

**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 – MEGAFAUNA

**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 Santos

3. TARTARUGAS	3
3.1 ÁREA DE ESTUDO E PROCEDIMENTOS DE CAMPO	3
3.2 PROCEDIMENTOS DE GENÉTICA	6
3.3 PROCEDIMENTOS DE SAÚDE	8
3.4 ANÁLISES DE DADOS	9
3.4.1 Genética	9
3.4.2 Saúde	11
3.5 ALTERAÇÕES METODOLÓGICAS (CAMPO E LABORATÓRIO) OCORRIDAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO.	13
3.5.1 Área De Estudo E Procedimentos De Campo	13
3.5.2 Coleta Do Material Biológico E Procedimentos Laboratoriais	13

3. TARTARUGAS

3.1 ÁREA DE ESTUDO E PROCEDIMENTOS DE CAMPO

A procura por fêmeas adultas de tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) e tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) ocorreu no município de Linhares, norte do Espírito Santo, uma das principais áreas de desova de tartarugas do estado (Figura 2). A região é monitorada pela equipe do Projeto TAMAR que faz rondas noturnas para flagrante das fêmeas e rondas diurnas para monitoramento dos ninhos. Durante o período de nidificação nas temporadas reprodutivas de 2018/2019 (Ano 1) e 2019/2020 (Período de Transição – PT), foram monitorados um trecho de praia próximo à foz do rio Doce, que abrangeu toda a praia de Povoação a partir do km 38 (lat.-19,652033, long.-39,814616) e se estendeu por mais 13 km a norte até o km 51, início da praia Monsarás (lat.-19,540880, long.-39,763120) (Figura 2). Foram georreferenciados e monitorados seis ninhos de *C. caretta* (N=3) e *D. coriacea* (N=3) para que os eventuais natimortos, ovos não eclodidos e areia fossem coletadas após a emergência dos demais filhotes em cada um dos ninhos. O estudo também realizou coletas em três áreas controle, onde não houve exposição à pluma principal de rejeitos, com o intuito de observar se ocorreram diferenças clínicas e laboratoriais entre os dois grupos e sua relação com os níveis de elementos traço analisados. Para a espécie *C. caretta* foi amostrada a área de reprodução da Praia do Forte, Mata de São João, BA (lat. 12,55563, long. -37,98918) para o Ano 1 e Areembepe para o PT e para *C. mydas* foi amostrada a região do banco dos Abrolhos, no entorno da ilha de Coroa Vermelha, Nova Viçosa, BA (lat. -17,956977, long. -39,219050) (Figura 2).

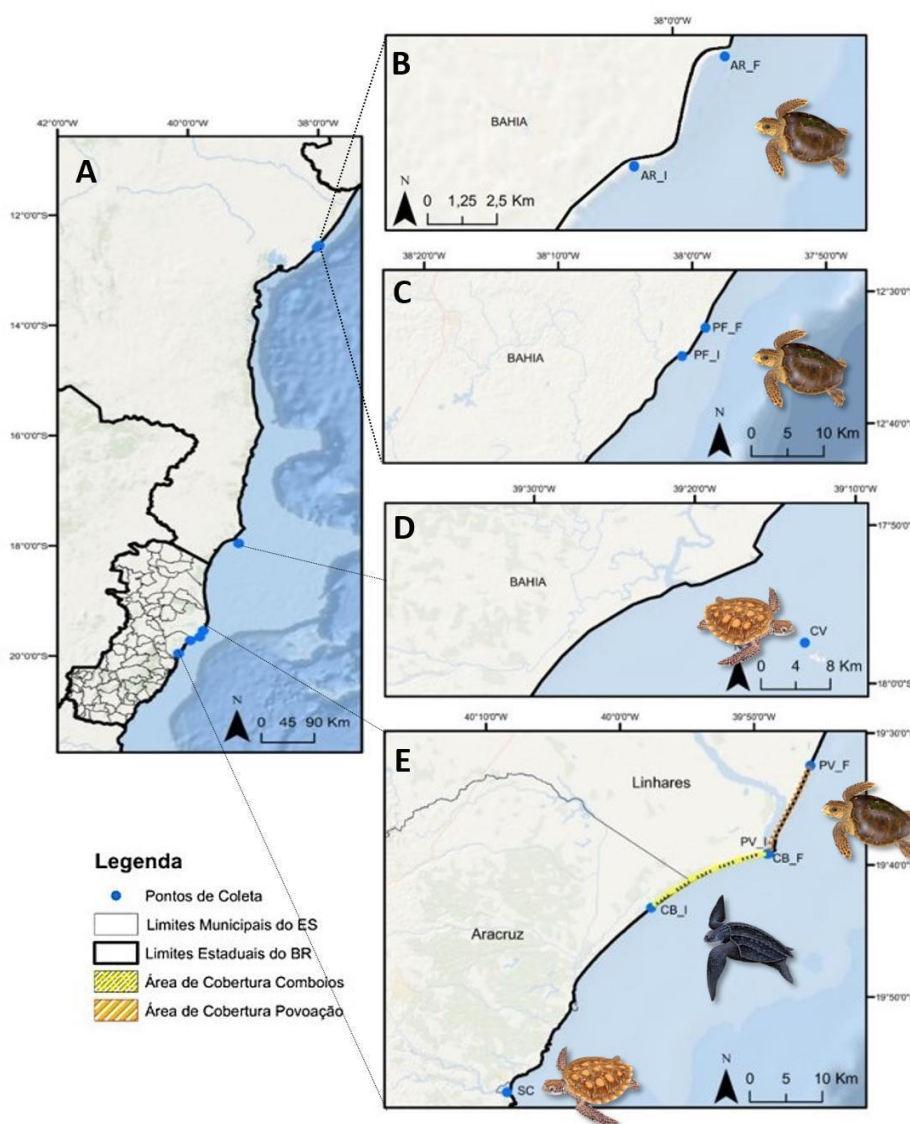
Figura 1: Tartarugas marinhas monitoradas na área de estudo. (A) *Caretta caretta*; (B) *Chelonia mydas*; (C) *Dermochelys coriacea*.



Durante as rondas noturnas, quando a equipe do TAMAR encontrava alguma fêmea de *C. caretta* ou *D. coriacea* desovando, nossa equipe era contatada para execução dos procedimentos experimentais. A contenção física dos animais coletados foi necessária para tomada das medidas biométricas: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medida do ponto cranial da linha média da

carapaça até o ponto caudal, largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais com fita métrica, e peso com dinamômetro analógico Pesola. Os animais capturados foram identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebeu uma numeração única para que em seguida a coleta do material biológico fosse realizada por nossa equipe.

Figura 2: Mapa das áreas de estudo, demonstrando a distribuição dos pontos de coleta para as populações de tartarugas marinhas (A). Detalhe para a distribuição dos locais de coleta para (B) *Caretta caretta* de Arembépe, BA - Área Controle; (C) *Caretta caretta* de Praia do Forte, BA - Área Controle; (D) *Chelonia mydas* - Coroa Vermelha, BA - Área Controle; (E) *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* de Praia de Povoação e Comboios, ES, e *Chelonia mydas* de Santa Cruz, ES.



Nota: AR= Arembépe; CB=Comboios; CV=Coroa Vermelha; PF = Praia do Forte; PV=Povoação; SC=Santa Cruz; I=Inicial; F=Final.

Como não há registros de desovas de *Chelonia mydas* (tartaruga-verde, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) nessa região, as capturas de indivíduos da espécie ocorreram na área de alimentação mais próxima da foz do rio Doce, na APA Costa das Algas, no distrito de Santa Cruz, próximo a foz do rio Piraquê-Açu, Aracruz, ES (lat. -19,953439, long.-40,140484). Por esta população de *C. mydas* ser composta de indivíduos em fase juvenil e não saírem da água durante esta fase, foram necessários embarques para captura desses animais com rede de espera. A equipe de coleta ficou em um barco à motor de 12 m, tendo um bote de alumínio à motor que foi utilizado para deslocamento do barco principal até o ponto de disposição da rede para revisão e captura das tartarugas que eventualmente ficassem emalhadas. Foi utilizada uma rede de emalhe de 200 m de comprimento por 4 m de altura, malha de 10 cm, que era conferida a cada 30 minutos em um período que variou de 6 a 8 horas de amostragem diária. Após a captura, as tartarugas eram levadas para o barco principal para realização dos procedimentos de registro biométrico (CCC, LCC), pesagem, identificação com marcas de inonel numeradas, coleta de material biológico e registro fotográfico em foto-quadrante. Cinco campanhas de captura foram realizadas e distribuídas da seguinte maneira:

- Campanha 1 – 09/11/2018 a 11/11/2018.
- Campanha 2 – 11/02/2019 a 14/02/2019.
- Campanha 3 – 01/04/2019 a 04/04/2019.
- Campanha 4 – 06/06/2019 a 11/06/2019.
- Campanha 5 – 16/01/2020 a 02/02/2020.

Os dados aqui apresentados referem-se aos períodos Ano 1 e PT, salvo quando expresso no texto em referência a dados pretéritos obtidos pelo Instituto Marcos Daniel (IMD), pela equipe do Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFES (LGEM-UFES) em parceria com a Fundação Pró-TAMAR ou da literatura.

Para cada indivíduo das três espécies capturadas em nosso estudo, foi utilizado um *punch* de biópsia 6mm (Figura 3A) para coletar amostras de tecido epitelial da região da base do pescoço e início do ombro das tartarugas (Figura 3B e C). Para reduzir os riscos de contaminação do material coletado e infecções do animal amostrado, realizamos a antisepsia do tecido do animal, antes e após o procedimento de coleta do material biológico. Foram coletados dois fragmentos de tecido de cada animal, sendo um de cada lado da base do pescoço. Cada amostra foi identificada, imersa individualmente em microtubo de 1.5 ml contendo álcool absoluto e posteriormente armazenados em freezer a -18 °C no LGEM-UFES (Figura 3D).

Foram realizados os exames físicos e coletas de amostras sanguíneas, de carapaça e ovos de tartarugas *C. Caretta*, e coleta de ovos de *D. coriacea* que nidificam na região da Foz do Rio Doce e em Arembépe, BA, e amostras sanguíneas de *C. mydas* que se alimentam na APA Costa das Algas

e na Ilha de Coroa Vermelha. As análises de *Dermochelys coriacea* foram apenas na fase de ovo e filhote, conforme previsto no TR-4.

Figura 3: Coleta e armazenamento de amostras de tartarugas marinhas na foz do rio Doce (ES) e adjacências. (A) *Punch* de biópsia de 6mm para coleta de tecido; (B) Procedimento de coleta de tecido com *punch* em fêmea de *Caretta caretta* e (C) em juvenil de *Chelonia mydas*; (D) Amostra biológica identificada e armazenada em tubo de 1,5 ml contendo álcool absoluto.



3.2 PROCEDIMENTOS DE GENÉTICA

Devido à pandemia de COVID-19 e medidas de isolamento social, seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde – OMS, o Decreto nº 4593-R/20 de 13 de março de 2020 e de Emergência do Governo de Estado do Espírito Santo (Marinho, 2020), a paralisação das atividades de laboratório e o processamento das amostras do PT foi necessariamente obrigatória. Em Setembro/2020, após o desenvolvimento e execução de protocolos de segurança e higienização (Equipe de Segurança da RRDM), a retomada das atividades de laboratório foram autorizadas pela

Fundação RENOVA, o que foi possível um avanço em cerca de 95% no processamento das amostras para o PT (*Material Suplementar A6MTS1, Tabela 1*).

A extração do DNA das amostras biológicas dos indivíduos das três espécies de tartarugas coletadas foi obtida pelos protocolos de extração salina de DNA (BRUFORD et al., 1992) e CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987). Os DNAs extraídos foram ressuspensos em água ultrapura (50 ng/μL), quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND100 e observadas a qualidade das bandas de DNA em gel de agarose 1% por trans-iluminador UV.

Foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares para avaliar o padrão de diversidade e estrutura genético-populacional das tartarugas marinhas em nosso estudo: *a região controle do DNA Mitocondrial e Microssatélites do DNA Nuclear*.

Os fragmentos dos DNAs extraídos das amostras de cada indivíduo coletado foram amplificados por PCRs (Reação de Polimerase em Cadeia) para posterior sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (DNAm) e genotipagem dos microssatélites.

Para amplificação das sequências foram utilizados os primers LCM e H950 (ABREU-GROBOIS et al., 2006) para as três espécies de tartarugas marinhas: *C. caretta*, *C. mydas* e *D. coriacea*. A reação foi realizada com 8.775 μL de ddH₂O, 1.250 μL de tampão [1X], 0.75 μL de MgCl₂ [50mM], 0.2 μL de dNTPs [10mM], 0.2 μL de cada *primer* [10μM], 0.125 μL de Taq platinum [5u/μL] e 2 μL de DNA [50ng/μL], totalizando um volume 13.5 μL de mix de PCR para cada amostra a ser amplificada. O perfil aplicado para reação desse marcador foi dividido em cinco etapas: 1) 94 °C por 3 minutos para desnaturação, 2) 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 3) 51 °C por 30 segundos para o anelamento dos primers, 4) 72 °C por 30 segundos para extensão. As etapas 2, 3 e 4 repetiram-se em 35 ciclos terminando com a etapa 5) 72 °C por 10 minutos para extensão final. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose de 1% por eletroforese, posteriormente seguidos de três etapas: 1) purificação através da enzima ExoSAP-IT, 2) reação de sequenciamento e 3) precipitação das amostras, onde foram executadas as etapas de limpeza e remoção de excesso de reagentes que pudessem inibir a leitura da sequência. O sequenciamento ocorreu para ambas as direções (*forward* e *reverse*) em sequenciador ABI Prism 3700, tendo as sequências da região controle do DNA mitocondrial geradas e alinhadas com o algoritmo MUSCLE por meio do programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018).

O número de *loci* de microssatélites que foram amplificados neste estudo variou entre as espécies avaliadas. Para *C. caretta* foram utilizados quinze *loci* microssatélites: Cc7G11, Cc1F01, Cc1G02, Cc1G03 (SHAMBLIN et al., 2007), CcP7D04, CcP2F11, CcP7C06, CcP8D06, CcP1F09, CcP5C11, CcP1F01, CcP1G03, CcP1B03, CcP5C08 e CcP5H07 (SHAMBLIN et al., 2009). O mix das reações de PCR foi de 12.5 μL, contendo 7.925 μL de ddH₂O, 1.25 μL de buffer [1X], 0.375 μL de MgCl₂ [50mM], 0.25 μL de dNTPs [10mM], 0.2 μL para cada *primer* (*forward* e *reverse*) [10μM], 0.2 μL de marcador fluorescente [10 μM]. Para os *primers* já marcados com as fluorescências, foram utilizados quantidades diferentes, descritas a seguir: CCP1F01 (0.19 μL); CcP1G03 (0.29 μL); CcP1B03 (0.21

μL); CcP5C08 (0.14 μL); CcP5H07 (0.17 μL), finalizando com 0.125 μL de Taq platinum e 1 μL de DNA (50 ng/μL). A amplificação dos fragmentos dos primers Cc7G11, Cc1F01, Cc1G02, Cc1G03 seguiu o programa adaptado de SCHUELKE (2000), e para os *primers* CcP7D04, CcP2F11, CcP7C06, CcP8D06, CcP1F09, CcP5C11, CcP1F01, CcP1G03, CcP1B03, CcP5C08 e CcP5H07 foi seguido o perfil de SHAMBLIN et al., (2009), adaptado com técnica de touchdown.

Dezoito *loci* microssatélites foram amplificados para *C. mydas* seguindo os perfis específicos: CM3, CM58 (FITZ SIMMONS, 1995), KLK314 (KICHLER et al., 1999), Cc2H12, Cc5H07, Cc7B07, Cc7E11, Cc1G02 (SHAMBLIN et al., 2007), Cc2, Cc28, Cc10 (MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008), A6, B103, B123, C102, D2 (DUTTON & FREY, 2009), CcP7D04, CcP8D06 (SHAMBLIN et al., 2009). Para *D. coriacea* foram utilizados dezenove *loci*, também com seus perfis específicos: C102, D1 (DUTTON & FREY, 2009), LB133, LB157, LB125, LB142, LB158, LB128, LB123 (RODEN & DUTTON, 2011), DERM01, DERM05, DERM06, DERM11, DERM15, DERM32, DERM34, DERM37, DERM39, DERM48 (ALSTAD, 2011).

Os volumes dos reagentes usados para amplificação dos fragmentos por PCR seguiu o mesmo padrão para *C. mydas* e *D. coriacea*: um volume total de 25 μl contendo 19.575 μl de ddH₂O, 2.5 μl de tampão [1X], 1.0 μl de MgCl₂ [50 Mm], 0.2 μl de dNTPs [10 mM], 0.2 μl de *reverse primer*, 0.2 μl de *forward primer*, 0.2 μl de *primer* M13 marcado com fluorescências, 0.125 μl Taq platinum [5 u/μL] e 1 μl de DNA [50 ng/μL]. A genotipagem dos indivíduos foi feita em seguida, em uma reação que incluiu produto amplificado dos marcadores microssatélites (multiplexados), formamida e padrão de peso molecular (LIZ®), seguindo as recomendações do fabricante em um sistema de análise de DNA automatizado em sequenciador ABI Prism 3700. Os *loci* microssatélites gerados foram visualizados e identificados com o software GeneMapper 4.1®.

3.3 PROCEDIMENTOS DE SAÚDE

Foram realizados os exames físicos e coletas de amostras sanguíneas, de carapaça e ovos de tartarugas *C. Caretta*, e coleta de ovos de *D. coriacea* que nidificam na região da Foz do Rio Doce e em Arembepe, BA, e amostras sanguíneas de *C. mydas* que se alimentam na APA Costa das Algas, ES e na Ilha de Coroa Vermelha, BA. As análises de *Dermochelys coriacea* foram apenas na fase de ovo e filhote, conforme previsto no TR-4.

Todos os animais abordados passaram inicialmente por uma avaliação clínica *in situ* feita por médicos veterinários. Para as tartarugas adultas (*C. caretta* e *D. coriacea*) e juvenis (*C. mydas*) que apresentavam afecções oftalmológicas, foi coletado *swab* para análises microbiológicas (cultura bacteriana, antibiograma e fúngica). Também foram coletadas amostras de queratina da carapaça das tartarugas em desova para análise de metais. As análises hematológicas aconteceram em laboratório de campo. A coleta de ovos (sendo três por ninho de *C. caretta* e *D. coriacea*) ocorreu imediatamente durante a postura das fêmeas, sem que houvesse contato dos mesmos com o solo.

Os filhotes natimortos, ovos não-eclodidos e areia dos ninhos monitorados foram coletados após a emergência dos demais filhotes.

Os hemogramas foram realizados em um intervalo inferior a seis horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) ocorreu por microcentrifugação a 11.000 rpm em centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos se deu em câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da solução para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 µL de sangue total com 2.5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540 nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias foram obtidos o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (THRALL et al., 2004).

A contagem diferencial dos leucócitos foi feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Foi realizada a contagem de 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

As análises bioquímicas dos animais capturados foram realizadas utilizando o plasma sanguíneo. Ao todo foram avaliados 20 parâmetros bioquímicos, sendo eles: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises foram realizadas no sistema automatizado Cobas Integra 400 Roche, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

As amostras de *swab* ocular foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia da Universidade Vila Velha e inoculadas em Agar Saboraud Dextrose com Cloranfenicol para isolamento de fungos e incubados a 25 °C, por 7 a 20 dias. Para o isolamento de bactérias foi utilizado caldo BHI (Brain Heart Infusion) e ágar sangue seguido da incubação a 36 °C por 24 a 48 h. Para identificação dos fungos foi utilizado ágar Batata e a técnica de microcultivo. Para identificação bacteriana foi utilizado o Sistema Bactray®. As análises bioquímicas foram realizadas pelo IMD em Vitória e as análises de metais e contaminantes no laboratório de ecotoxicologia da FURG, tanto em amostras sanguíneas quanto de ovos e natimortos.

3.4 ANÁLISES DE DADOS

3.4.1 Genética

As sequências da região controle do DNAm foram alinhadas manualmente no programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018) usando como referência alinhamentos já publicados para tartarugas-marinhas. A identificação do haplótipo de cada indivíduo sequenciado foi feita no programa DNAsp v6 (ROZAS

et al., 2003) comparando as sequências geradas com os haplótipos já publicados para cada uma das espécies analisadas. Foram considerados haplótipos novos as sequências de DNA diferentes das já publicadas, nomeando-as conforme tradicionalmente já vem sendo feito para cada espécie.

Para o presente relatório, os índices de diversidade genética foram avaliados comparando: dados pretéritos ao rompimento da barragem de Fundão (nomeados como Pré); dados coletados após o rompimento e Ano 1 de monitoramento (nomeados como Ano1); dados coletados após o rompimento e PT do monitoramento (nomeados como PT); e dados coletados em áreas não impactadas pela onda de rejeitos da barragem no PT (Área-Controle) (Figura 1B-D). Os dados foram analisados seguindo a mesma metodologia conforme detalhado no detalhado nos relatórios referentes ao ANO 1 e PT (RRDM 2019, 2020 RT23 - Anexo6 Megafauna).

Atendendo à solicitação da Nota técnica 165/ICMBio (ver ao final desse documento as respostas às solicitações), foram adicionados tecidos de filhotes natimortos de *D. coriacea*, encontrados em ninhos (N=2 para o Pós-Rompimento Ano 1 e N=7 para o Pós-Rompimento PT). O tamanho amostral da população foi ampliado, (de N=14 para N=21) pois esta é uma espécie em risco de extinção e apresenta baixo número de fêmeas flagradas por temporada reprodutiva (normalmente menos de 10). Dessa forma, os índices de diversidade, baseados nos dados do DNAm, contemplaram combinações com e sem amostras de filhotes, com o intuito de comparar e verificar se houve ou não enviesamento dos resultados. Ainda, na nota técnica 165/ICMBio foi solicitado a inclusão de indivíduos de encalhe, no entanto, não houve formalização de um acordo entre Renova, Fest e Petrobrás para que pudessemos atender o requisito.

As análises genéticas foram precedidas pelo agrupamento das sequências em grupos pré (até novembro de 2015) e pós rompimento da barragem (a partir de novembro de 2015), sumarizando-se dados publicados e disponíveis na literatura. Foram estimados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin 3.5.2. (EXCOFFIER & LISCHER, 2015), baseada no F_{ST} com 1000 permutações. As redes de haplótipos foram construídas com cálculos de *Median Joining* no programa PopART (LEIGH & BRYANT, 2015).

Para os marcadores microssatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética foram calculados através do programa Arlequin 3.5.2. (EXCOFFIER & LISCHER, 2015): o número de alelos estimado de cada loco (N_a), a proporção de indivíduos heterozigotos amostrados (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação (DL) realizadas por meio de permutações de cadeia de Markov, ajustadas as significâncias estatísticas pela correção de Bonferroni. A estimativa de riqueza alélica (\hat{A}) foi calculada usando o pacote PopGenReport no R Studio (R CORE TEAM, 2019). A identidade individual foi estimada pelo programa COLONY 2.0 (JONES & WANG, 2010), através do método de máxima verossimilhança e o cálculo de probabilidade de identidade (P_I) no programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição genética (estrutura genético-populacional) entre as amostras pré e pós rompimento da barragem, foram realizadas comparações par-a-par dos valores de F_{ST} utilizando o DNAmT e *loci* microssatélites. Foi utilizado a distância genética de SLATKIN (1995), do F_{ST} linearizado para um tempo de divergência curto pela distância de REYNOLDS et al. (1983), e o número médio de diferenças par a par dentro e entre as populações conforme descrito por NEI & LI (1979) com o Programa Arlequin 3.5.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2015).

Adicionalmente, foram realizados os cálculos da estatística F para o índice relacionado ao coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) nas comparações par-a-par. A estimativa do número de agrupamentos (K) foi definida pelos dados agrupados sem inferência *a priori*, a fim de minimizar os desequilíbrios de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os *loci* em análise. O modelo de ancestralidade utilizado foi o de mistura e correlação de frequência alélica com e sem as informações prévias do período (pré e pós rompimento da barragem) de coleta dos dados. A extensão das corridas incluiu 10.000 valores de corte (*burnin*) e 100.000 de simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC) com 5 e 10 iterações. O número de K usado como preditor ideal de agrupamentos foi o proposto por EVANNO et al. (2005). As análises foram realizadas no programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD et al., 2000).

A ocorrência de gargalo populacional foi verificada através de dois métodos distintos a partir dos marcadores microssatélites. O primeiro consistiu na plotagem da distribuição de frequências alélicas cujos gráficos que apresentarem um formato em L sugerem que a população está em equilíbrio de mutação e deriva, enquanto distribuições assimétricas indicam evento de gargalo recente (LUICKART et al., 1998). O segundo método se baseou na estimativa do excesso de heterozigosidade através do teste de Wilcoxon, aplicado no BOTTLENECK 1.2.02 (PIRY et al., 1999) com base no modelo de mutação de duas fases (TPM), com a variância fixada em 22 e a proporção de mutações em 57% (PEERY et al., 2012).

Ainda, para o presente relatório, foi desenvolvido um índice de diversidade genética individual (IDGI) a partir dos dados de heterozigosidade dos microssatélites, para as três espécies de tartarugas marinhas monitoradas neste estudo, pois apresentaram variações significativas para os índices de diversidade genética entre os períodos aqui avaliados. O IDGI foi calculado baseando-se na frequência alélica para cada *loci* genotipado de cada indivíduo, de forma que o somatório foi dividido pelo número de alelos genotipados. O desenvolvimento do IDGI foi realizado de forma que fosse possível relacionar a diversidade genética individual com os resultados individuais de saúde para as populações das tartarugas-marinhas (ver sessão Análises integradas).

Ainda, com o intuito de avaliar se houveram diferenças significativas entre os índices de diversidade genética (tanto mitocondriais quanto de microssatélites) entre os períodos Pré-Rompimento, Pós-Rompimento Ano 1, Pós-Rompimento-PT e Áreas-Controle, os dados obtidos foram avaliados quanto

a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e em seguida realizadas as comparações pelos testes t de Student e/ou U de Mann-Whitney utilizando o R 3.3.2 (R Core Team, 2019).

3.4.2 Saúde

Os valores de parâmetros bioquímicos, hematológicos e de metais foram testados para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados paramétricos foram comparados entre áreas de estudo pelo teste t de Student precedido do teste de Levene para igualdade de variâncias. Dados não paramétricos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. Foram feitas correlações de Spearman entre os parâmetros analisados considerando o coeficiente de correlação (r_s) entre 0.3 e 0.5 como correlação fraca, de 0.5 a 0.7 média e acima de 0.7 forte. Os parâmetros categóricos (condição corporal, carga epibiônica e parasitas) foram comparados entre as áreas pelo teste exato de Fisher e qui-quadrado. Todos esses testes foram feitos no programa IBM SPSS 24.0 a um nível de significância de 95%. Para verificar as interrelações entre as múltiplas variáveis numéricas e as áreas controles e afetadas foi feita uma análise de componentes principais (PCA) utilizando o programa FITOPAC 2.1.2.85 (SHEPHERD, 2010).

A análise dos dados se baseou na comparação entre os resultados obtidos nas áreas afetadas e áreas controle através de métodos estatísticos adequados ao conjunto de dados obtidos, como análise multivariada e análises de correlação.

3.4.3 Análises Integradas

A partir dos indivíduos das tartarugas marinhas monitoradas neste estudo, foram realizadas Análises de Correlação de Spearman (CSA) combinando os dados de saúde e IDGI para o período Pós-Rompimento Ano 1, com o intuito de avaliar se houve algum sinal de impacto/influência das variáveis de saúde, reprodução e ambiental sobre a diversidade genética das populações de tartarugas marinhas para o período Pós-Rompimento Ano1, para as áreas monitoradas das Praias de Povoação em Linhares e de Comboios em Regência, ambas no Espírito Santo. Adicionalmente, foram realizadas análises de Correlação entre o parâmetro genético gerado (IDGI) com os parâmetros de saúde avaliados, seguida de análises de Regressão Linear e Múltipla para identificar a relação de causa e efeito entre estes parâmetros. A ANOVA de um fator também foi utilizada para verificar qual dos modelos de análises gerados explicava melhor as diferenças encontradas. Além disso, os resultados obtidos da CSA foram também relacionados com aqueles resultados apresentados do projeto TAMAR quanto aos parâmetros reprodutivos (relatório RRDM-RT2019/Fundação Pró-Tamar) e da geomorfologia das praias (relatório RT-20 RRDM/NOV19, Anexo 4). Esses conjuntos de dados foram escolhidos pois apresentaram sinais significativos de impacto para o período avaliado 2018/2019 (relatório RT-23 RRDM/NOV19, Anexo 6), e que estão correlacionadas diretamente com as áreas monitoradas e impactadas pela pluma de rejeitos, onde as populações de tartarugas desovam. Foram considerados valores significativos aqueles que apresentaram $R \leq 0,05$ após 1000 permutações.

3.5 ALTERAÇÕES METODOLÓGICAS (CAMPO E LABORATÓRIO) OCORRIDAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO.

3.5.1 Área De Estudo E Procedimentos De Campo

No período de transição a área controle para coleta de amostras de *Caretta caretta* foi definida na praia de Arembepe, município de Camaçari, BA, 30 km ao sul da Praia do Forte. Essa mudança foi necessária para atender as restrições logísticas do Projeto TAMAR na Praia do Forte. Essa modificação porém, não acarreta alterações nos resultados pois as tartarugas que desovam em Arembepe são as mesmas que desovam na Praia do Forte, segundo informação obtida com a Fundação Pró-TAMAR.

No período de transição estavam previstas 2 campanhas de campo para coleta de amostras de *Chelonia mydas* em Coroa Vermelha, BA e na APA Costa dos Corais, ES. Porém, em função do isolamento social imposto pela COVID-19 e seguindo as diretrizes da Fundação RENOVA, as atividades de campo foram paralisadas e apenas uma campanha foi realizada entre 16/01/2020 a 02/02/2020.

As análises genéticas utilizaram o mesmo modelo já adotado no Ano 1 pelas análises de saúde (RRDM 2019, RT23 - Anexo6 Megafauna), onde foram analisadas amostras coletadas entre outubro/2019 e março/2020 em Arembepe na Bahia, como “região controle” para a espécie *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda) em período reprodutivo, e Ilha de Coroa Vermelha, sul da Bahia, como “região controle” da espécie *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) em área de alimentação. Essa ação foi necessária pois, as amostras biológicas que seriam utilizadas para controle genético, foram obtidas na região da foz do rio Doce em períodos anteriores ao rompimento da barragem de Fundão. Por serem amostras muito antigas e/ou mal armazenadas, as nossas análises foram comprometidas devido a obtenção de DNAs genômicos pouco íntegros e/ou com concentrações insuficientes para dar sequência ao trabalho. O material biológico proveniente das novas “áreas controle” foram depositados na coleção de tecidos do Laboratório de Genética e Evolução Molecular - UFES (LGEM-UFES).

3.5.2 Coleta Do Material Biológico E Procedimentos Laboratoriais

As extrações de DNA das amostras de tecido epitelial coletadas das três espécies alvo deste estudo, foram obtidas pelo protocolo de extração salina (Bruford et al., 1992), padronizado pelo Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB-UFES). Algumas amostras de tecido sanguíneo foram incorporadas nas análises genéticas e, para esse tipo de tecido, as extrações de DNA foram feitas por CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987). Foi importante a inclusão desse protocolo de extração, pois ele apresentou

resultados mais satisfatórios para amostras de sangue. A depender do tipo de tecido utilizado, é necessário utilizar o protocolo de extração mais adequado, para que as sequências e/ou genótipos gerados não precisem ser descartados de análises futuras, devido a baixa qualidade. Isso comprometeria ao final o “n amostral” previamente definido em nosso estudo.

Na temporada reprodutiva 2019-2020 foi inserida a análise histopatológica de biópsia palpebral das tartarugas-cabeçudas que apresentaram lesões oftálmicas. A coleta foi realizada de forma semelhante ao descrito na figura 3, utilizando um *punch* ou bisturi para coleta de um fragmento de 0,5 cm de tecido da pálpebra. O processamento histológico foi feito da forma tradicional. O tecido foi fixado em formalina tamponada 10%, incluído em parafina histológica e cortado em micrótomo com 0,5 μ m. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e a descrição microscópica feita por médico veterinário patologista.