

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática  
da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e  
Região Marinha e Costeira Adjacente**

**RELATÓRIO ANUAL PMBA/Fest-RRDM  
2020**

**ANEXO 6 – MEGAFUNA**

**Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas  
associados à foz do rio doce, plataforma continental e  
áreas protegidas adjacentes**

**METODOLOGIA**

**Câmara Técnica**

Adalto Bianchini

Alex Cardoso Bastos

Edmilson Costa Teixeira

Eustáquio Vinícius de Castro

Fabian Sá

Jorge Abdala Dergam dos Santo

#### 4.1. CETÁCEOS - PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM

##### 4.1.1 Ocorrência de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* na região que abrange a foz do rio Doce até a foz do rio Piraquê-açu, presença de filhotes na composição dos grupos observados e registro de comportamento de alimentação

*Monitoramento do uso do habitat por cetáceos em áreas adjacentes e da foz do Rio Doce a partir de avistagem por ponto fixo*

O monitoramento de cetáceos através do método de avistagem por ponto fixo iniciou-se na primeira semana de outubro de 2018. Os quatro pontos de observação determinados estão localizados em dois municípios distintos: Aracruz e Linhares.

No município de Aracruz, as observações acontecerão na foz do rio Piraqueaçu (Ponto A: -19,954150 -40,151417) e na praia da Sauna (Ponto B: -19,937917 -40,133617) (Fig. 1). Em Linhares, as observações acontecerão na foz do rio Rio Doce (Ponto A: -19,652667 -39,819850) e praia de Regência (Ponto B: -19,654400 -39,826767) (Fig. 2).

Binóculos (BUSHNELL 10x42MM, com alcance de 12km), serão utilizados nas observações por dois pesquisadores (em cada município), que se posicionarão no ponto fixo por 5 horas ininterruptas, sendo estas contabilizadas para amostragem de cada ponto, em cada uma das localidades (foz do rio Piraqueaçu, praia da Sauna, foz do rio Doce e praia de Regência). Será efetuada a alternância dos pontos praia e foz do rio, no intuito de variar as coletas em marés cheia e vazante. As ações de coleta, poderão iniciar-se às 4:30 hs e tardar até às 18:00 hs, considerando a claridade natural do dia e condições climáticas favoráveis (escala *Beaufort* de 0 a 3). O período do dia de observação entre os pontos “A” e “B” também será alternado, assim como relatado para as marés.

O método utilizado para as observações será a observação de grupo-focal com registro instantâneo do comportamento em intervalos de cinco minutos (DAURA-JORGE et al. 2005; AZEVEDO et al. 2007).

Quando avistados, os cetáceos serão registrados em espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localidade, e outras informações para análise dos dados (Anexo 1).

Figura 1: Pontos fixos na foz do Rio Piraqueaçu (A) e praia da Sauna (B), Aracruz – ES.



Figura 2: Pontos fixos na foz do Rio Doce (A) e praia de Regência (B), Linhares – ES.



### Monitoramento do uso do habitat por cetáceos em áreas adjacentes a foz do rio doce a partir de embarques

O monitoramento de cetáceos por meio de embarque terá início em outubro de 2018 e previsão de 12 meses de duração. A metodologia de amostragem será através da *Distance Sampling*, técnica na qual estima-se a densidade e abundância de cetáceos de forma eficaz (BUCKLAND et al., 2001). Essa amostragem é executada através de transecções lineares, que, distam 3 milhas náuticas da costa (Fig.3 e Fig.4).

Figura 3: Mapa da proposta de transectos para avistagem de cetáceos para o primeiro dia de embarque

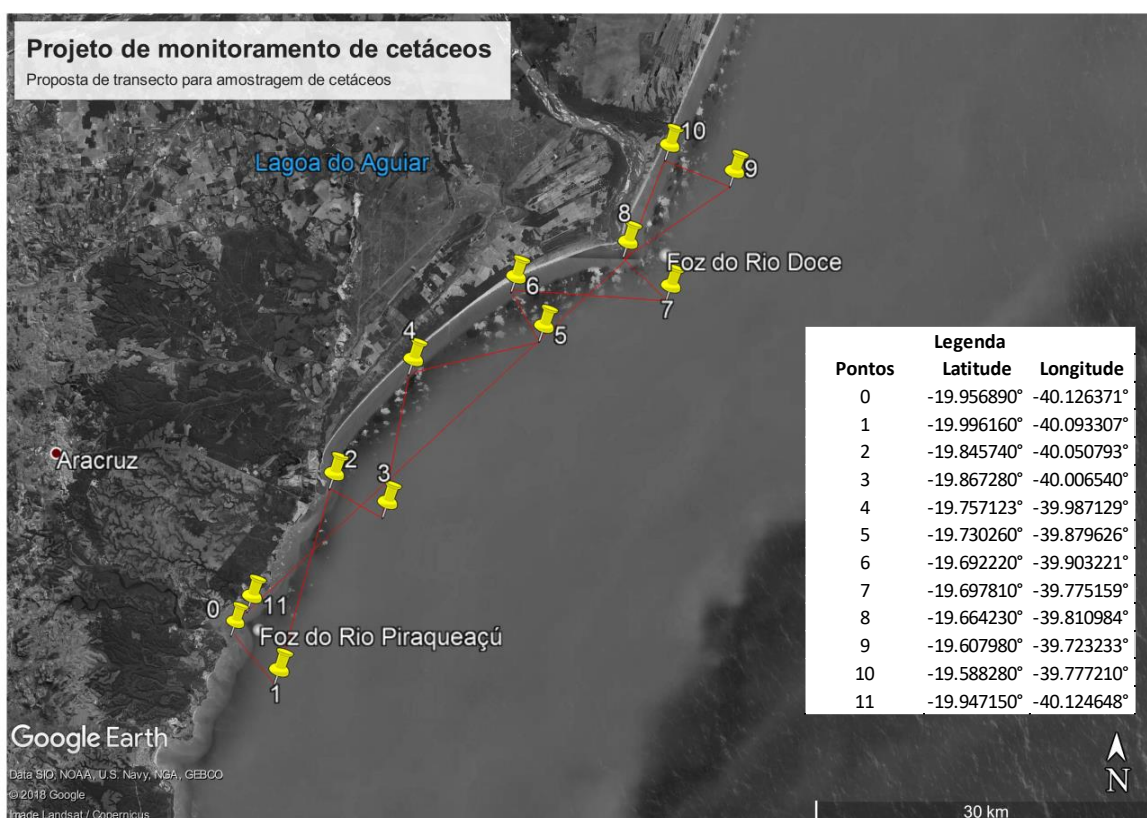
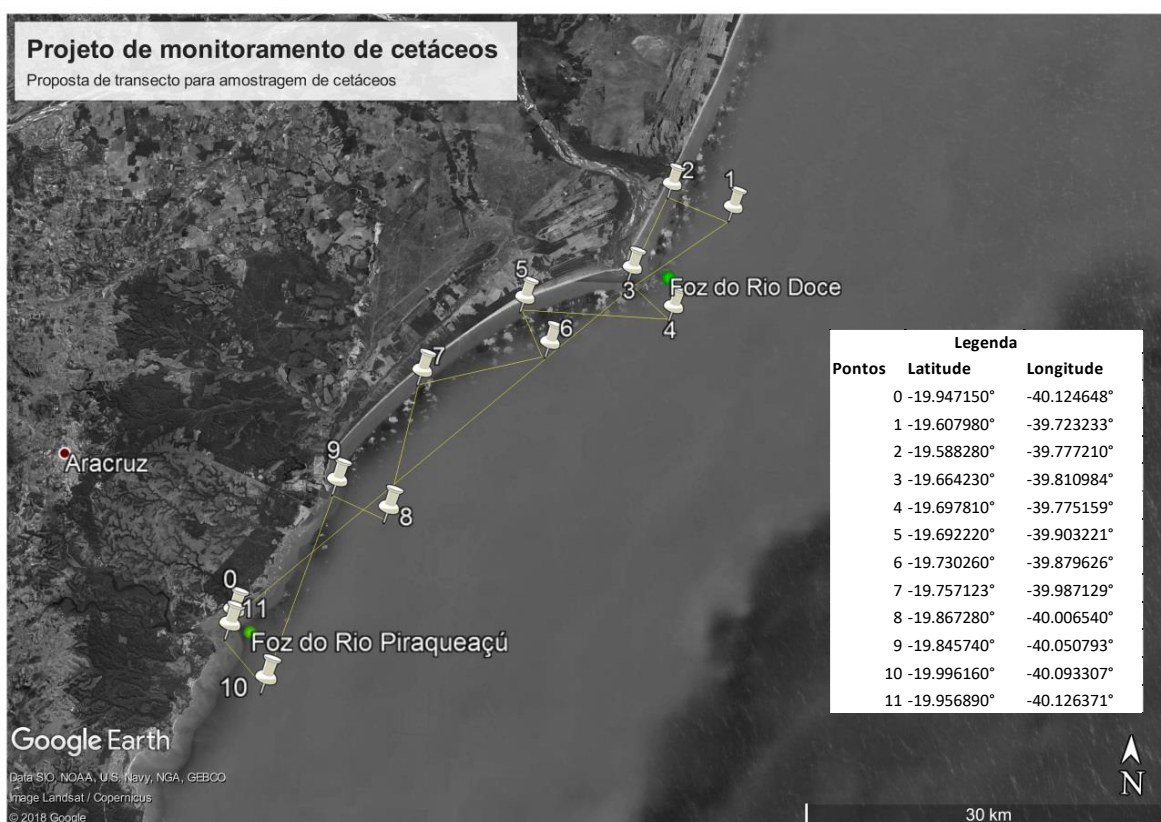


Figura 4: Mapa da proposta de transectos para avistagem de cetáceos para o segundo dia de embarque.



O embarque será mensal, tendo como ponto de partida provavelmente o porto do rio Piraqueaçu, em Santa Cruz. A cada mês, de forma alternada, o monitoramento está previsto para abranger a região ao sul da foz do Rio Doce até o Rio Piraqueaçu e a região ao norte da foz do Rio Doce, até a região de Povoação em Linhares, com previsão de 10 a 12 horas de duração. A embarcação utilizada atuará com velocidade de cruzeiro estimado de 7 nós. Baixas velocidades da embarcação oportunizam a detecção de cetáceos que estiverem parte do tempo indisponível, por estarem mergulhando, para amostragem por parte do observador, assim minimizando o viés de disponibilidade (MARSH & SINCLAIR, 1989).

Dois pesquisadores permanecerão simultaneamente em estado de observação, localizados na proa e popa da embarcação, respectivamente. Outros observadores, sempre que disponíveis, se posicionarão no través da embarcação. A fim de evitar a fadiga e possíveis vícios de observação individuais, haverá um revezamento entre observadores e anotadores. Os observadores procurarão cetáceos a “olho nu” e utilizando binóculos de 10 x 42. Serão embarcados cinco ou seis membros da equipe.

Quando um grupo de baleias e/ou golfinhos for avistado, serão registrados dados como: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localização exata (GPS), e outras informações já listadas nas fichas de campo pré-formuladas (ANEXO II: FICHAS DE CAMPO – CRUZEIROS DE AVISTAGEM). Serão feitas tentativas de aproximação, mantendo uma distância de segurança de 50 metros proposto por Schneider (1999). Caso a



aproximação seja inferior aos 50 metros, o motor será colocado em neutro ou mesmo desligado, para evitar comportamentos de repulsa. Mudanças de direção da embarcação, superiores a 45 graus, serão evitadas. A permanência com cada grupo será de, aproximadamente, no máximo 20 minutos. Se possível serão realizadas biópsias (pele e gordura) dos cetáceos para as análises genéticas e de contaminantes. Serão realizados alguns registros fotográficos e de vídeos durante as avistagens.

Para auxiliar na identificação das espécies, caso necessário, os observadores utilizarão guias de identificação e/ou registros fotográficos. Para um melhor resultado no monitoramento, será dada preferência para dias em que as condições marítimas estejam ao máximo de Beaufort 3 (ventos de 7-10 nós e ondulação de até 1m). Caso haja adversidades climáticas (baixa visibilidade e/ou chuvas persistentes) a amostragem poderá ser interrompida e transferida para outra data. Condições climáticas serão registradas na ficha de cruzeiro de pesquisa, disponível no ANEXO II.

#### **4.1.2 Taxa anual de encalhes, de distribuição sazonal e espacial, e de óbitos de cetáceos na costa do Espírito Santo**

O monitoramento dos encalhes de mamíferos marinhos é executado pelo Instituto Baleia Jubarte e o Instituto ORCA, que são membros da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Sudeste (REMASE) e atuam em parceria técnica com o PMP-BC/ES, que realiza o monitoramento das praias e destina os pequenos cetáceos encalhados de acordo com as instituições responsáveis pela sua área de atuação. No caso dos cetáceos de grande porte (acima de 3 metros) são atendidos no local, onde é realizado o exame necroscópico dos animais em óbito, e o atendimento em campo dos indivíduos vivos.

Os procedimentos de registro, resgate e exame de cetáceos encalhados seguem basicamente as recomendações do Protocolo da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE) (IBAMA, 2005). Além disso, grande parte dos procedimentos são baseados no guia Marine Mammals Ashore (Geraci & Lounsbury, 2005) e no Protocolo de Necrópsia de Baleias Francas (McLellan et al., 2004). Após a identificação da espécie, todos os animais sejam vivos ou mortos recebem uma identificação e são classificados por códigos: COD I (Animais vivos), COD II (Condição inicial de decomposição), COD III (Condição moderada de decomposição), COD IV (Condição avançada de decomposição) e COD V (Condição mumificada). Nos procedimentos de necropsia são realizados registros fotográficos, biometrias e execução de um exame externo e interno minucioso de cada animal. As colheitas de amostras biológicas são realizadas de acordo com os protocolos enviados pelas instituições parceiras, seguindo todos os procedimentos para garantir materiais viáveis para análise.

#### **4.1.3 Ecotoxicologia, Reprodução, Dieta, Genética, Histopatologia e Microbiologia**

As análises laboratoriais serão realizadas em amostras coletadas de carcaças de cetáceos recolhidas nas praias da área monitorada. Os animais encalhados, normalmente são encontrados mortos. Amostras de biópsias de cetáceos poderão ser coletadas durante os

cruzeiros do projeto. A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Relação dos parâmetros a serem analisados para cetáceos na área a ser monitorada.

<b>Amostra</b>	<b>Análise</b>
Músculo	Mercúrio
	Cádmio
	Ferro
	Cobre
	Manganês
	Zinco
	Arsênio
	Isótopos estáveis de C e N
Fígado	Mercúrio
	Cádmio
	Ferro
	Cobre
	Manganês
	Zinco
	Arsênio
	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Rim	Mercúrio
	Cádmio
	Ferro
	Cobre
	Manganês
	Zinco
Gordura	Arsênio
	Organoclorados
	Organobromados
Gônadas	Estágio reprodutivo
Dentes	Determinação de idade
Pele ou músculo	Diversidade genética

*1) Procedimento de coleta por análise:*

**a) Mercúrio e elementos-traço**

Serão coletadas amostras de músculo, fígado e rim de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). Aproximadamente 100g de amostras de músculo (dorsal, lado esquerdo),

fígado e rim (esquerdo) serão enviadas para UERJ. As amostras serão acondicionadas em saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

b) Organoclorados e organobromados

Serão coletadas amostras de gordura de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras deverão ter aproximadamente 100g e serão enviadas à UERJ. As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio (para evitar o contato com o plástico) dentro de saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

c) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Serão coletadas amostras de fígado de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras deverão ter aproximadamente 100g e serão enviadas à UERJ. As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio (para evitar o contato com o plástico) dentro de saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

d) Isótopos estáveis

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras de músculo deverão ter aproximadamente 20g. As amostras devem ser acondicionadas em saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer. As amostras serão enviadas à UERJ.

e) Análise reprodutiva

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). Os testículos e ovários serão pesados, medidos e fotografados.

Os ovários inteiros deverão ser identificados como direito e esquerdo, e fixados em formol 10%. É importante observar que para a preservação adequada a proporção amostra: preservativo deve ser de 1:10, podendo ser reduzida, após a completa formolização (mínimo de 48h), para o envio. Os ovários serão enviados à UERJ, onde serão examinados e um fragmento será coletado e encaminhado à UENF para análise histopatológica, seguindo o protocolo descrito abaixo (seção h).

Os testículos direito e esquerdo deverão ser seccionados longitudinalmente. Da face interna da metade direita deverão ser coletados três fragmentos de cerca de 1cm<sup>3</sup> cada, seguindo o protocolo de coleta para histopatologia. Os três fragmentos (das porções cranial, mediana e distal) serão colocados em um mesmo cassete histológico, identificado como direito ou esquerdo. O procedimento deve ser repetido para o outro testículo. Os dois cassetes devem ser acondicionados em um mesmo frasco identificado, contendo formol 10%, e observando a proporção de 1:10 descrita acima. Os testículos serão enviados à UERJ.

f) Genética



Deverão ser coletadas amostras de pele ou músculo de carcaças em qualquer estado de conservação. As amostras deverão ter tamanho aproximado de um grão de feijão. Idealmente, coletar duas amostras de cada animal e colocar em um mesmo microtubo. Preparar dois microtubos para cada animal. Armazenar em álcool 100% e se possível, guardar no freezer, até o envio para o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES/UFES, São Mateus, ES.

#### g) Idade

Para a determinação de idade devem ser enviados, preferencialmente, dentes da porção central da mandíbula esquerda. Os dentes devem ser macerados para eliminação do tecido e mantidos secos à temperatura ambiente, em frasco devidamente identificado. Para acelerar a análise, os dentes devem ser coletados durante a necropsia, armazenados em frasco e enviados junto com os tecidos para as análises de contaminantes, para serem macerados na UERJ, onde serão feitas as determinações de idade. É ideal enviar no mínimo 5 dentes de cada indivíduo, selecionando os mais retos. Também é ideal manter os outros dentes em coleção própria, caso seja necessário envio de mais dentes.

#### h) Histopatologia

Com a certificação do óbito dos animais encontrados nas praias será realizada a necrópsia com retirada de fragmento de tecidos para avaliação histopatológica no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Durante a necropsia os órgãos serão avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies e, os com suspeita de lesões, serão coletados em fragmentos com até 1 cm de espessura e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%, excetuando-se o coração, que será colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Caso não sejam observadas lesões aparentes, é recomendado, ao menos, a retirada de fragmentos dos seguintes órgãos: fígado, rim, testículos e dentes, os quais passarão pelo mesmo processo de fixação anteriormente citados. Cada amostra será fixada por um período mínimo de 48 horas e passará por todo o procedimento histotécnico para a confecção de lâminas histológicas. Será feita a leitura de cada lâmina e varredura a procura de alterações patológicas nos tecidos.

#### i) Microbiologia

Para as análises bacteriológicas, as amostras com lesões serão coletadas por meio de swabs estéreis os quais deverão ser remetidos refrigerados em caixa, isotérmica, com meio de transporte adequado para cada análise, ao laboratório imediatamente após o término das colheitas, para facilitar o isolamento do agente infeccioso.

Os swabs serão encaminhados para o Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Hospital Veterinário da UENF.

Posteriormente, serão semeados e processados em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Em seguida, as amostras serão incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Será realizado um esfregaço da cultura em lâmina histológica e visualização em microscópio de luz para a verificação da morfologia e coloração para gram. Testes de oxidase e catalase também serão realizados para auxiliar na classificação que será realizada através de chave de identificação. Também pode ser realizada a identificação microbiana com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica.

A seguir, com os micro-organismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas para posterior confecção dos laudos.

## *II. Procedimento de coleta por tecido*

Resumo das amostras a ser coletadas por tecido (veja detalhamento acima):

- a. Músculo: duas alíquotas (para mercúrio + elementos, e para isótopos);
- b. Fígado: duas alíquotas com coleta diferente (para mercúrio + elementos, e para HPAs);
- c. Rim esquerdo: uma alíquota (para mercúrio + elementos);
- d. Gordura: uma alíquota (para organoclorados + organobromados);
- e. Gônadas; ambos os ovários inteiros e fragmentos de ambos os testículos (para análise reprodutiva) (veja detalhamento acima);
- f. Dentes; mínimo de 5 dentes da porção central da mandíbula esquerda, o mais reto possível (para idade);
- g. Pele ou músculo (preferencialmente) para genética.

### III. Procedimento de coleta por estágio da carcaça

Quadro 2: Resumo das amostras a serem coletadas dependendo do estágio de decomposição da carcaça. Legenda: M – músculo, F – fígado, R – rim, G – gordura, T – testículo, O – ovário, P – pele, D – dente.

<b>Código de decomposição</b>	<b>Mercúrio + elementos</b>	<b>Clorados + bromados</b>	<b>HPAs</b>	<b>Isótopos</b>	<b>Reprodução</b>	<b>Genética</b>	<b>Idade</b>
2	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
3	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
4						M ou P	D
5						M ou P	D

#### 4.1.12 Interação dos cetáceos com a pesca

Serão entrevistados pescadores em cada uma das comunidades com base em um questionário pré-definido onde serão elencadas perguntas sobre a percepção destes em relação à chegada dos resíduos da Samarco na foz do Rio Doce e se a mesma afetou a dinâmica da pesca realizada por eles. Em cada comunidade serão entrevistados 15 pescadores, totalizando 90 entrevistas. A seleção dos entrevistados seguirá o modelo bola de neve onde é solicitado a um entrevistado que indique outros dois nomes para serem entrevistados e assim sucessivamente até cumprir o número de entrevistas programado na localidade. Não há critérios de exclusão, a única ressalva é que o entrevistado seja pescador. Antes das entrevistas eles serão informados sobre os objetivos do estudo e será preenchido um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). A identidade dos entrevistados não será divulgada e os TCLEs serão mantidos arquivados no Instituto Baleia Jubarte por um prazo de cinco anos. Ao responder as perguntas o entrevistado irá recordar a chegada da lama e como esta pode ter afetado sua vida. Rememorar eventos traumáticos pode trazer desconforto emocional e sofrimento. Por isso, será reforçado aos participantes que caso eles considerem que participar da pesquisa e ter lembranças associadas à chegada da lama podem afetá-lo emocionalmente podem desistir a qualquer momento.

Os dados coletados serão tabulados e analisados para entender a perspectiva dos pescadores das diferentes comunidades e da região como um todo, para isso será utilizado um teste estatístico não-paramétrico. Inicialmente o teste de escolha será o U de Mann-Whitney mas, à depender da quantidade e qualidade dos dados poderá ser estabelecido outro teste não paramétrico que seja mais adequado para a amostragem obtida.

Os questionários têm como objetivo avaliar a percepção ambiental dos pescadores com relação ao atual estado de conservação dos estoques pesqueiros (visão ecossistêmica) e dos impactos

da chegada dos rejeitos ao mar sobre suas atividades, buscando identificar significados, atitudes e valores (Whyte, 1977).

#### 4.1. CETÁCEOS - PROTOCOLO DE ANÁLISES

##### 4.1.1 Ocorrência de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* na região que abrange a foz do rio Doce até a foz do rio Piraquê-açu, presença de filhotes na composição dos grupos observados e registro de comportamento de alimentação

###### *Monitoramento por ponto fixo*

Para a análise dos dados, a frequência de cetáceos e seus padrões comportamentais observados serão analisados através de teste não paramétrico Kruskal-Wallis. As seguintes variáveis serão avaliadas de acordo com cada ponto de observação, localidade e variação da maré: média de cetáceos observados por hora, tamanho e composição do grupo (adultos e imaturos), status de comportamento. Para as análises comparativas, serão considerados também fatores de “interferências” como escala Beufort e fluxo de embarcações. Para a exposição dos resultados serão utilizados gráficos e tabelas.

###### *Monitoramento embarcado*

Será realizada a plotagem em mapas georreferenciados dos grupos de cetáceos observados na foz do rio Doce durante o monitoramento embarcado. As coordenadas geográficas de observação dos grupos serão integradas a um Sistema de Informações Geográficas (SIG) por meio de software livre através de diferentes camadas dos dados espaciais obtidos tais como linhas de transecção, profundidade, dentre outros.

Serão realizados cálculos de estimativas de densidade e abundância utilizando o programa *Distance*. De acordo com Buckland e colaboradores (2001), é necessário um número mínimo de detecções (observações) para se obter estimativa de densidade, cerca de 60 grupos. Já Williams & Thomas (2009) afirmam que até 18 grupos já foram usados em diversos casos. A taxa de encontro funciona como um índice de abundância, que reflete a abundância real das espécies em uma determinada área. Esse cálculo é feito dividindo-se o número de indivíduos/grupos pelo esforço amostral. A taxa de encontro será realizada de forma independente de se estimar a densidade.

##### 4.1.3 Índices de diversidade e estruturação genética de cetáceos no litoral do Espírito Santo

Os tecidos coletados serão utilizados em análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES (São Mateus), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Para a extração do DNA será utilizado o método de solução salina em que, um pequeno pedaço de músculo será picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, será obtido a solução contendo o DNA extraído. Ao final do processo o DNA será ressuspenso com a adição de 20 µL de ddH<sub>2</sub>O e armazenado na geladeira a 4°C. Em seguida, as amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro.

Em seguida o DNA será amplificado por PCR (Polymerase Chain Reaction). Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Cada amostra será submetida a reações de sequenciamento nos dois sentidos para avaliação de marcadores mitocondriais e genotipagem para avaliação de marcadores nucleares (microssatélites).

As sequências mitocondriais serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica ( $\pi$ ), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações.

As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999)

Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) e os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microssatélites a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

O desequilíbrio de ligação entre os locos será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também serão testados quanto à presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos stutter utilizando-se o programa Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al. 2004), com correção de Bonferroni.

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) e Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010).

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) será realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional será realizada uma análise de cluster bayesiana a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microssatélites e dos locais de coleta utilizando o software Structure v.2.3.2 (Pritchard et al. 2000). Após a alocação dos indivíduos em cada cluster, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também

serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbimed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Valores de P serão considerados significativos no nível de 0,01 ( $P \leq 0,01$ ) e 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os primers a serem utilizados serão ZFX0582, ZFX0923 (Bérube & Palsboll, 1996), PMSRYF (Richard et al. 1994) e TtSRYR (Rosel et al. 2003). As reações de PCR serão confeccionadas com: Tampão 10x, 150  $\mu$ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,3  $\mu$ M de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que será aplicado 0,06  $\mu$ M. O volume final será de 25  $\mu$ L. A amplificação será realizada nas seguintes condições: 92°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos serão separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética será realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas será realizada com o auxílio de luz UV e estas serão fotografadas.

#### **4.1.4 Alterações nas concentrações de elementos-traço em cetáceos**

As análises de contaminantes foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), alíquotas de aproximadamente 0,3g de músculo, fígado e rim das amostras frescas foram atacadas a frio com 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após essa etapa, foi adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>) v/v, seguido por aquecimento em banho-maria a 60°C por 2 horas até a solubilização completa da amostra. Os extratos foram resfriados por quinze minutos e foram adicionados 5mL de KMnO<sub>4</sub> (5%). As amostras retornaram ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e foram resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte, o extrato foi reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH<sub>3</sub>), 12%. O digerido final foi avolumado com água Milli-Q até 14mL. As determinações foram realizadas usando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (Malm et al. 1989; Bastos et al. 1998). A certificação do método de determinação do HgT foi feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de *Dogfish*) e DORM-2 (músculo de *Dogfish*) do *National Research Council* do Canadá, apresentando recuperação média de 104 $\pm$  6 % e de 97 $\pm$  4 %, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com coeficiente de variação aceitável de até 20%, além da utilização de brancos analíticos em todas as baterias. O limite de detecção do equipamento foi de 0,45  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> e de quantificação foi de 0,03  $\mu$ g.g<sup>-1</sup>. As recuperações médias dos materiais certificados foram de 97  $\pm$  4 % para o DORM-2 e 104  $\pm$  6 % para o DOLT-5. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

Para a determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn), alíquotas de aproximadamente 0,2g de músculo, fígado e rim foram colocadas em tubos com tampa. A

digestão das amostras foi realizada através da adição de 2mL de ácido nítrico concentrado (65%) que agiu *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram colocadas em banho-maria a 60°C por 2 horas (Dorneles et al., 2007; Lailson-Brito et al., 2012). Após o resfriamento das amostras, o digerido final foi avolumado com água Milli-Q até 10mL. A determinação das concentrações dos elementos foi realizada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS) equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Uma solução de nitrato de paládio ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ ), preparada a partir de uma solução padrão (Merck No.B9366989 710), foi utilizada como modificador químico. O controle de qualidade foi efetuado através do uso de materiais certificados de referência do *USA National Institute of Standards and Technology* e/ou do *National Research Council* do Canadá. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com coeficiente de variação aceitável de até 20%, além da utilização de brancos analíticos em todas as baterias. Os limites de detecção do equipamento foram: 6,33  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para arsênio (As); 0,10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para cádmio (Cd); 0,26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para cobre (Cu); 2,38  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para ferro (Fe); 0,36  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para manganês (Mn) e 1,42  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para Zinco (Zn). Já os limites de detecção dos métodos foram de: 0,30  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para As; 0,01  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para Cd; 0,01  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para Cu; 0,05  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para Fe; 0,02  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para Mn e 0,07  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para Zn. A recuperação do material certificado de referência DOLT-5 (em %) foi de: 99  $\pm$  17 para As; 101  $\pm$  5 para Cd; 97  $\pm$  6 para Cu; 105  $\pm$  8 para Fe e 106  $\pm$  7 para Zn. A recuperação do TORT-2 para Mn foi de 105  $\pm$  10 %. As concentrações do branco foram descontadas das concentrações das amostras quando estas estavam acima do limite de detecção. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

#### 4.1.5 Alterações nas concentrações de compostos organoclorados em cetáceos

As análises de contaminantes foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação de compostos organoclorados, cerca de 1g de gordura foi utilizada. Os padrões internos PCB 103 e PCB 198 foram adicionados às amostras e as extrações foram realizadas com aparelhos de soxhlet e balões volumétricos aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes utilizada na extração foi hexano e diclorometano (1:1) (v/v) e o conteúdo lipídico foi quantificado por gravimetria. O volume final foi reduzido para prosseguir às etapas de purificação com a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (LAILSON-BRITO et al., 2012; SANTOS-NETO et al., 2014) seguida de eluição em coluna de óxido de alumínio neutro com diclorometano e hexano (2:1) e diclorometano e metanol (9:1). Os pesticidas e as bifenilas policloradas (PCBs) foram mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massas (MS) e o GC-MS operou em modo de impacto de elétrons (EI). Foi aceita uma variação de  $\pm 30\%$  na recuperação do padrão interno. Ao todo foram analisados 7 pesticidas e 27 congêneres de PCB. As concentrações finais foram corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como a determinação do limite de detecção do equipamento. O limite de detecção para os pesticidas organoclorados variou entre 0,001 e 0,002  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$ ,



enquanto para os PCBs a variação foi entre 0,001 e 0,008  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$ . A certificação dos compostos se deu por meio da análise do material de referência de tecido adiposo de baleia-piloto (*Standard Reference Material* 1945, *National Institute of Standards and Technology*) e a recuperação dos compostos foi aceita de acordo com os critérios estabelecidos por Wade & Cantillo (1994). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

#### **4.1.6 Alterações nas concentrações de compostos organobromados de origem antrópica e de origem natural em cetáceos**

As análises de contaminantes foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação de compostos organobromados de origem antrópica e natural, cerca de 1g de gordura foi utilizada. O padrão interno PBDE 181 foi adicionado às amostras e as extrações foram realizadas com aparelhos de soxhlet e balões volumétricos aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes utilizada na extração foi hexano e diclorometano (1:1) (v/v) e o conteúdo lipídico foi quantificado por gravimetria. O volume final foi reduzido para prosseguir às etapas de purificação com a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , seguida de eluição em coluna de óxido de alumínio neutro com diclorometano e hexano (2:1) e diclorometano e metanol (9:1) (DORNELES et al., 2010; ALONSO et al., 2012). Os PBDEs e MeO-PBDEs foram mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS). O GC-MS foi operado no modo de ionização química negativa (ECNI). A amônia foi utilizada como gás reagente e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólo e interface foram ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS foi utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons  $m/z = 79$  e  $81$  (de tri- a heptaBDEs) monitorados durante toda a corrida. Foi aceita uma variação de  $\pm 30\%$  na recuperação do padrão interno. Os compostos organobromados de origem antrópica analisados consistiram em 7 congêneres de PBDEs, PBEB e HBBZ, além de 8 congêneres de MeO-BDE de origem natural. As concentrações finais foram corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através da determinação dos limites de detecção (LD) do equipamento. Dentre os compostos antrópicos, o LD variou entre 0,0001 e 0,0005  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$  enquanto dentre os compostos naturais, o LD variou entre 0,0001 e 0,0006  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$ . A certificação dos compostos se deu por meio da análise do material de referência de tecido adiposo de baleia-piloto (*Standard Reference Material* 1945, *National Institute of Standards and Technology*) e a recuperação dos compostos foi aceita de acordo com os critérios estabelecidos por Wade & Cantillo (1994). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

#### **4.1.7 Alterações nas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cetáceos**

As análises de contaminantes foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

A metodologia de análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi adaptada e otimizada a partir de procedimentos descritos pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, *Environmental Protection Agency*), Yoshimine e Carreira (2012) e por Barros (2014). Resumidamente, alíquotas de amostras liofilizadas foram pesadas e extraídas em soxhlet com diclorometano durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram reduzidas e purificadas através de um pré-fracionamento por cromatografia líquida em coluna aberta com alumina neutra desativada a 2%. A eluição foi realizada com diclorometano. Essa etapa foi realizada duas vezes. Em seguida, as amostras foram reduzidas em um evaporador rotativo a vácuo e a amostra passou por mais uma etapa de purificação em coluna cromatográfica aberta de vidro com alumina neutra desativada a 2%, sílica gel desativada a 5% e sulfato de sódio, e foi eluído uma mistura de hexano: diclorometano (1:1). O extrato foi reduzido em fluxo de nitrogênio, seguido da adição do padrão interno de quantificação e avolumados a 1mL com n-hexano. Todas as análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) com um analisador Quadrupólo com injetor automático, o qual operou no modo de Impacto de Elétrons. Foi aceita recuperação de 40 a 110% do padrão interno (WEIJS et al., 2016), com média de  $72,7 \pm 17,6 \%$ . Ao todo, foram analisados 6 HPAs de origem petrogénica e 12 HPAs de origem pirolítica. O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através da determinação dos limites de detecção (LD) do equipamento. Dentre os HPAs petrogénicos, o LD variou entre 0,0002 e 0,003  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$  enquanto dentre os HPAs pirolíticos, o LD variou entre 0,001 e 0,006  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{lip}$ . A certificação dos compostos se deu por meio da análise do material de referência de tecido de mexilhão (*Standard Reference Material 2977, National Institute of Standards and Technology*). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

#### **4.1.8 Razão isotópica de C e N em amostras de *S. guianensis* e *P. blainvillei***

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

A determinação das razões isotópicas de carbono e de nitrogênio foi realizada em tecido muscular dos cetáceos e das suas principais presas (peixes teleósteos – identificadas por meio da análise do conteúdo estomacal, e.g: Borobia & Barros, 1989; Di Benedito & Siciliano, 2007; Rupil et al. 2018). Alíquotas dos músculos foram secos em estufa à 50°C por 72h, macerados até se tornar um pó homogêneo e, então, pesados 0,3 mg de cada amostra em cápsula de estanho. A mensuração foi feita em espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS-Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao analisador elementar C-N-S (Flash 2000). As razões isotópicas são expressas pela notação delta ( $\delta$ ) em partes por mil, segundo a equação  $X = [(R_{amostra}/R_{padrão}) - 1] \times 1000$ , onde X é  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ , e R representa a razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Para o carbono o padrão utilizado é o fóssil Belemnita da formação PeeDee - PDB e para o nitrogênio o  $\text{N}_2$  atmosférico. O controle de qualidade analítico foi feito por meio do uso de materiais certificados de referência e brancos analíticos em todas as análises. Foi calculada a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra e quando o valor foi maior que 3,5, foi feita a normalização matemática dos resultados de  $\delta^{13}\text{C}$ , segundo a equação:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{normalizado}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{sem tratamento}} - 3,32 + 0,99 \cdot \text{C:N}$  (Post et al., 2007).

#### **4.1.9 Estrutura etária e sexual das populações de *S. guianensis* e *P. blainvillei***

As análises de determinação de estágio reprodutivo e de idade foram realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ.

A idade dos odontocetos foi estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, Growth Layer Groups), depositados na dentina e/ou cemento do dente desses animais (Perrin & Myrick, 1980). A determinação da idade foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo foram colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, foram realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, com cerca de 25 micrometros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento. Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente foram colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados foram colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lâminula e selados com Entellan. As leituras foram realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas foram coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, foram fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Fragmentos da região central do testículo contendo  $1\text{ cm}^3$  foram emblocados em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos foram seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções foram coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade foi avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também foram avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al., 1985). Os ovários foram inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, foram realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os corpora e folículos resultantes da ovulação foram registrados. A determinação da maturidade sexual foi baseada em Perrin e Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans foram consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteo ou albicans em um ovário foram consideradas maduras.

#### **4.1.10 Prevalência de histopatologias**

Amostras de tecidos colhidas durante a realização das necropsias dos cetáceos foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, clivadas em fragmentos menores e acondicionadas em histossetes plásticos para o processamento histológico no processador automático, onde foram desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras de tecidos foram cortados no micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica no microscópio óptico. As patologias ósseas foram identificadas com base na avaliação morfológica dos ossos após o processo de maceração, considerando a comparação com o padrão anatômico normal, conforme registros da literatura para a espécie.

#### **4.1.11 Prevalência de patógenos bacterianos e fúngicos**

Para as análises microbiológicas, as amostras coletadas com *swab* com meio *stuart* foram semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agares) para o crescimento de microrganismos patogênicos. Posteriormente, as amostras foram incubadas em estufas e aquelas que apresentaram crescimento bacteriano/fúngico foram repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Após esses processos, foram realizadas as identificações microbianas por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os microrganismos identificados, foram realizados os antibiogramas e/ou antifungigramas.

#### **4.1.12 Interação dos cetáceos com a pesca**

Serão entrevistados pescadores em cada uma das comunidades com base em um questionário pré-definido onde serão elencadas perguntas sobre a percepção destes em relação à chegada dos resíduos da Samarco na foz do Rio Doce e se a mesma afetou a dinâmica da pesca realizada por eles. Em cada comunidade serão entrevistados 15 pescadores, totalizando 90 entrevistas. A seleção dos entrevistados seguirá o modelo bola de neve onde é solicitado a um entrevistado que indique outros dois nomes para serem entrevistados e assim sucessivamente até cumprir o número de entrevistas programado na localidade. Não há critérios de exclusão, a única ressalva é que o entrevistado seja pescador. Antes das entrevistas eles serão informados sobre os objetivos do estudo e será preenchido um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). A identidade dos entrevistados não será divulgada e os TCLEs serão mantidos arquivados no Instituto Baleia Jubarte por um prazo de cinco anos. Ao responder as perguntas o entrevistado irá recordar a chegada da lama e como esta pode ter afetado sua vida. Rememorar eventos traumáticos pode trazer desconforto emocional e sofrimento. Por isso, será reforçado aos participantes que caso eles considerem que participar da pesquisa e ter lembranças associadas à chegada da lama podem afetá-lo emocionalmente podem desistir a qualquer momento.

Os dados coletados serão tabulados e analisados para entender a perspectiva dos pescadores das diferentes comunidades e da região como um todo, para isso será utilizado um teste estatístico não-paramétrico. Inicialmente o teste de escolha será o U de Mann-Whitney mas, à depender da quantidade e qualidade dos dados poderá ser estabelecido outro teste não paramétrico que seja mais adequado para a amostragem obtida.

Os questionários têm como objetivo avaliar a percepção ambiental dos pescadores com relação ao atual estado de conservação dos estoques pesqueiros (visão ecossistêmica) e dos impactos da chegada dos rejeitos ao mar sobre suas atividades, buscando identificar significados, atitudes e valores (Whyte, 1977).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M. B. et al. Natural and anthropogenically-produced brominated compounds in endemic dolphins from Western South Atlantic: Another risk to a vulnerable species. *Environmental Pollution*, v. 170, p. 152–160, 1 nov. 2012.
- AZEVEDO, A. F., A. M. OLIVEIRA, S. C. VIANA E M. VAN SLUYS., 2007. Habitat Use by Marine Tucuxis (*Sotalia Guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) In Guanabara Bay, South-Eastern Brazil. *Journal of The Marine Biological Association Of The United Kingdom* 87:201-205.
- AZEVEDO-SILVA, C. E. DE et al. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 2, p. 294–298, 1 fev. 2009.
- BANDELT, HJ.; Foster, P.; Rohl, A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p 37-48, 1999.
- BARROS, I.P. 2014. Caracterização da contaminação do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) da baía de Guanabara por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2014. 92f. Monografia (Bacharelado em Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- BASTOS, W. R. et al. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brasil. *Ciência e Cultura*, v. 50, n. 4, p. 255-260, 1998.
- BECAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. *Nobel*, 1976.
- BÉRUBÉ, M.; PASBØLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, v. 5, n. 2, p. 283-287, 1996.
- BUCKLAND, S.T.; ANDERSON, D.R.; BURNHAM, K.P.; LAAKE, J.L.; BORCHERS, D.L. & THOMAS, L. 2001. Introduction to distance sampling. Oxford university. Press, oxford.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- COVACI, A.; KOPPEN, G.; Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. *Chemosphere*, v. 48, p.827-832, 2002.
- CREMER M. J., PINHEIRO, P. C., SIMOES-LOPES, P. C., 2012. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 102 (2), 131-137.
- DAURA-JORGE, F. G., L. L. WEDEKIN, V. Q. PIACENTINI E P. C. SIMÕES-LOPES., 2005. Seasonal and Daily Patterns Of Group Size, Cohesion And Activity Of The Estuarine Dolphin,

*Sotalia Guianensis* (P.J. Van Bénédén) (Cetacea, Delphinidae), In Southern Brazil. *Revista Brasileira De Zoologia* 22:1014-1021.

DI BENEDITTO, A. P. M., RAMOS, R. M. A., 2004. Biology of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 4, 1245–1250.

DI BENEDITTO, A. P. M., SANTOS, M. V. B., VIDAL, JR M. V., 2009. Comparison between the diet of two dolphins from south-eastern Brazil: proximate-composition and caloric value of prey species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 89, 903-905.

DORNELES, P. R. et al. Cadmium concentration in Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from South Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, n. 3, p. 179–186, 2007.

ELLISON, A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7:509–520.

Environmental Protection Agency (EPA).

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564-567, 2010.

FÉLIX, G.B.V. *Ocorrência e captura accidental de golfinhos no extremo norte do litoral do Espírito Santo*. 2011. 54 p. Dissertação de monografia em Ciências Biológicas Bacharel, Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES. 2011.

GERACI, J. R., AND V. J. LOUNSBURY. 2005. Marine mammals ashore: A field guide for strandings. *Texas A&M Sea Grant Publication*, Galveston, TX.

GIRUNDI, I. S., *Dieta de Sotalia guianensis (VAN BÉNÉDEN, 1864) (Cetacea, Delphinidae), no estado do Espírito Santo, Brasil*. Monografia de graduação. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

GOUDET, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.

HOHN, A.A.; CHIVERS, S.J.; BARLOW, J. Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins *Stenella attenuata*, in the eastern tropical pacific. *Marine Mammals Science*, v.1, n.4, p. 273-293, 1985.

KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

LAILSON-BRITO, J.; DORNELES, P.R.; AZEVEDO-SILVA, C.E.; AZEVEDO, A.F.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.; VIDAL, L.; MALM, O.; TORRES, J. PPCB, DDT and HCB in blubber of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from southeastern brazilian coast. *Organohalogen Compounds*, v. 69, p. 1748-1750, 2007.



LAILSON-BRITO, J. et al. Mercury-Selenium relationships in liver of Guiana Dolphin: The possible role of Kupffer cells in the detoxification process by Tiemannite formation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012

LOPES, X. M., SILVA, E., BASSOI, M., SANTOS, R. A.; SANTOS, M. C. O. Feeding habits of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from southeastern Brazil: new items and a knowledge review. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 92, 1723-1733, 2012.

MALM, O. Utilização do acessório de vapor frio para investigação de mercúrio em amostras ambientais por espectrofotometria de absorção atômica. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 41, p. 88-92, 1989.

MARSH, H. & SINCLAIR, D.F. 1989. Correcting for visibility bias in strip transect aerial surveys of aquatic fauna. *Journal of Wildlife Management*, 53(4): 1017- 1024.

PANSARD K. C. A., GURGEL H. C. B., ANDRADE L. D. A., YAMAMOTO M. E. Feeding ecology of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) on the coast of the Rio Grande do Norte, Brazil. *Mar. Mamm. Sci.* 27, 673-687, 2010.

PARNELL, A.C., INGER, R., BEARHOP, S. & JACKSON, A.L. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS ONE* 5:e9672.

PERRIN, W. F.; G. P. DONOVAN. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth. 1984.

PERRIN, W.; MYRICK, A. C. *Age determination of toothed whales and sirenians*. Cambridge ([Red House Station Rd. Histon Cambridge CB4 4NP]): International Whaling Commission, 1980.

PETERSON, B. J.; FRY, B. *Stable Isotopes in Ecosystem studies*. Attn. Rev. Ecol. Syst. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.annualreviews.org/aronline](http://www.annualreviews.org/aronline)>.

PINEDO, M. C.; HOHN, A. A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for a precision in the age estimation. *Marine Mammal Science*, v. 16, n. 1, p. 1-27, 2000.

POST, D.M. et al. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152:179-189.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, n. 155, p. 945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248–249, 1995.

RODRIGUES, V. L. A., *Dieta e ecologia alimentar do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetartiodactyla: Delphinidae), na região do Banco dos Abrolhos, costa central do Brasil.*

Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 103-106, 2008.

SANTOS-NETO, E. B. et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. *Science of The Total Environment*, v. 472, p. 194–203, 15 fev. 2014.

SCHNEIDER, K., 1999. Behaviour and Ecology of Bottlenose Dolphins in Doubtful Sound, Fiordland, New Zealand. PhD thesis. University of Otago, Dunedin, New Zealand.

TAMURA, K ET AL. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 535-538, 2004.

VOORSPOELS, S.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Polybrominated Diphenyl Ethers in Marine Species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, Profiles, and Distribution. *Environmental Science & Technology*, v.37, p. 4348-4357, 2003.

WILLIAMS, R. & THOMAS, L. 2009. Cost-effective abundance estimation of rare animals: testing performance of small-boat surveys for killer whales in British Columbia. *Biological Conservation*, 142: 1542-1547.

## **EQUIPE DE PESQUISADORES**

### **CEUNES / UFES**

Ana Paula Cazerta Farro  
Drienne Messa Faria  
Dahiani Nunes Bossi  
Jordana Borini Freire  
Mylla Carla Cescon Freire  
Fábio Ribeiro Mendes  
Pollyanna Braga Machado  
Paulo Holz de Souza  
Vanessa Kuboyama Marques de Oliveira

### **UERJ**

José Lailson Brito Jr  
Alexandre de Fritas Azevedo  
Tatiana Lemos Bisi  
Haydée Andrade Cunha  
Monizze Vannuci  
Elitieri Batista Neto  
Bárbara Manhães Moura  
Alice de Souza Picaluga  
Gleici Montanini dos Santos  
Emi Brinatti Guari

### **UENF**

Leonardo Serafim da Silveira  
Gina Nunes Teixeira  
Juliana Ywasaki Lima  
Letícia Versiani Gomes da Silva

### **IBJ**

Milton Marcondes  
Eduardo Camargo  
Hernani Ramos  
Adriana Colosio

### **ORCA**

Lupercio Araujo Barbosa  
João Marcelo Ramos Nogueira  
Thais do Rego Sciarretta  
Ian Augusto Gusman Cunha  
Higor Santos Oliveira

## ANEXO 1: FICHAS DE CAMPO – MONITORAMENTO PONTO FIXO

[illegible]

## ANEXO 2: FICHAS DE CAMPO – CRUZEIROS DE AVISTAGEM (EMBARQUES)

### FICHA CRUZEIRO DE PESQUISA

Cruzeiro nº:	Data:     /     /	Embarcação:
--------------	-------------------	-------------

Coordenador: _____
Participantes: _____
Rota: _____

<b>MANHÃ</b>	Amostragem: Início ____:____ até ____:____ (Total: ____ min.) Distância amostrada: _____ mn	
	Latitude Inicial: _____ °S	Latitude Final: _____ °S
	Longitude Inicial: _____ °W	Longitude Final: _____ °W

<b>TARDE</b>	Amostragem: Início ____:____ até ____:____ (Total: ____ min.) Distância amostrada: _____ mn	
	Latitude Inicial: _____ °S	Latitude Final: _____ °S
	Longitude Inicial: _____ °W	Longitude Final: _____ °W

Total em esforço de avistagem: _____ minutos	Fichas nº _____ a _____
Distância Amostrada: _____ milhas náuticas	Nº de biópsias: _____
Nº total de indivíduos: _____	Nº de filhotes: _____
Espécies avistadas/quantidade: ( ) __ Boto-Cinza ( ) __ Toninha ( ) __ Jubarte ( ) __ outra: _____	
Observações: _____ _____	

METEOROLOGIA	1ª TOMADA	2ª TOMADA	3ª TOMADA	4ª TOMADA	5ª TOMADA	6ª TOMADA
HORÁRIO						
POSIÇÃO GEOGRÁFICA	Latitude	Latitude	Latitude	Latitude	Latitude	Latitude
	Longitude	Longitude	Longitude	Longitude	Longitude	Longitude
VISIBILIDADE						
VENTO: VEL./ DIREÇÃO						
MAR (Beaufort)						
COBERTURA DO CÉU (%)						
PROFUNDIDADE (pés)						
TRANSPARÊNCIA (m)						
Observações: _____ _____						

## FICHA OBSERVAÇÃO DE GOLFINHOS

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos)		<b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____		
Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S		<b>Presença de aves:</b> ( ) S ( ) N
Ponto no GPS: _____ °W _____ °W		
Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		
Interação entre grupos: ( ) S ( ) N - Presença de embarcação: ( ) S ( ) N - Tipo: _____		

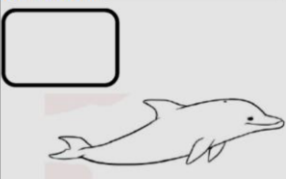
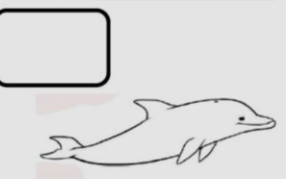

<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b>		
	[ ] ( ) { } surf	[ ] ( ) { } espiar	[ ] ( ) { } salto parcial _____
	[ ] ( ) { } deslocamento [ ]	( ) { } { } exp. ventral	[ ] ( ) { } cambalhota _____
	[ ] ( ) { } perseguindo presa	[ ] ( ) { } serpentear	[ ] ( ) { } batida de cauda _____
	[ ] ( ) { } batida de cabeça	[ ] ( ) { } controle objetos	[ ] ( ) { } exibir peitorais _____
	[ ] ( ) { } merg. em deslocamento	[ ] ( ) { } Nadar junto ao barco	[ ] ( ) { } salto total _____
Observações _____			

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos)		<b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____		
Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S		<b>Presença de aves:</b> ( ) S ( ) N
Ponto no GPS: _____ °W _____ °W		
Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		
Interação entre grupos: ( ) S ( ) N - Presença de embarcação: ( ) S ( ) N - Tipo: _____		

<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b>		
	[ ] ( ) { } surf	[ ] ( ) { } espiar	[ ] ( ) { } salto parcial _____
	[ ] ( ) { } deslocamento [ ]	( ) { } { } exp. ventral	[ ] ( ) { } cambalhota _____
	[ ] ( ) { } perseguindo presa	[ ] ( ) { } serpentear	[ ] ( ) { } batida de cauda _____
	[ ] ( ) { } batida de cabeça	[ ] ( ) { } controle objetos	[ ] ( ) { } exibir peitorais _____
	[ ] ( ) { } merg. em deslocamento	[ ] ( ) { } Nadar junto ao barco	[ ] ( ) { } salto total _____
Observações _____			

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos)		<b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____		
Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S		<b>Presença de aves:</b> ( ) S ( ) N
Ponto no GPS: _____ °W _____ °W		
Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		
Interação entre grupos: ( ) S ( ) N - Presença de embarcação: ( ) S ( ) N - Tipo: _____		

<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b>		
	[ ] ( ) { } surf	[ ] ( ) { } espiar	[ ] ( ) { } salto parcial _____
	[ ] ( ) { } deslocamento [ ]	( ) { } { } exp. ventral	[ ] ( ) { } cambalhota _____
	[ ] ( ) { } perseguindo presa	[ ] ( ) { } serpentear	[ ] ( ) { } batida de cauda _____
	[ ] ( ) { } batida de cabeça	[ ] ( ) { } controle objetos	[ ] ( ) { } exibir peitorais _____
	[ ] ( ) { } merg. em deslocamento	[ ] ( ) { } Nadar junto ao barco	[ ] ( ) { } salto total _____
Observações _____			




Foto: _____ Zoom: _____ Posição Social: _____ 	Distância: _____ Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____	Foto: _____ Zoom: _____ Posição Social: _____ 	Distância: _____ Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____	Foto: _____ Zoom: _____ Posição Social: _____ 	Distância: _____ Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____
Grupo ____		Grupo ____		Grupo ____	

## FICHA OBSERVAÇÃO DE JUBARTE

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos) Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____ Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S Ponto no GPS: _____ °W _____ °W Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		<b>G.Competitivo</b> ( ) S ( ) N  <b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b> [ ] ( ) { } repouso [ ] ( ) { } espiar [ ] ( ) { } salto _____ [ ] ( ) { } deslocamento [ ] ( ) { } exp. ventral [ ] ( ) { } exp. caudal em mergulho _____ [ ] ( ) { } exp. cauda parada [ ] ( ) { } serpentear [ ] ( ) { } batida de cauda _____ [ ] ( ) { } batida de cabeça [ ] ( ) { } canto [ ] ( ) { } batida de peitorais _____ [ ] ( ) { } emissão de ruído [ ] ( ) { } merg. em desloc. [ ] ( ) { } salto/golpe de caudal _____ [ ] ( ) { } exalação de bolhas	
	Observações _____	

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos) Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____ Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S Ponto no GPS: _____ °W _____ °W Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		<b>G.Competitivo</b> ( ) S ( ) N  <b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b> [ ] ( ) { } repouso [ ] ( ) { } espiar [ ] ( ) { } salto _____ [ ] ( ) { } deslocamento [ ] ( ) { } exp. ventral [ ] ( ) { } exp. caudal em mergulho _____ [ ] ( ) { } exp. cauda parada [ ] ( ) { } serpentear [ ] ( ) { } batida de cauda _____ [ ] ( ) { } batida de cabeça [ ] ( ) { } canto [ ] ( ) { } batida de peitorais _____ [ ] ( ) { } emissão de ruído [ ] ( ) { } merg. em desloc. [ ] ( ) { } salto/golpe de caudal _____ [ ] ( ) { } exalação de bolhas	
	Observações _____	

Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ (Total _____ minutos) Horário de aproximação: _____ Profundidade: _____ Fotógrafo: _____ Posição geográfica <b>INICIAL:</b> _____ °S <b>FINAL:</b> _____ °S Ponto no GPS: _____ °W _____ °W Nº de Indivíduos: _____ Composição social: _____		<b>G.Competitivo</b> ( ) S ( ) N  <b>Filhote:</b> ( ) S ( ) N
<b>Grupo</b>	<b>Comportamentos observados: [ ] antes da aproximação ( ) após a aproximação { } filhote</b> [ ] ( ) { } repouso [ ] ( ) { } espiar [ ] ( ) { } salto _____ [ ] ( ) { } deslocamento [ ] ( ) { } exp. ventral [ ] ( ) { } exp. caudal em mergulho _____ [ ] ( ) { } exp. cauda parada [ ] ( ) { } serpentear [ ] ( ) { } batida de cauda _____ [ ] ( ) { } batida de cabeça [ ] ( ) { } canto [ ] ( ) { } batida de peitorais _____ [ ] ( ) { } emissão de ruído [ ] ( ) { } merg. em desloc. [ ] ( ) { } salto/golpe de caudal _____ [ ] ( ) { } exalação de bolhas	
	Observações _____	

Padrão:	Foto:	Zoom:	Distância:	Padrão:	Foto:	Zoom:	Distância:	Padrão:	Foto:	Zoom:	Distância:
ID OK:				ID OK:				ID OK:			
Posição Social:				Posição Social:				Posição Social:			
											
Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____				Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____				Biópsia nº _____ ( ) pele em álcool ( ) gordura Reação: Sim ( ) Não ( ) Qual: _____			
Grupo ____				Grupo ____				Grupo ____			



### DESTINOS DAS AMOSTRAS DE CETACEOS

Destino Final	Amostra	Instituição	Endereço	Cidade/Município/Estado	CEP	Contatos	CNPJ
Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA)	Músculo ou pele	Universidade Federal do Espírito Santo - CEUNES	BR101, Km 60, Litorâneo	São Mateus/ Espírito Santo	29932-540	Ana Paula Cazerta Farro: (27) 3312-1545 <a href="mailto:Farro.ana@gmail.com">Farro.ana@gmail.com</a> Drienne Messa Faria <a href="mailto:drimessa@hotmail.com">drimessa@hotmail.com</a>	
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)  Faculdade de Oceanografia  Depto de Oceanografia Biológica  Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA)	Músculo, Fígado, Rim, Gordura, Gônadas (Testículo e Ovário), Dentes	UERJ	Rua São Francisco Xavier, 524 / Térreo, Bloco E (em frente ao portão 7) – Maracanã	Rio de Janeiro / RJ	20550-013	Haydée Cunha ( <a href="mailto:haydeecunha@yahoo.com.br">haydeecunha@yahoo.com.br</a> )  Monizze Vannuci ( <a href="mailto:monizze@hotmail.com">monizze@hotmail.com</a> )	33.540.014/0001-57
Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário	Músculo, Fígado, Rim, Gordura, Gônadas, Dentes, Pele	UFES	Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia  Campos dos Goytacazes - RJ	Campos dos Goytacazes / RJ	28013-602	Leonardo Serafim <a href="mailto:leoseraf@gmail.com">leoseraf@gmail.com</a>	

