentes níveis tróficos presentes no ambiente (por exemplo produtor, consumidores I e II e decompositor). Nesta proposta sugere-se a adoção de dois testes de toxicidade aguda e dois testes de toxicidade crônica, realizando dessa maneira a investigação em dois níveis tróficos como detalhado no Quadro 4.

Considerando que a variação do efeito detectado pode ocorrer não apenas em relação ao nível trófico, mas também para um mesmo organismo-teste que pode responder à presença de um contaminante de maneira distinta em suas diferentes fases do ciclo de vida (WENERSSON ET AL., 2015), justifica-se a realização de dois testes distintos com o *Danio rerio*. O teste de toxicidade aguda com o peixe adulto e os teste de toxicidade aguda e crônica com o embrião desse mesmo animal, são aqui propostos uma vez que os estágios iniciais de desenvolvimento de um organismo-teste são mais sensíveis do que os estágios juvenil e adulto. Ressalta-se que tais testes são utilizados rotineiramente por órgãos internacionais de proteção ambiental, conforme detalhado no Quadro 4.

Considerando os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, ressalta-se a complementaridade dos resultados obtidos por meio da realização de ambos os testes com uma mesma amostra. Afinal, o teste de genotoxicidade revela um dano ao DNA celular que pode ou não vir a ser reparado. Ao passo que o teste de mutagenicidade detecta mutações no DNA que são permanentes e hereditárias, afetando também as próximas gerações. Tais testes são realizados tanto pela CETESB quanto pela EPA USA rotineiramente de maneira a obter um diagnóstico robusto sobre o efeito da qualidade da água nos organismos aquáticos.

Dessa forma, o conjunto de testes de toxicidade aqui proposto é suficientemente sensível e abrangente, como recomendado para o monitoramento ambiental (MARTINEZ-HARO ET AL., 2015). Além disso, como listado no Quadro 4, os testes foram escolhidos com base nos protocolos de monitoramento periódico da qualidade da água adotado e reconhecido por órgãos ambientais de referência nacional e internacional.



Quadro 4 – Justificativa para escolha dos ensaios ecotoxicológicos na presente proposta

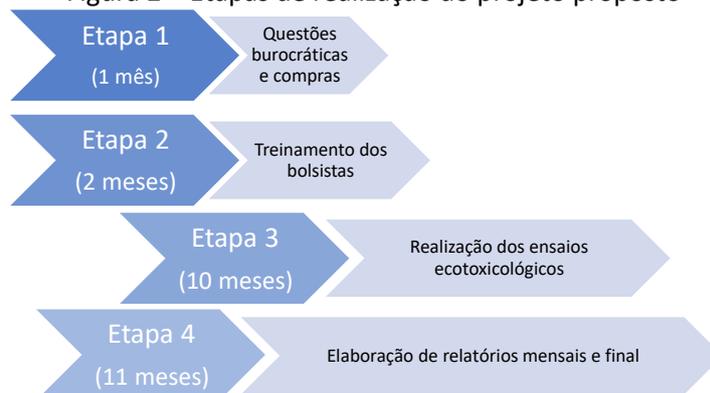
Teste	Organismo	Organismo teste	Metodologia	Nível Trófico	Referência de Utilização
Toxicidade Aguda	Bactéria	<i>Allivibrio fischeri</i>	ABNT NBR 15411-3:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Toxicidade aguda	Peixe	<i>Danio rerio</i> (adulto)	15088:2016	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD
Toxicidade crônica	Crustáceo	<i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	Consumidor I	IGAM UE-WFD
Toxicidade crônica	Alga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	Produtor	UE-WFD
Toxicidade aguda e crônica	Peixe	<i>Danio rerio</i> (larvas)	15499/2015	Consumidor II	EPA-USA UE-WFD
Análises de mutagenicidade	Bactéria	<i>Salmonella typhimurium</i>	OECD 471; ISSO 11350:2012	Decompositor	CETESB EPA-USA
Análise de genotoxicidade	Célula Animal	Célula V79 (fibroblastos de pulmão de hamster)	ISO 21427-2:2006	Consumidor II	CETESB EPA-USA

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, EPA-USA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América); IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas; UE-Diretiva da União Europeia WFD2000/60/EC;

7. MATERIAL E MÉTODOS

De maneira a possibilitar o alcance de todos os objetivos listados acima, a proposta foi dividida em 4 Etapas de acordo com a Figura 2.

Figura 2 – Etapas de realização do projeto proposto



7.1 Etapa 1: Formalização do contrato, compras e mobilização da equipe atuante no projeto

Essa etapa contempla a formalização dos contratos dos bolsistas responsáveis pela execução do projeto com a FUNDEP, bem como a realização dos pedidos de compras dos consumíveis e equipamentos necessários para a realização dos ensaios de ecotoxicologia aqui propostos.



Como alguns testes devem passar por aprovação do Comitê de Ética da UFMG, as declarações constando avaliação e aprovação desse órgão serão requeridas nessa etapa.

7.2 Etapa 2: Treinamento dos bolsistas para realização dos ensaios ecotoxicológicos e calibração de instrumentos

Nessa etapa, cada pesquisador será responsável por treinar os bolsistas vinculados à sua atuação no projeto nos ensaios ecotoxicológicos aqui propostos, bem como nas exigências necessárias para garantir o seguimento das normas da ABNT e a segurança das amostras e dos bolsistas e interpretação adequada dos resultados obtidos. Bolsistas também serão treinados nos softwares necessários, incluindo aquele destinado ao cadastro e rastreamento das amostras que será disponibilizado à equipe do projeto pela UFMG visando ao controle apropriado sobre o andamento do processamento das amostras. Além disso, será nessa etapa que será realizada a calibração dos equipamentos e instrumentos a serem utilizados para a execução dos ensaios ecotoxicológicos (balanças, vidraria, pipetas, etc.) conforme previsto no orçamento.

7.3 Etapa 3: Realização dos ensaios ecotoxicológicos com as amostras coletadas na Bacia do Rio Paraopeba

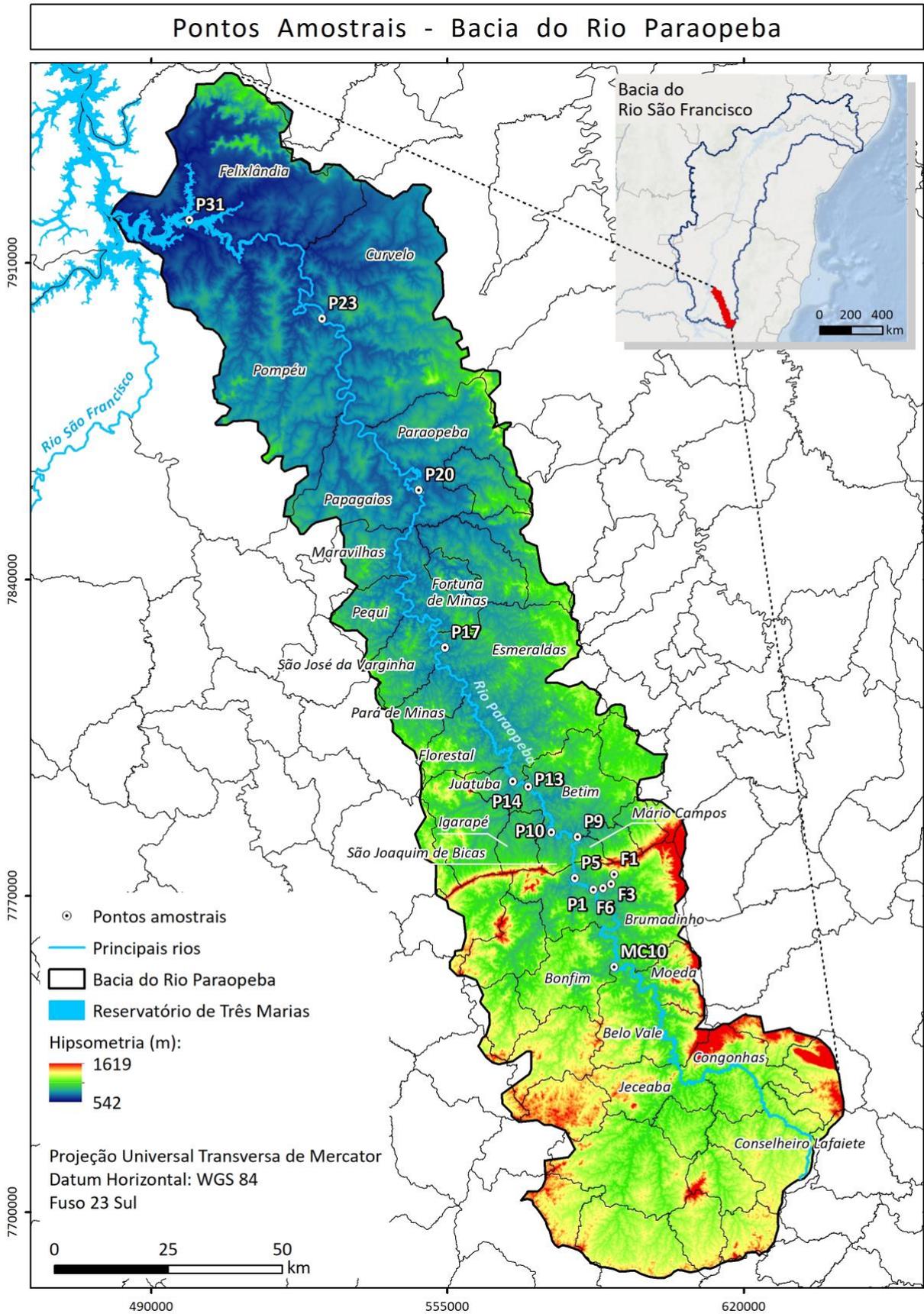
7.3.1. Seleção dos Pontos Amostrais

Os pontos de amostragem para os ensaios de ecotoxicidade foram selecionados a partir do Plano Amostral de Águas Superficiais constantes no Anexo III da Chamada Interna Induzida Nº 11 do Edital Brumadinho-UFMG. A escolha foi feita de acordo com a proximidade do ponto amostral à antiga barragem e à sua relevância em relação à possíveis impactos ambientais e à saúde humana, como, por exemplo, nas proximidades de pontos de captação de água. Foram priorizados, também, pontos que coincidem com estações amostrais já existentes e monitorados por outros órgãos como o Instituto Mineira de Gestão das Águas (IGAM) e a CPRM, uma vez que essa correspondência permite uma análise mais aprofundada acerca das alterações na qualidade da água antes e após o rompimento.

Desse modo, definiu-se que a coleta das amostras para a realização de ensaios ecotoxicológicos deverá ser realizada nos pontos destacados na Figura 3, com detalhes sobre a localização descritos no Quadro 5. Dentre os 12 pontos escolhidos, dois deles (M9 e M10) representam locais de referência por se localizarem à montante do rompimento da barragem. Os 10 pontos restantes estão localizados à jusante do rompimento, em sítios afetados pela dispersão do rejeito: Ribeirão Ferro Carvão (F1, F3 e F6) e Rio Paraopeba (6 pontos).



Figura 3 – Representação da localização geográfica dos pontos propostos para coleta de amostras visando à realização de ensaios ecotoxicológicos



Quadro 5 – Nome, localização e descrição dos pontos selecionados para a realização de coletas de amostras para testes ecotoxicológicos

N.	Ponto	Latitude	Longitude	Curso d'água	Descrição
1	MC9	7753005,78	584777,26	Rio Macaúbas	Sob a ponte no distrito de Santo Antônio da Vargem Alegre
2	MC10	7754237	591594,71		Ponto de referência à montante do local do rompimento da barragem
3	F1	7774708,05	591614,15	Ribeirão Ferro-Carvão	Pontos localizados à montante e à jusante das barragens de contenção de rejeitos instaladas pela Vale
4	F3	7772556,84	590959,37		
5	F6	7771690,75	589193,72		
6	P1	7771291,76	587024,46	Rio Paraopeba	Ponto de confluência com o Córrego-Feijão
7	P5	7773856,04	582951,59	Rio Paraopeba	À montante do ponto de captação da COPASA, área urbana de Brumadinho
8	P9	7782998,19	583557,82	Rio Paraopeba	Rio Paraopeba, após a confluência com o ribeirão Sarzedo, à jusante da área urbana de Mário Campos.
9	P10	7784026,33	577773	Rio Paraopeba	Ponte sobre o Rio Paraopeba, corresponde ao BP070 (IGAM)
10	P13	7794046,88	572735,59	Rio Paraopeba	Divisa entre Betim e Juatuba, corresponde à BP072 (IGAM) e CPRM (Juatuba)
11	P14	7795289,76	569374,64	Rio Paraopeba	Área urbana de Juatuba, confluência com o reservatório Serra Azul utilização para abastecimento de água da RMBH
12	P20	7859729,5	548687,4	Rio Paraopeba	Captação da COPASA para o município de Paraopeba

7.3.2. Volume amostral requerido

De maneira a garantir precisão dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade, permitindo a realização de réplicas e contraprovas, caso requerido pelas partes envolvidas, o volume a ser coletado para a realização das análises aqui propostas será de 15 L, uma vez que o volume necessário para cada ensaio pode variar entre 0,1 (*AlliVibrio fischeri*) e 2 L (*Danio rerio* – teste crônico) por ponto de coleta, conforme listado no Quadro 6.



Quadro 6 – Volume de amostra necessário para a realização de cada teste ecotoxicológico proposto nesse projeto

Ensaio	ABNT NBR	Volume (L)	Número de réplicas	Número de ensaios	Laboratório Responsável
Toxicidade Aguda com <i>Allivibrio fischeri</i>	15411-3:2012	0,1	3	144	Laboratório de Ensaios Biológicos/DESA
Toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia sp</i>	13373:2017	2	10	480	Laboratório de Terapêutica Veterinária, DCCV
Toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	12648:2011	1	3	144	Laboratório de Aquicultura/DZOO
Toxicidade aguda e crônica com <i>Danio rerio</i> (Zebra fish)	15088:2016 e 15469:2016	2	1	48	Lab. Ensaios Biológicos/DESA
Toxicidade aguda e crônica com larvas de <i>Danio rerio</i>	15499/2015	2	4	192	Laboratório de Terapêutica Veterinária, DCCV
Análises de genotoxicidade	ISO 21427-2:2006	0,25	3	144	Análises Clínicas e Toxicológicas – ToxLab/ ACT
Análises de mutagenicidade	OECD 471; ISO 11350:2012	0,25	3	144	Análises Clínicas e Toxicológicas – ToxLab/ ACT

Número de réplicas: número de repetições necessárias para cada amostra. Número de ensaios: número de amostras multiplicado pelo número de réplicas.

As coletas para os ensaios ecotoxicológicos serão realizadas nos 12 pontos amostrais previamente descritos no Quadro 5. Será coletado 1 amostra de cada ponto por campanha amostral, com uma frequência de 4 campanhas ao longo de 12 meses (coleta trimestral) totalizando 48 amostras coletadas. O volume total de amostras por campanha será de 180 litros (Quadro 6) e serão realizadas duas campanhas em período chuvoso e duas em período seco.

Vale ressaltar que a interpretação dos resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos está condicionada ao conhecimento prévio das características físico-químicas das amostras. Logo, é imprescindível a sincronicidade entre as equipes responsáveis pelos três projetos (coleta, caracterização das amostras e ensaios ecotoxicológicos) no que diz respeito ao cronograma de coletas, caracterização apropriada e completa, volume e método de conservação de amostras adequados à caracterização e realização de cada ensaio ecotoxicológico aqui proposto.

A coleta será realizada conforme definido no Anexo III da chamada pública interna induzida nº 11/2019 por equipe selecionada pelo Comitê com o acompanhamento de um membro da equipe proponente da presente proposta nos meses referentes às coletas de amostras para



ecotoxicologia , conforme previsto no orçamento. A caracterização físico-química das amostras de acordo com os parâmetros de interesse da CONAMA 357 (BRASIL, 2005) acrescida de metais e metalóides deverá ser realizada para todas as amostras a serem utilizadas nos ensaios de toxicidade **anteriormente aos testes** pela equipe responsável **de acordo com as Chamadas 18-21 do Edital Brumadinho-UFMG**, a ser selecionada pela Comissão-Técnica Brumadinho - UFMG.

Complementarmente, para alguns ensaios, a caracterização analítica sobre a constituição química e física da água deve ser repetida **após** a exposição dos organismos do teste de Zebrafish às amostras. Nesse subprojeto pretende-se realizar essa análise para a água dos aquários de criação de peixes (*Danio rerio*), cabendo analisar a água do aquário controle, a amostra de concentração mínima e para a amostra de concentração máxima, totalizando 432 amostras (3 aquários/amostra x 3 réplicas x 12 pontos/campanha x 4 campanhas/ano), conforme determinação e especificações da NBR 15469/2016 e OECD (2019). Os parâmetros a serem analisados após exposição estão apresentados no Quadro 7, sendo que os custos referentes a consumíveis e pessoal responsável por elas estão previstos no orçamento da presente proposta. Ressalta-se que tais análises serão realizadas no Centro de Referência em Análises Ambientais (CRA) da UFMG e será disponibilizado um bolsista técnico mestre para realização destas, com experiência em análises físico-químicas de qualidade de água, e o mesmo receberá treinamento prévio a fim de cumprir todos os protocolos e requisitos adotados no CRA. Caso as análises de caracterização físico-química das amostras de água superficial identifiquem outras espécies químicas que possam afetar os resultados dos estudos de ecotoxicidade, essas espécies poderão ser incluídas na análise da água **após** exposição.

Quadro 7 – Análises e métodos utilizados na caracterização físico-química das amostras dos aquários no final dos testes com *D. rerio*

Parâmetro	Metodologia
Carbono orgânico total (TOC)	5310 B ¹
Sólidos totais dissolvidos	2540C ¹
Cloro residual	300.1, 1999 ²
Metais (alumínio, arsênio, cádmium, chumbo, cobalto, cobre cromo, ferro, níquel, zinco, mercúrio, prata)	3125 B (ICP-MS) ¹

¹SMWW, 23ª Edição, 2018; ²EPA, 1999

7.3.3 Realização dos testes ecotoxicológicos

A realização dos ensaios propostos nesse projeto está prevista para ocorrer nos Laboratórios já existentes nos Departamentos de Engenharia Sanitária e Ambiental, Análises Clínicas e Toxicológicas, Clínica e Cirurgia Veterinária e Zootecnia, uma vez que estes possuem a estrutura adequada, como biotério, instalações específicas de biossegurança (capelas, barreiras de contenção), equipamentos calibrados necessários à realização dos ensaios. A aquisição de infraestrutura similar à existente nos Departamentos, implica no aumento de custos da presente proposta e também demandaria espaço físico considerável.

O Quadro 8 apresenta uma relação dos equipamentos já existentes nas Unidades e que serão utilizados para a realização dos ensaios ecotoxicológicos aqui propostos. A demanda por adaptação de algumas instalações, conforme previsto no orçamento, será necessária em alguns para garantir a segurança das análises com amostras de mando judicial.



Quadro 8 – Equipamentos já existentes nos laboratórios aonde serão desenvolvidos os ensaios ecotoxicológicos aqui propostos

Departamento e Laboratório	Equipamento	Utilização	Valor estimado (R\$)
DESA/Laboratório de Ensaio Biológicos	Espectrofotômetro Shimadzu	Teste com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	63.200,00
	Turbidímetro	Acompanhamento da qualidade da água nas amostras ao longo dos ensaios de toxicidade	30.000,00
	Sonda multiparâmetro YSI (2 sondas)		200.000,00
ACT, ToxLab	Espectrofotômetro	Realização dos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade	10.000,00
	Centrífuga refrigerada		22.000,00
	Autoclave Vertical		6.000,00
	Balança Analítica		7.500,00
	Shaker de bactérias		6.500,00
	Estufa de CO2		23.000,00
	Estufa de cultura de bactérias		5.000,00
	Fluxo laminar - 3		55.000,00
	Freezers		5.500,00
Geladeiras	5.000,00		
DZOO, Laboratório de Aquacultura	Instalações de biotério, biossegurança, salas de cultivo (investimento FINEP)	Realização dos ensaios com microcrustáceos	2.000.000,00
	Compressor de ar radial 2 cv	Manutenção do nível de OD nos aquários de cultivo	2.950,00
	Grupo gerador a diesel, cabinado, com potência aproximada de 100 kVA, fator de potência 0,8, trifásico, 220 V, dotado de painel de comando e controle automático, microprocessado, com quadro de transferência automática	Fornecimento de energia para garantia de condições adequadas ao cultivo dos animais	44.200,00
DCCV/EV, Laboratório de Terapêutica Veterinária	Estufa de secagem	Testes de toxicidade com Zebrafish	2.500,00
	Analisador hemograma digital Thermo Scientific		38.000,00
	Leitor de Elisa MultiSkan Thermo Scientific		64.000,00
	Aquários de vidro 3 L (7 unidades)		455,00
	Aquário de vidro 10 L (3 unidades)		360,00
	Aquário de vidro 35L		300,00
	Aquário de plástico de 5L (12 unidades)		600,00
	Compressores de ar Boyu (3 unidades)		180,00
	Termostato para aquário (5		300,00



Departamento e Laboratório	Equipamento	Utilização	Valor estimado (R\$)
	unidades)		
	Compressor de ar eletromagnético Boyu		400,00
	Balança digital (precisão 0,001)		400,00
	Medidor de Fé digital (2 unidades)		700,00
	Repipetador Mecânico Rhythm (0,1-50,0 ml)		3.700,00
	Geladeira frostfree 345 L		2.900,00
	Estufa de secagem Fanem 315 se		1.000,00
Total			2.601.645,00

7.3.4 Análise de toxicidade aguda com *Allivibrio fischeri*

A toxicidade aguda será avaliada utilizando o procedimento descrito na norma técnica da ABNT NBR 15411-3:2012 (ABNT, 2012; ISO, 2007) e as instruções do fabricante do Microtox® Model 500 Analyser (SDI). Nesse ensaio, a bactéria luminescente *Allivibrio fischeri* é exposta à amostra e a luminescência é avaliada antes e após a exposição de maneira a identificar se há algum efeito agudo ao organismo teste. Para tal, a bactéria liofilizada em uma concentração de 10⁸ células por ampola é ressuspensa em solução de reconstituição. Na sequência, faz-se o ajuste da salinidade da amostra e uma diluição seriada (Diluyente: NaCl 2%) é realizada (concentração máxima 81,9%). Lê-se a luminescência da bactéria ressuspensa e, em seguida, as soluções diluídas das amostras são adicionadas à bactéria com leituras subsequentes após 5, 15 e 30 minutos de exposição à diferentes diluições. A partir dos valores obtidos para a luminescência das amostras, é realizado o cálculo do efeito tóxico por meio do Software MicrotoxOmni 4.1 que gera os valores de CE50 (%) para cada amostra.

7.3.5 Análise de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp*

Preparo e preservação das amostras conforme ABNT NBR 15469

Amostras representativas deverão ser coletadas em frasco plástico descartável, de polímero inerte, preenchendo-o totalmente com a amostra, de maneira a evitar a presença de ar. O estoque das amostras deverá ser feito sob refrigeração sendo o prazo de validade de amostras resfriadas em gelo equivalente a 12 h. Caso as amostras sejam refrigeradas à temperatura menor que 10°C ou congeladas abaixo de -10°C, os prazos são de 48 horas e 60 dias, respectivamente. Após o congelamento, as amostras devem ser analisadas dentro de 12 h, não podendo haver recongelamento para uso futuro.

Cultivo de *Ceriodaphnia spp.* conforme ABNT NBR 13373:2017

Os organismos serão mantidos em lotes de até 70 adultos por litro (recipientes de até 1 000 mL) ou individualmente (recipiente com aproximadamente 15 mL) em água de diluição e mantidos em ambiente com luminosidade difusa, fotoperíodo de 12-16 h de luz e temperatura de 23-27°C. Nestas condições, espera-se que a primeira reprodução ocorrerá entre o terceiro e o quinto dias de vida. Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para o



ensaio, matrizes de diferentes faixas etárias (por exemplo, 0 a 7 dias, 7 a 14 dias e 14 a 21 dias) serão mantidas semanalmente.

A substituição da água de cultivo será feita totalmente no mínimo uma vez por semana, evitando diferença de temperatura maior que 2°C, dependendo da quantidade de organismos e do recipiente utilizado para o cultivo com utilização de pipeta de diâmetro adequado com ponta arredondada. Caso ocorra letalidade superior a 20% dos organismos adultos entre renovações consecutivas de água, não serão utilizados no ensaio os neonatos produzidos neste lote.

No caso de ocorrência de machos e, conseqüentemente efípios, devido a condições ambientais desfavoráveis, incluindo superpopulação e falta ou excesso de alimento, poderão afetar o cultivo de *Ceriodaphnia spp*, os organismos neonatos produzidos neste lote não serão utilizados no ensaio e será reavaliado o procedimento de cultivo. A alimentação dos organismos ao longo do cultivo será feita diariamente por fornecimento de algas (*Raphidocelis subcapitata*) respeitando a proporção de 1 a 5 x 10⁵ células por organismo. Adicionalmente, será fornecido aos organismos um complemento alimentar à base de ração fermentada ou outros meios nutritivos de acordo com a ABNT NBR 13373:2017.

Testes de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia spp* (conforme ABNT NBR 13373:2017)

Serão usados neonatos do gênero *Ceriodaphnia*, com idade de aproximadamente 6-24 h, obtidos por partenogênese de fêmeas adultas com idade entre 7 dias e 21 dias, durante pelo menos três gerações cultivadas sob as mesmas condições estabelecidas (temperatura, fotoperíodo e alimentação); conforme a ABNT NBR 13373:2017. A *Ceriodaphnia* utilizada no ensaio deverá ter idade inferior a 24 h e ser originada a partir de uma ninhada compreendendo no mínimo oito organismos recém-nascidos.

Um teste preliminar (TP) será realizado anteriormente ao definitivo com tempo de exposição equivalente a 24h e nas mesmas condições descritas a seguir para o teste definitivo com o objetivo de estabelecer um intervalo de soluções-teste a ser utilizado no teste de toxicidade definitivo. Serão utilizados no mínimo cinco organismos-teste por réplica. Ao final do ensaio será determinada a menor solução-teste que causa imobilidade a 100% dos organismos e a maior solução-teste na qual não será observada imobilidade.

De posse dos resultados obtidos pelo teste preliminar, será preparada uma série de soluções-teste intermediárias, cuja razão de diluição esteja entre 1,2 e 2. O controle será preparado com o mesmo número de réplicas das soluções-teste, somente com água de diluição. Oxigênio dissolvido e pH serão medidos, no mínimo, na maior e na menor concentrações das soluções-teste e no controle. Este procedimento será realizado no início e ao final do ensaio.

Para cada diluição e controle, serão preparadas 10 réplicas com aproximadamente 15 mL da solução teste em cada recipiente-teste, com alimento. Será adicionado um organismo-teste por réplica. No caso da determinação da CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado), serão utilizadas, no mínimo, cinco soluções-teste, além do controle. Os organismos serão transferidos de forma aleatória para as soluções-teste com uso de pipetas, evitando a alteração da concentração final. Deve-se ter cuidado ao liberar o

