

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

Material Suplementar Ambiente Marinho – Tema Tartarugas

RT- 43/ JUN 23

RA2022 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2023

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	3
2	METODOLOGIA	3
2.1	COLETA	3
2.2	ANÁLISES	5
2.2.1	Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas	5
2.2.2	Avaliação da saúde das tartarugas marinhas	7
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS	8
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	10
3.1	DIVERSIDADE GENÉTICA	11
3.2	PARÂMETROS DE SAÚDE	15
3.3	METAIS PESADOS	17
3.4	DADOS REPRODUTIVOS	19
4	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	20
5	INTEGRAÇÃO COM OS RESULTADOS DA FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR	20
6	REFERÊNCIAS	21

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

O histórico de malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) abrange informações de suma importância para o balizamento do presente programa, uma vez que passou por modificações ao longo do tempo, visando melhor atender aos objetivos do PMBA/Fest. Estas alterações foram aprovadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) por meio de: (1) ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição) e (2) Proposta Técnica de continuação do monitoramento, apresentada no primeiro semestre de 2022 visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) **MS - Malha e frequência amostrais**, onde as diferentes malhas e frequências amostrais são apresentadas nas abas “Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Histórico Frequências” e 2) MS – **Mapas das malhas amostrais**, com a espacialização referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais coletadas entre setembro de 2018 e setembro de 2019, “Transição” às estações entre outubro de 2019 e julho de 2022 e “Novo Ciclo” referente às estações amostrais coletadas a partir de agosto de 2022.

2 METODOLOGIA

A metodologia apresentada contempla o escopo em vigência no momento de entrega deste relatório, ou seja, as amostragens e análises previstas para o Novo Ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática – PMBA submetidas à Fundação Renova através do FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO em 31 de agosto de 2022. Após a descrição da metodologia implementada, será apresentado um breve descritivo sobre as modificações metodológicas (parâmetros, análise de parâmetros ou grupo de parâmetros, dentre outros) que ocorreram ao longo da evolução do PMBA/Fest a fim de determinar os indicadores.

2.1 COLETA

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *Caretta caretta* e *D. coriacea*: O monitoramento das tartarugas-marinhas em área de nidificação foi realizado na Foz do Rio Doce durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. A área controle para *C. caretta* foi a Praia do Forte ou Arembepe (BA). As praias foram monitoradas com veículo com tração 4x4 das 20 às 4h em busca de fêmeas em desova. Após a postura dos ovos, os animais foram devidamente contidos fisicamente para tomada de dados biométricos e coleta de material biológico necessário para o desenvolvimento do trabalho (tecido, sangue, carapaça e ovos).

Foram tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo

Projeto TAMAR/ICMBio. Os animais capturados foram identificados nas nadadeiras anteriores com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Os ovos foram coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, e de *D. coriacea*) sem contato com o solo, e foram armazenados congelados a -80°C em sacolas plásticas. O ninho foi georreferenciado e monitorado para que os ovos não eclodidos e os filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) fossem coletados após a eclosão e armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C (SAKAI et al., 1995; ROE et al., 2011). O monitoramento dos ninhos e coleta de ovos não eclodidos e filhotes natimortos foi realizado em conjunto com a equipe do Projeto TAMAR que também obteve os dados reprodutivos.

Foram coletadas amostras de tecido, sangue e de carapaça de *C. caretta* ao longo da temporada reprodutiva em cada área (Linhares e área controle). Não foram coletadas amostras sanguíneas de *D. coriacea* devido à dificuldade de obtenção e o estresse excessivo dos animais, mas foram coletadas amostras de tecidos das fêmeas e de alguns natimortos, em parceria com a Fundação Projeto TAMAR as para as análises genéticas. As amostras sanguíneas foram centrifugadas para obtenção de plasma e soro, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 40 x 1,2 mm e seringas descartáveis, obtendo-se um volume de 10 mL, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, foi realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras foram fracionadas em tubos contendo heparina sódica e próprios para análises de elementos traço e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime foi destinada a realização do hemograma e o restante foi centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estavam em campo. Após envio ao laboratório as amostras foram estocadas em ultracongelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo. As amostras de carapaça foram coletadas através da remoção de lascas da cutícula do casco, as quais foram armazenadas a -80°C até posterior análise.

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *C. mydas*: Foram realizadas 2 campanhas de captura de *Chelonia mydas* juvenis na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 2 campanhas no Recife de Coroa Vermelha – BA. Por ano foram capturados 90 indivíduos em cada área de alimentação, portanto foram 180 amostras de sangue para as análises de saúde e 180 amostras de tecido para as análises genéticas. A captura de *C. mydas* juvenis foi por busca ativa ou com uso de rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento (SANTOS, 2005). A rede foi lançada a partir de um barco motorizado e fixada ao fundo com âncora a uma distância de 30 a 200 metros da praia. Após armada, a rede foi monitorada continuamente para evitar lesões nos animais que forem capturados. O tempo de esforço foi de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

Após serem capturadas, foram tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também foi obtida a massa de juvenis de *C. mydas* com uso de dinamômetro digital com capacidade para 50Kg com escala mínima de 0,1g. Os animais capturados foram identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 25 x 0,7 mm em juvenis e seringas descartáveis, obtendo-se um volume entre 3 e 30 mL de acordo com o tamanho dos animais, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, foi realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras foram fracionadas em tubos contendo heparina lítica e próprios para análises de elementos traços e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime foi destinada a realização do hemograma e o restante foi centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras foram estocadas em ultracongelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo.

Todas as amostras de tecidos de fêmeas, juvenis e natimortos para as análises genéticas foram armazenadas em microtubos e conservadas em álcool 98%.

2.2 ANÁLISES

2.2.1 Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas

Análises laboratoriais: Os processos laboratoriais e análises foram realizados no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade e no Laboratório de Genética e Evolução Molecular, do CCHN (Vitória), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Foram avaliados os indivíduos e dados encontrados durante o período do estudo, bem como, de períodos anteriores para comparações (REIS et al., 2010, VARGAS et al., 2008, VARGAS et al., 2019 e SHAMBLIN et al., 2014).

Um pequeno pedaço de tecido epitelial e/ou muscular foi picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, foi realizada a extração do DNA pelo método de solução salina (BRUFORD et al., 1992) e CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987). Ao final do processo o DNA foi ressuspenso com a adição de 20 µL de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro.

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*. 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).

A amplificação dos loci microssatélites foi realizada de acordo com os dados da literatura e foram específicos para cada espécie (SHAMBLIN et al., 2009, FITZSIMMONS, 1995, KICHLER et al., 1999, SHAMBLIN et al., 2007, MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008, DUTTON & FREY, 2009, RODEN & DUTTON, 2011, ALSTAD, 2011). Os loci microssatélites gerados foram visualizados e identificados com o software GeneMapper 4.1®.

Análises de bioinformática e estatísticas: As sequências da região controle do DNA mitocondrial foram alinhadas no programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018). 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 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. Para os marcadores microssatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética foram calculados através do programa GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) sendo, número de alelos por loco (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e). A estimativa de riqueza alélica (A_r) foi calculada usando o pacote PopGenReport para R (ADAMACK e GRUBER, 2014). 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 (PI) no programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número populacional efetivo (N_e) foi calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição e variação genética bem como avaliar os níveis de estrutura populacional, foram realizadas comparações par-a-par entre as amostras pré e pós rompimento da barragem e entre as áreas impactadas e não-impactadas, para ambos

marcadores moleculares (DNAm e loci microssatélites). Adicionalmente, utilizando somente os dados de microssatélites, foi realizado um método de agrupamento por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) disponível no pacote adegenet 2.1 para R (Jombart 2008), que inferem o número de padrões genéticos (K) utilizando um Critério de Inferência Bayesiana (BIC), bem como estimam proporções de mistura entre as populações/origem geográfica (Jombart et al. 2010) traçando uma probabilidade de agrupamento (0-100%), comparando as áreas e períodos. E, complementarmente, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCoA) no GenAlex com o intuito de identificar a variação genética dos indivíduos de acordo com suas populações, revelando assim o maior nível de diferenciação entre eles.

2.2.2 Avaliação da saúde das tartarugas marinhas

Hemograma: Os hemogramas foram realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) foi realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm na centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos (Tr) foi realizada na 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 reação 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 540nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias foi realizado 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®. Foram contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

Análises bioquímicas: Foi analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises foram realizadas no sistema automatizado BeckmanCoulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

Análises de elementos traço: A dosagem de elementos traço será realizada por GF-AAS ou equipamento disponível no laboratório contratado pela FEST, após a validação pela equipe da compatibilidade com os resultados anteriores. As amostras de ovos (3 por ninho), foram separadas em pool de casca, gema e clara, já os ovos não eclodidos (3 por ninho) foram separados em pool de conteúdo e casca. Os natimortos foram analisados em pool de 3 filhotes por ninho. É necessário a realização das análises em duplicata para confirmação dos resultados a partir da repetição da análise. Através dela validamos e avaliamos a precisão dos resultados. Desse modo, é possível a verificação instantânea de que o resultado está dentro dos padrões. As duplicatas são importantes principalmente para amostras que são mais difíceis de serem homogeneizadas, como os natimortos e os ovos. As

amostras foram preparadas por digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente (CAMACHO et al., 2013c). Os metais analisados foram: As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn.

Avaliação do Sucesso Reprodutivo: Para avaliar a relação entre os contaminantes e o sucesso reprodutivo foi necessário aguardar a eclosão dos filhotes (aproximadamente 60 dias). O sucesso reprodutivo é medido pela taxa de sucesso de eclosão e emergência. Após este período os ninhos foram abertos e contabilizados o número de ovos não eclodidos, cascas, filhotes natimortos e filhotes retidos. Ninhos com maior quantidade proporcional de cascas e filhotes viáveis apresentarão maior sucesso reprodutivo dado em percentual de nascidos. Também foi calculado o percentual de natimortos e ovos inviáveis. Esses dados deverão ser obtidos junto ao Projeto TAMAR/ICMBio.

Análises estatísticas: os valores bioquímicos e de contaminantes foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilks. Grupos de dados com distribuição normal foram comparados (por exemplo local, temporada reprodutiva) por ANOVA (soma dos quadrados tipo IV) com teste de Games-Howell post-hoc, ou por ANOVA não paramétrica com teste de Mann-Whitney post-hoc se não forem normais. Correlações de Spearman e PCA foram utilizadas para verificar se há correlação entre parâmetros bioquímicos e as concentrações de contaminantes. Os níveis de contaminantes foram comparados entre tartarugas na primeira desova e as posteriores por anova de medidas repetidas. A avaliação do sucesso de eclosão com os contaminantes nos ovos, filhotes e tartarugas foi avaliada por modelo linear generalizado. Todas as análises estatísticas foram feitas com significância de $<0,05$ usando o pacote IBM SPSS 17.0.

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

Meta 1: As análises de bioinformática e estatísticas propostas para o indicador Diversidade Genética sofreram pequenas modificações pois novos algoritmos matemáticos têm sofrido atualizações, produzindo maior grau de confiança e robustez estatística, e outros parâmetros foram incluídos para subsidiar as avaliações. Dessa forma, as sequências da região controle do DNA mitocondrial assim como os loci de microssatélites passaram a ser visualizadas, alinhadas e mensuradas utilizando o software Geneious (KEARSE et al., 2012). Foi incluído o índice de heterozigosidade individual (H_i) para os marcadores de microssatélites que subsidiam o entendimento sobre perda de alelos e heterozigosidade nas populações, o qual é estimado utilizando o software GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). Foram incluídas duas análises de demografia populacional as quais avaliam se as populações de tartarugas sofreram gargalo populacional recente e histórico, sendo a primeira realizada através do software BOTTLENECK (PIRY et al., 1999) e a segunda realizada através o pacote de dados *Vareff* (NIKOLIC & CHEVALET, 2014), e possibilitam subsidiar os parâmetros demográficos e entender a história de vida das populações de tartarugas. Por outro lado, foram excluídas as análises de redes de haplótipos, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, e Análise de Componentes Principais pois se mostraram pouco informativas para avaliação do indicador.

Foi sugerido que no primeiro ano do novo ciclo fosse testada uma nova metodologia para obtenção de dados genômicos com o intuito de reduzir os custos e aumentar o poder e cobertura das análises

genéticas, em substituição à genotipagem dos 15 marcadores nucleares microssatélites para as três espécies de tartarugas marinhas estudadas. No entanto, até o momento não conseguimos encontrar profissional habilitado para trabalhar com essa nova metodologia, por isso ela não foi testada e continuamos usando os 15 marcadores microssatélites.

Meta 2: Foram incluídas amostras de carapaça e de ovos não eclodidos: A carapaça é obtida através da coleta de cutículas de queratina que se desprendem naturalmente do casco das tartarugas marinhas, sendo um método absolutamente não invasivo. As análises da carapaça de *Caretta caretta* foram incluídas pois não tínhamos amostras coletadas de antes do desastre e a concentração de metais na carapaça reflete a acumulação a longo prazo. As quantidades de metais na carapaça em crescimento são determinadas pelo coeficiente de ligação sangue/queratina e pela concentração dos metais no sangue no momento que a carapaça é formada, fornecendo um registro histórico da concentração dos metais no sangue (Vander Zanden et al. 2013). Além disso, a carapaça bioacumula diversos metais que se ligam à queratina ao longo do tempo (Innis et al. 2008, Komoroske et al. 2011, Prioste et al. 2015, Perrault et al. 2017), sendo uma ótima matriz para avaliação da exposição antiga a contaminantes (Komoroske et al. 2011). O sangue, por outro lado, é considerado uma matriz adequada para avaliar a exposição recente (Burger et al. 2005, Angerer et al. 2007), pois mudanças abruptas na exposição são rapidamente refletidas no sangue e podem ser observadas dependendo do tempo de amostragem em relação ao tempo de exposição (Blanvillain et al. 2007, Day et al. 2010). Adicionalmente, estudos demonstraram que a carapaça é a matriz mais eficaz para prever as quantidades de metais acumuladas em alguns órgãos, como o fígado e rim, já que foram encontradas correlações significativamente positivas entre as quantidades de metais na carapaça e nos órgãos amostrados (Sakai et al. 2000, Day et al. 2005). Sem as análises da carapaça das tartarugas cabeçadas não seria possível saber as concentrações de metais prévias do animal, o que ele bioacumulou nas áreas de alimentação e ao longo do tempo, e assim, não teríamos um panorama completo da exposição (recente e prévia). **Ovos não eclodidos** são ovos que permanecem no ninho durante o período de incubação, nos quais não houve desenvolvimento embrionário, ou houve morte embrionária ou do filhote em qualquer estágio do desenvolvimento fetal. Os ovos não eclodidos foram adicionados, pois no primeiro ano verificou-se um baixo número de natimortos nos ninhos. De 60 ninhos monitorados, apenas 26 possuíam natimortos. Sabe-se que durante a incubação, o número de poros abertos na casca dos ovos das tartarugas aumenta devido à troca de água e gases entre os ovos e o ambiente do ninho, facilitando a transferência de contaminantes do material do ninho para os ovos (Hewavisenithi e Parmenter 2001; Canas e Anderson 2002). Essa permeabilidade das cascas dos ovos aos contaminantes do solo deve ser considerada como uma forma de contaminação que pode afetar o sucesso da eclosão. Para termos um resultado confiável e robusto é necessário, além dos natimortos, a inclusão dos ovos não eclodidos, que além de aumentarem o número amostral e o número de ninhos amostrados, aumentam o poder estatístico e conferem confiança aos resultados encontrados. Assim poderemos afirmar com maior certeza se os metais estão influenciando o sucesso reprodutivo das tartarugas marinhas.

- O número amostral foi readequado: o TR4 e Plano de Trabalho de 2018 preconizavam a coleta de 30 animais por área, por campanha, porém, a fim de se fazer análises estatísticas robustas e de confiança, além de nos basearmos na premissa de que a amostra deve ter precisão/poder suficiente para se fazer inferências válidas nas análises para detecção de diferenças ou efeitos quando estes estiverem presentes, realizamos o cálculo do número amostral apropriado. O qual resultou em no MÍNIMO 45 animais por local, por campanha, para estimar, com 95% de confiança, a média dos parâmetros de saúde analisados
- Todas as análises de contaminantes orgânicos foram retiradas.

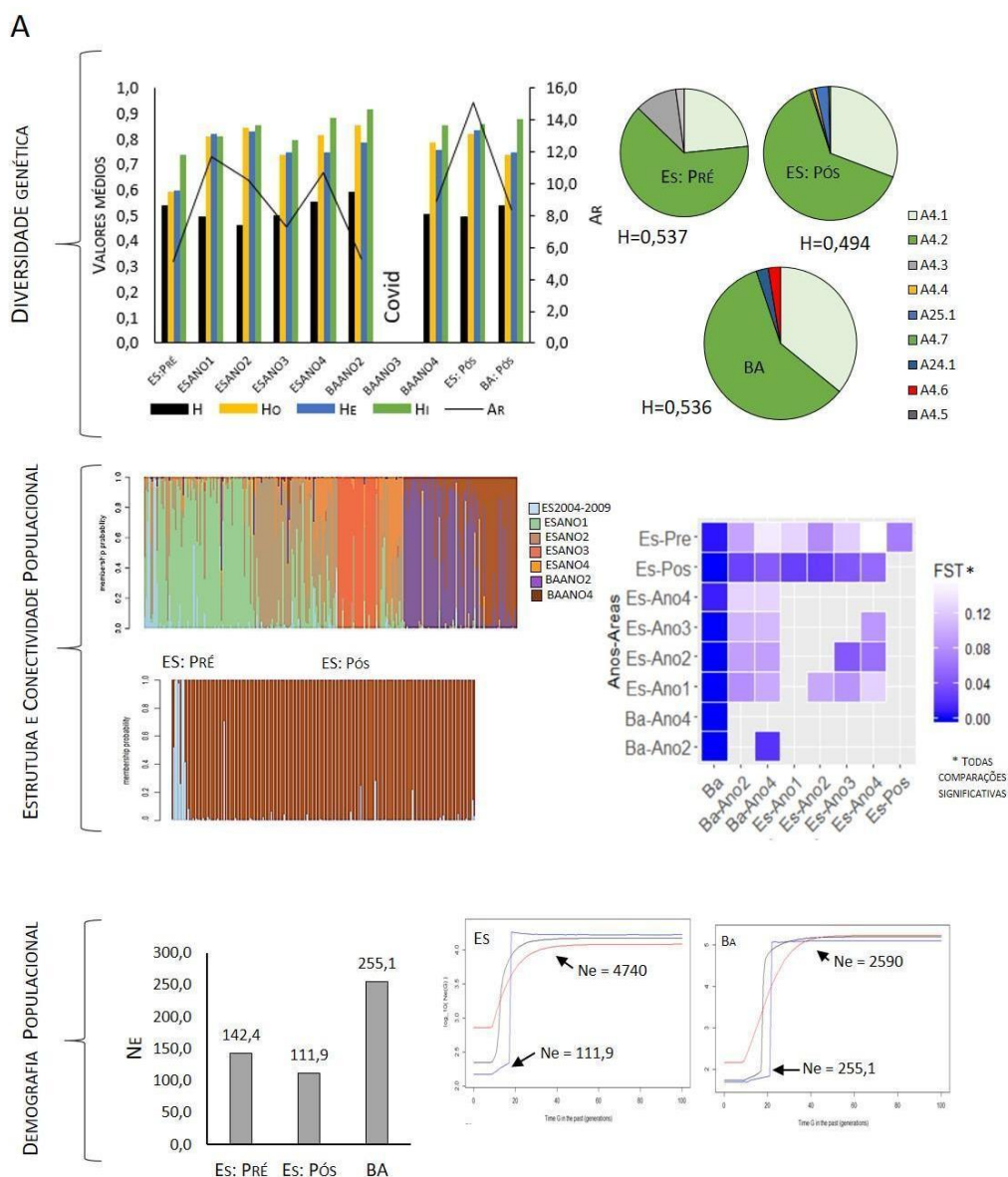
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo do monitoramento (setembro/2018 – setembro/2022) na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte a gestores ambientais. A partir destes indicadores, pode-se identificar os impactos com relação direta ou indireta ao rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

Os indicadores do PMBA/Fest vêm se consolidando ao longo de quatro anos de monitoramento, onde seus principais resultados foram discutidos em todos os relatórios técnicos entregues até o presente, entretanto a partir do novo modelo de relatório solicitado via ofício SEI nº 85/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio, proposto via ofício FR.2023.0214 (SEI13515133) e aprovado via ofício SEI nº4/2023-CTBio/DIBIO/ICMBio, a apresentação dos resultados será exclusivamente a partir da apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva como se segue:

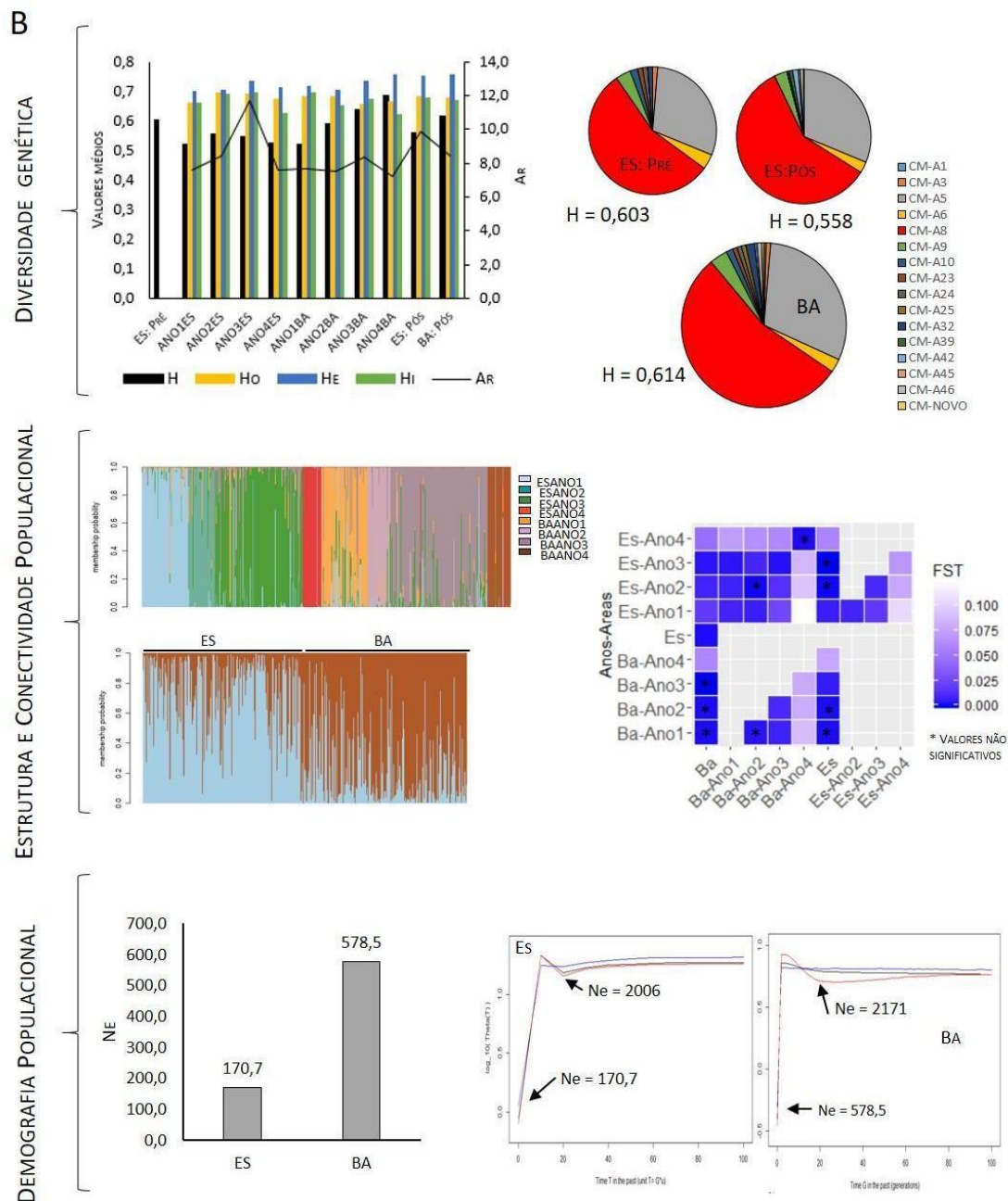
3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Figura 1: Indicador Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética monitorados ao longo dos 4 anos do PMBA/Fest, tanto para os dados mitocondriais (D-loop) quanto para os nucleares (microsatélites) para as populações de *Caretta caretta* do ES e da BA.



As populações de *C. caretta* do ES evidenciaram perda de haplótipos mitocondriais de linhagens exclusivas do Atlântico Sudoeste e consequentemente menor diversidade haplotípica quando comparadas com as populações da BA, e entre os períodos Pré e Pós do ES (7,8% e 8%, respectivamente). Para os marcadores nucleares de microsatélites, foram detectadas oscilações nos valores de diversidade genética entre os anos, os períodos e as áreas, bem como estrutura populacional temporal (entre anos e períodos) e, baixa conectividade e fluxo gênico entre as áreas. A avaliação da demografia populacional detectou Ne 43,8% menor para ES do que para BA, redução de 21,41% entre os períodos Pré e Pós do ES, e gargalo populacional recente com redução de 97,64% para ES e 90,15% para BA.

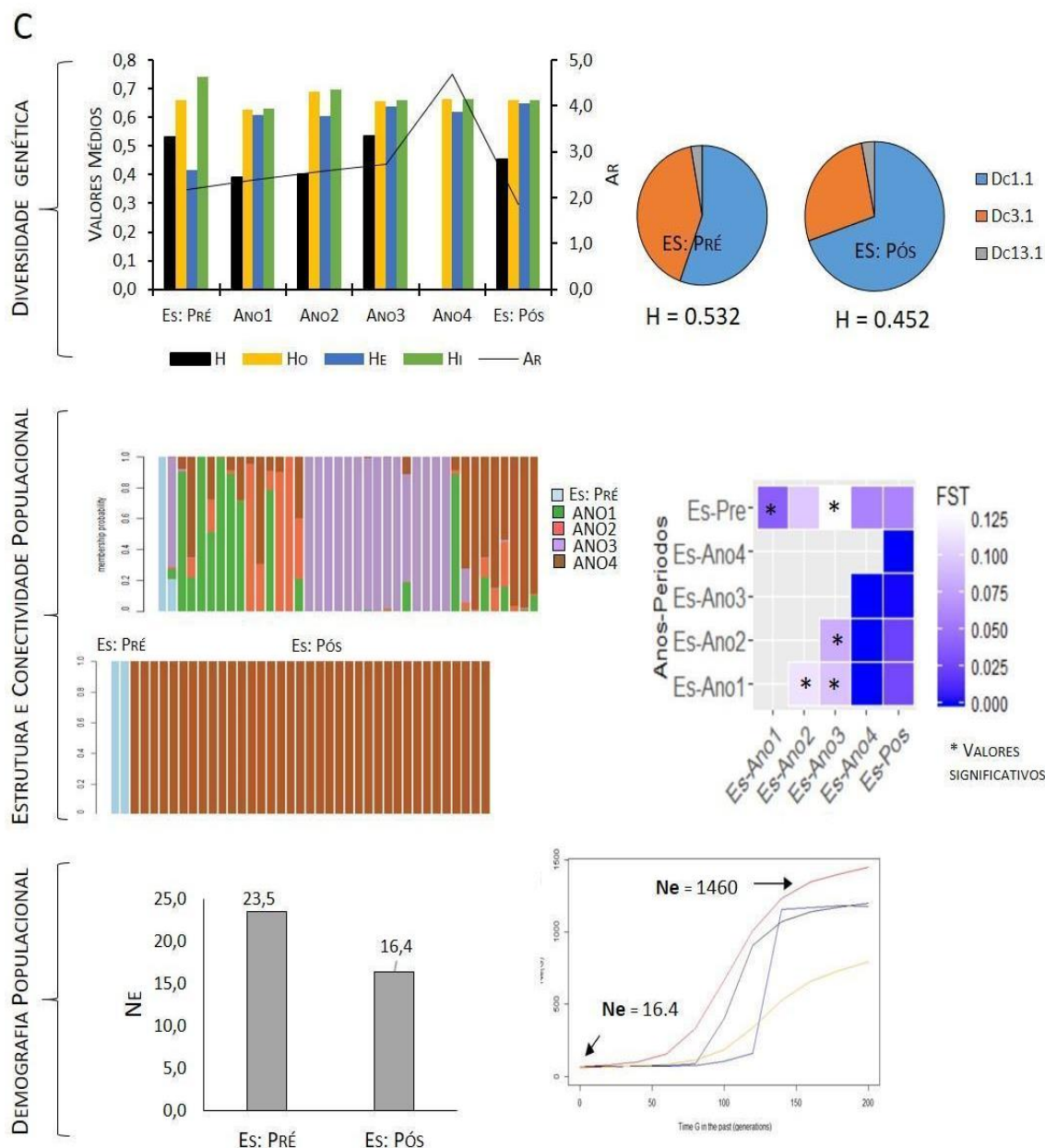
Figura 2: Indicador Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética monitorados ao longo dos 4 anos do PMBA/Fest, tanto para os dados mitocondriais (D-loop) quanto para os nucleares (microsatélites) para as juvenis de *Chelonia mydas* do ES e da BA.



Os juvenis de *C. mydas* evidenciaram a perda de haplótipos mitocondriais de linhagens exclusivas do Atlântico Sudoeste e consequentemente menor diversidade haplotípica que BA, e entre os períodos Pré e Pós do ES (9,1% e 7,5%, respectivamente). Para os marcadores nucleares de microsatélites, foram detectadas oscilações nos valores de diversidade genética entre os anos e as áreas, bem como baixa estrutura populacional entre anos, e alta conectividade entre as áreas. A avaliação da demografia populacional detectou N_e no ES, 70,49% menor que para BA, e gargalo populacional recente com redução de 91,49% para ES e 73,35% para BA. A avaliação da demografia populacional detectou N_e

43,8% menor para ES do que para BA, redução de 21,41% entre os períodos Pré e Pós do ES, e gargalo populacional recente com redução de 97,64% para ES e 90,15% para BA.

Figura 3: Indicador Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética monitorados ao longo dos 4 anos do PMBA/Fest, tanto para os dados mitocondriais (D-loop) quanto para os nucleares (microsatélites) para as populações de *Dermochelys coriacea* do ES.

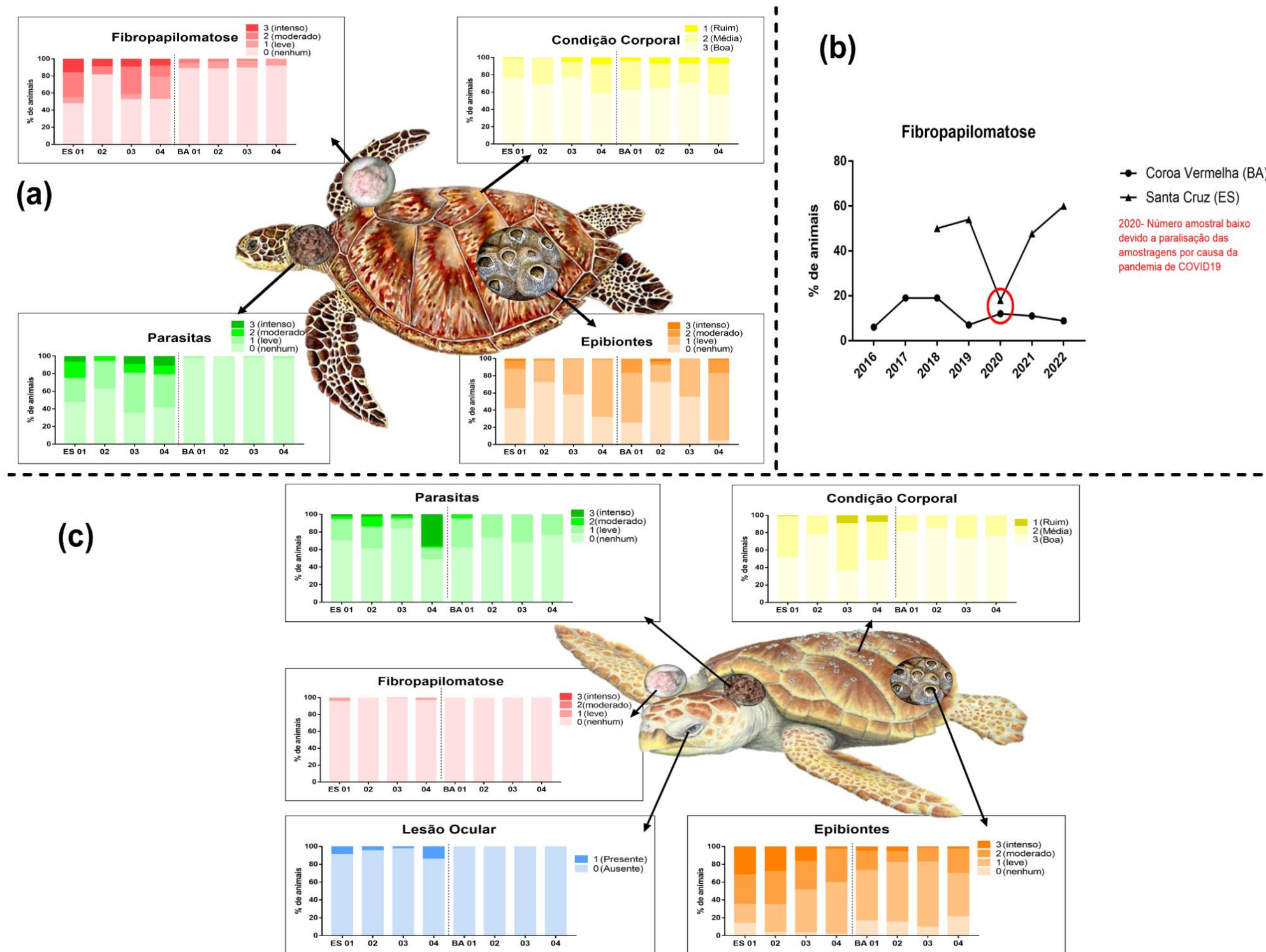


Nota: H: diversidade haplotípica. Ho: heterozigosidade observada. He: heterozigosidade esperada. Hi: heterozigosidade individual. Ar: Riqueza alélica. Ne: tamanho populacional efetivo. ES: área afetada do Espírito Santo. BA: área controle da Bahia. Pré: dados Pré-rompimento da barragem de Fundão e/ou provenientes da literatura. Pós: dados Pós-rompimento da barragem de Fundão. Covid: amostragem não realizada devido período de paralisação das atividades devido à pandemia Covid-19.

Já as populações de *Dermochelys coriacea* evidenciaram menor diversidade haplotípica quando comparados os períodos Pré e Pós do ES (15%). Para os marcadores nucleares de microssatélites, foram detectadas oscilações nos valores de diversidade genética, bem como estrutura populacional entre os períodos. A avaliação da demografia populacional detectou redução de 30,21% no N_e entre os períodos, e gargalo populacional recente com redução de 98,87% nas últimas gerações.

3.2 PARÂMETROS DE SAÚDE

Figura 4: Indicador Parâmetros de saúde. (a) Indicadores externos de saúde obtidos no exame físico de *Chelonia mydas*, na APA Costa das Algas, ES (SC) e em Coroa Vermelha, BA (CV) entre o Ano 1 e o Ano 4. (b) Prevalência (%) de fibropapilomatose em *Chelonia mydas* juvenis na área controle (Coroa Vermelha, BA) e na área afetada pela pluma primária de rejeitos de mineração (Foz do rio Piraqueaçu, APA Costa das Algas, Aracruz, ES) do Ano 1 ao Ano 4. (c) Indicadores externos de saúde avaliados no exame físico em *Caretta caretta*, em Povoação ou Regência (ES), Praia do Forte ou Arembépe (BA), do Ano 1 ao Ano 4.

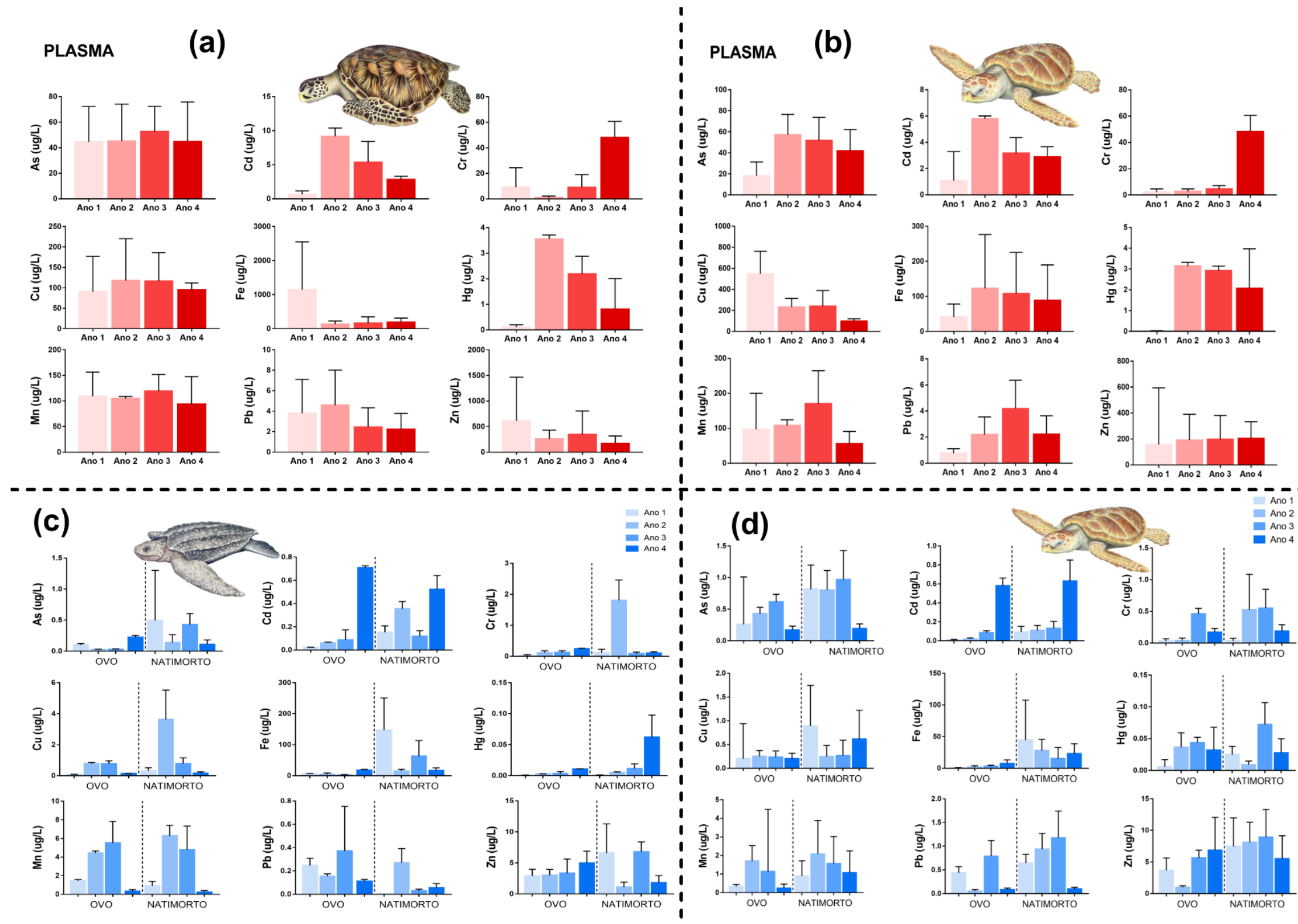


Ao longo dos 4 anos de monitoramento do PMBA/Fest, observa-se que as tartarugas-verdes juvenis que se alimentam na APA Costa das Algas - em Santa Cruz - SC, (ES) estão menos saudáveis (alterações em parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos) comparadas com a área controle da BA (Coroa Vermelha - CV). Apesar das tartarugas de Coroa Vermelha apresentarem fibropapilomas, nenhuma apresentou escore severo da doença ao longo dos 4 anos de monitoramento do PMBA/Fest, enquanto na APA Costa das Algas, 16,4%, 9,4%, 9,8% e 8,6% dos animais apresentaram escore severo no Ano 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A prevalência de fibropapilomatose se manteve maior na área afetada do que na área controle desde 2015, com uma queda ano de 2020, devido ao baixo número amostral coletado pois as atividades de campo foram suspensas devido a pandemia do COVID-19. Observa-se também que os animais da área afetada apresentam elevado número de ectoparasitas do que na área controle. Somente 3% dos animais coletados em Coroa Vermelha apresentaram ectoparasitas ao longo de todo o período de monitoramento, destes nenhum teve escore moderado ou severo. No entanto, mais da metade dos animais capturados na APA Costa das Algas tiveram ectoparasitas, sendo uma média de 9% de animais com escore severo.

Em relação as tartarugas cabeçudas, observa-se que ao longo dos 4 anos de monitoramento do PMBA/Fest, nenhuma tartaruga coletada na área controle (Praia do Forte e Arembepe- BA) apresentou condição corporal ruim, no entanto na área impactada no ES (Praia de Povoação e Regência) 48,5%, 26,3%, 63,9% e 51,6% das tartarugas apresentaram condição corporal média ou ruim, nos Anos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A presença de ectoparasitas foi maior nos animais da área afetada ao longo dos 4 anos de monitoramento, sendo o Ano 4 o período com mais animais apresentando escore severo (37,1%). Já na área controle nenhum animal apresentou escore moderado ou severo de ectoparasitas durante todo o período de monitoramento. Na área diretamente afetada pela pluma de rejeitos observou-se a presença de fibropapilomatose nos Anos 1, 2 e 4. Apesar de todos os animais apresentarem escore leve da doença, não há relatos sobre a presença de fibropapilomatose na Praia do Forte, BA, maior sítio de desova da espécie. Além disso, os animais da área impactada continuam a apresentar lesões oculares, sendo o Ano 4 o período com mais animais encontrados com essas lesões (9 animais, 14,5%). Este achado de vários animais com lesões oculares semelhantes no mesmo sítio de desova levanta dúvidas sobre a existência de um outro agente causal ou fator predisponente no ambiente que pode estar relacionado com imunossupressão, o que por sua vez pode estar relacionado a exposição a metais pesados entre outros fatores. Em suma, os animais da área impactada mantiveram uma pior condição corporal, maior carga epibiônica e ectoparasitária em comparação com a área controle no Ano 4. Além disso, as tartarugas que ocupam as áreas afetadas no Espírito Santo continuam a apresentar tumores de fibropapilomatose e lesões oculares.

3.3 METAIS PESADOS

Figura 5: Indicador Metais Pesados. (a) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas *Chelonia mydas* capturadas na APA Costa das Algas, ES nos Anos 1, 2, 3 e 4. (b) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES nos Anos 1, 2, 3 e 4. (c) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Dermochelys coriacea* capturadas em Povoação e Regência, ES, nos Anos 1, 2, 3 e 4. (d) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES, nos Anos 1, 2, 3 e 4.



Ao longo dos 4 anos de monitoramento do PMBA/Fest., comparando o Ano 1 e o Ano 4, as tartarugas-verdes juvenis que se alimentam na área impactada (ES) tiveram um aumento significativo nas concentrações dos metais Cd, Cr, Cu e Hg no plasma, já os metais Fe, Mn e Zn diminuíram suas concentrações e As e Pb se mantiveram constantes. As tartarugas cabeçudas que desovam na área impactada (ES) apresentaram um aumento significativo nas concentrações de As, Cd, Cr, Fe, Hg, Pb e Zn no plasma, enquanto os níveis de Cu e Mn diminuíram.

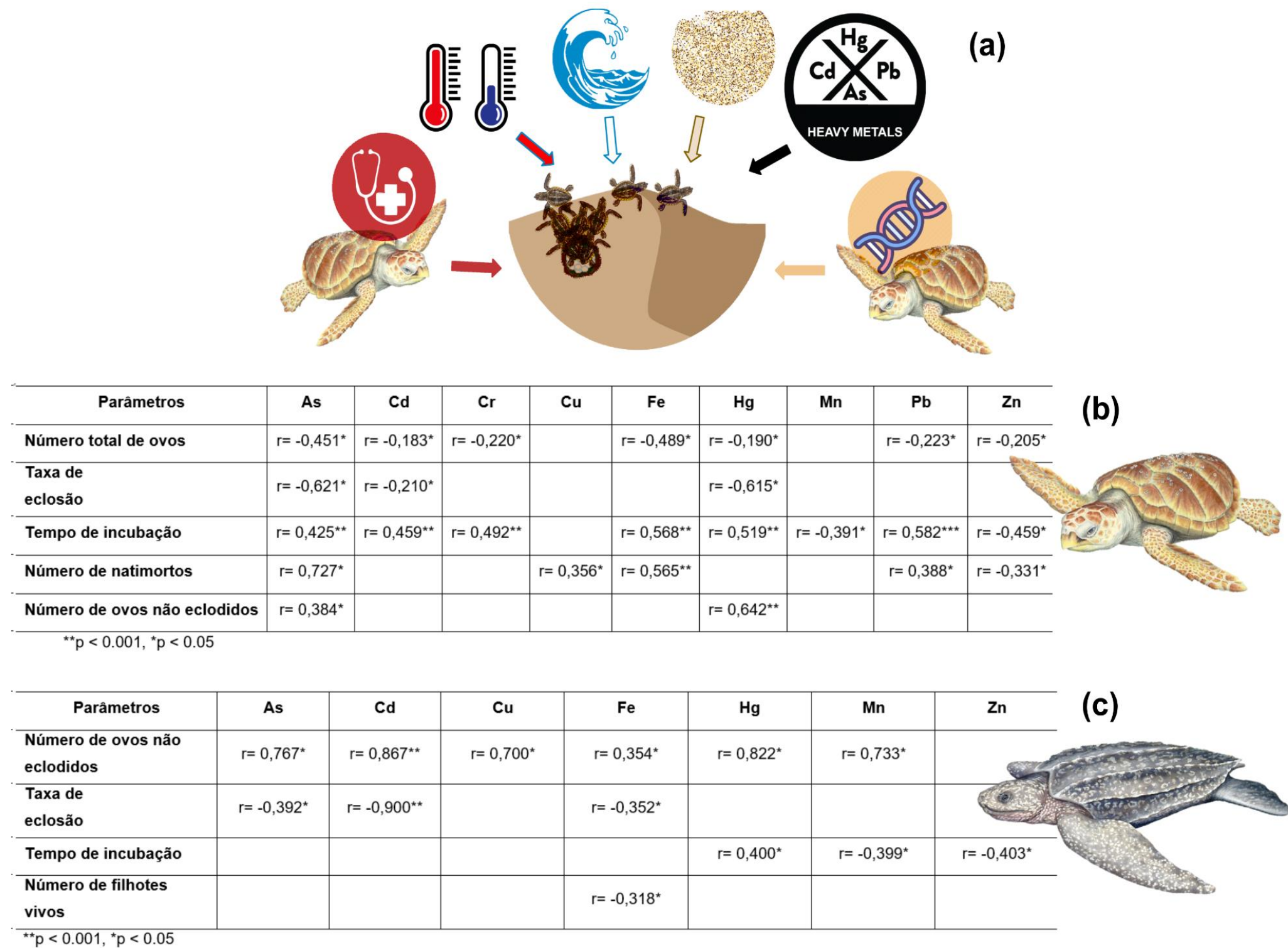
Eventos de ressuspensão de sedimentos contribuem para um aumento nos níveis de metais na região costeira do rio Doce, devido à desagregação do material particulado (re)suspenso (Hatje et al. 2017). Esses eventos podem ser atribuídos a duas forças distintas: intensa descarga fluvial e alta energia das ondas na costa. Periodicamente, estas forças conduzem à reintegração dos sedimentos na coluna de água (Oliveira e Quaresma 2017), tornando novamente disponíveis os metais e as partículas em suspensão previamente depositadas. A descarga fluvial intensa ocorre tipicamente durante os meses de verão (Oliveira e Quaresma 2017), enquanto a maior energia das ondas é observada durante o inverno. Esta distinção temporal permite uma análise independente dos seus efeitos primários ao longo do ano (Rocha et al. 2022). Dessa forma, a presença periódica dos rejeitos expõe constantemente as tartarugas aos metais pesados característicos do rejeito, bem como a outros contaminantes mobilizados pelo seu fluxo. De modo que, os juvenis de *C. mydas* estudados estão mais suscetíveis aos malefícios causados pelos contaminantes como os encontrados nas áreas monitoradas no ES, do que os animais adultos, por permanecerem nas áreas contaminadas por décadas, enquanto as fêmeas adultas ficam em média 3 meses por ano.

Os ovos recém colocados apresentaram concentrações detectáveis de todos os metais analisados, demonstrando que houve transferência materna na tartaruga de couro e na tartaruga cabeçuda. Além disso, os níveis da maioria dos metais pesados nos ovos recém colocados se mantiveram constantes ao longo dos anos para ambas as espécies. Observa-se a transferência de contaminantes do sedimento para os ovos das tartarugas de couro e cabeçudas, durante o período de incubação, uma vez que os natimortos apresentaram níveis significativamente mais elevados de alguns metais pesados.

A fase embrionária é um dos estágios mais sensíveis e vulneráveis aos poluentes ambientais e os ovos podem absorver contaminantes da areia contaminada durante o período de incubação devido às suas membranas permeáveis, aumentando seus níveis e toxicidade, o que pode ter efeitos disruptivos sobre eles e, assim, reduzir o sucesso de eclosão.

3.4 DADOS REPRODUTIVOS

Figura 6: Indicador Dados Reprodutivos. (a) Fatores que influenciam o sucesso reprodutivo das tartarugas marinhas (b) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos das tartarugas cabeçudas de Povoação e Regência, ES, Brasil. (c) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos das tartarugas de couro de Povoação e Regência, ES, Brasil.



Os dados reprodutivos demonstram que não há um padrão entre as áreas e que variam conforme os anos, corroborando a hipótese de que fatores físicos, como temperatura, umidade, tamanho dos grãos de areia e inundação das marés, juntamente com a saúde materna e o genótipo das fêmeas, contribuem para reduzir o sucesso da eclosão das tartarugas marinhas. No entanto, nas áreas impactadas parece que os contaminantes estão contribuindo mais para redução do sucesso de eclosão e aumento da mortalidade no ninho, do que os outros fatores (físicos e biológicos), uma vez que foram encontradas diversas correlações entre os metais pesados e os dados reprodutivos.

Os metais tóxicos (As, Cd, Hg e Pb) correlacionaram-se negativamente com o número total de ovos no ninho e a taxa de eclosão, e positivamente com o tempo de incubação, número de natimortos e ovos não eclodidos nas tartarugas cabeçudas. Assim, quanto maior a concentração desses metais nos ovos e natimortos, menor a taxa de eclosão e o número de ovos no ninho e maior o tempo de incubação, o número de natimortos e ovos não eclodidos. Nas tartarugas de couro, também foram encontradas correlações positivas entre os metais tóxicos e o número de ovos não eclodidos e o tempo de incubação e correlações negativas entre os metais tóxicos e a taxa de eclosão.

As correlações negativas encontradas entre o tempo de incubação e os metais essenciais (Mn e Zn) nas tartarugas cabeçudas e de couro, indicam que níveis mais altos de metais essenciais reduzem o tempo de incubação, pois são pré-requisitos para o crescimento, metabolismo e desenvolvimento embrionário. No entanto, as correlações positivas entre os metais não essenciais (As, Cd, Hg e Pb) e o tempo de incubação encontradas nas tartarugas cabeçudas e de couro, indicam que esses metais podem ser particularmente tóxicos neste período chave do desenvolvimento e podem atrasar e/ou prejudicar a formação dos ovos, aumentando o período de incubação.

Mesmo que a contaminação não esteja exercendo um efeito óbvio sobre os dados reprodutivos, a longo prazo, esse fator pode comprometer a sobrevivência das espécies.

4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todos os itens previstos foram realizados.

5 INTEGRAÇÃO COM OS RESULTADOS DA FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR

Dados reprodutivos

Os dados reprodutivos obtidos pela FPT não mostram que as alterações encontradas são significativas nos parâmetros demográficos analisados ao longo dos anos (TAMAR, 2021). Porém, quando observamos os dados reprodutivos e as correlações com as concentrações de metais, fica evidente que há uma influência negativa da contaminação nos parâmetros reprodutivos (Figura 6). Dessa forma, a contaminação exerce um efeito negativo e silencioso sobre as populações que não é evidente quando se avalia os dados reprodutivos sozinhos (Figura 6), uma vez que há uma variação natural entre as

temporadas reprodutivas. Isso reforça a importância de se avaliar conjuntamente os fatores que influenciam no sucesso reprodutivo considerando a contaminação por metais pesados entre eles. Mesmo que a contaminação não esteja exercendo um efeito óbvio sobre os parâmetros demográficos (TAMAR 2021), a longo prazo, esse fator pode comprometer a sobrevivência das espécies, especialmente quando se observa que os parâmetros genéticos indicam um forte gargalo populacional nas últimas gerações (Figura 1). A redução do N_e detectada (Figura 1) pode estar relacionada não só com o pequeno tamanho populacional censo e baixo número de ninhos das linhagens de tartarugas do Atlântico Sudoeste (ENCALADA et al., 1996; MARCOVALDI & CHALOUPKA 2007; ALMEIDA et al., 2011; COLMAN et al., 2019) mas também devido à perda de alelos ao acaso (deriva genética - VARGAS et al., 2022) que é mais evidente em populações pequenas.

Além disso, a FPT e o PMBA/Fest tem observado interferência de agentes abióticos e bióticos como mudanças importantes no ambiente praial com perda de ninhos devido a redução da faixa de praia onde as tartarugas desovam e aumento da predação (TAMAR, 2021, RRDM-RT39D, 2022; RRDM-RT39F, 2022; FEST-RT42, 2023), evidenciando que as ameaças somadas são muito significativas para a conservação e demandam ações constantes de manejo e monitoramento.

Registro de fêmea remigrante de *D. coriacea* por meio das análises genéticas

Um achado importante no Ano 4 (temporada de 2021/22), que só foi possível devido à parceria da FPT e o PMBA/Fest, foi a descoberta de uma fêmea remigrante de tartaruga-de-couro do Ano 1 (temporada 2018/19) após as análises genéticas. Essa fêmea foi flagrada e marcada pela nossa equipe de campo (PMBA/Fest) em Povoação em novembro de 2018 e, a partir do seu tecido, foram feitas as análises genéticas no LGEM-UFES. Em outubro de 2021, em Regência, uma fêmea flagrada sem marcas foi marcada pela equipe da FPT e seu tecido foi enviado para o LGEM-UFES para análises. Quando uma fêmea sem marcas é encontrada, pressupõe-se que ela seja uma nova fêmea daquela população, mas nesse caso, após as análises genéticas, observamos que se tratava da mesma fêmea que desovou em novembro de 2018, mas que perdeu suas marcas. Essa descoberta mostra a importância da utilização de metodologia complementares (captura, marcação e recaptura, análises genéticas e pit tags) para solucionar questões biológicas e de conservação extremamente importantes como o tamanho populacional, principalmente para uma espécie criticamente ameaçada de extinção. A continuidade do monitoramento irá esclarecer se esse foi um episódio isolado ou se é comum que as tartarugas-de-couro do ES estejam perdendo suas marcas, o que pode estar enviesando as estimativas populacionais.

6 REFERÊNCIAS

ABREU-GROBOIS, F. A.; HORROCKS, J. A.; FORMIA, A.; DUTTON, P.; LEROUX, R.; VÉLEZ-ZUAZO, X.; SOARES, L.; MEYLAN, P. New mtDNA d-loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis. Frick, M.; Panagopoulou, A.; Rees, A. F. & Williams, K. (comps.). Proceedings of the 26th annual symposium on sea turtle biology book of abstracts. Island of Crete, Greece: ISTS 179, 2006.

ADAMACK, A. T., & GRUBER, B. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in ecology and evolution*, 5(4), 384-387.

ALMEIDA, A. D. P., SANTOS, A. J. B., THOMÉ, J. C. A., BELINI, C., BAPTISTOTTE, C., MARCOVALDI, M. Â., ... & LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, (1).2011

ALSTAD, T. I.; SHAMBLIN, B. M.; BAGLEY, D. A.; EHRHART, L. M.; NAIRN, C. J. Isolation and Characterization of tetranucleotide microsatellites from the leatherback turtle (*dermochelys coriacea*). *CONSERVATION GENETIC RESOURCES* V. 3, P. 457-460, 2011.

BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F. Y, BURKE, T. Single-locus and DNA fingerprinting. In: Hoelzel A. R. (ed). *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, p. 225-269, 1992.

CAMACHO, M.; BOADA, L. D.; ORÓS, J.; CALABUIG, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine pollution bulletin*, v. 64, n. 9, p. 1974–80, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748504>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

COLMAN, L. P.; THOMÉ, J. C. A.; ALMEIDA, A. D. E. P.; BAPTISTOTTE, C., BARATA, P. C. R.; BREDERICK, A. C.; RIBEIRO, F. A.; VILA-VERDE, L.; GODLEY B. J. Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988–2017: reproductive biology and conservation. *Endangered Species Research* 39, 147-158, 2019

CRIM, J. L.; SPOTILA, L. D.; O'CONNOR, M.; REINA, R.; WILLIAMS, C. J.; PALADINO, F.V. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11, 2097-2106, 2002.

DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J., & OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular ecology resources*, 14(1), 209-214. 2014.

DOYLE J. J., DOYLE J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUTTON, P. H.; FREY, A. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 354-356, 2009.

DUTTON, P. H.; RODEN, S. E.; STEWART, K. R.; LACASELLA, E.; TIWARI, M.; FORMIA, A.; THOMÉ, J. C.; LIVINGSTONE, S. R.; ECKERT, E.; CHACON-CHAVERRI, D.; RIVALAN, P.; ALLMAN, P. Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conservation Genetics* 14, 625-636, 2013.

ENCALADA, S. E., LAHANAS, P. N., BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B., MIYAMOTO, M. M., & BOWEN, B. W. (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*, 5, 473-483.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics, 2015.

FERNANDES, G. W., GOULART, F. F., RANIERI, B. D., COELHO, M. S., DALES, K., BOESCHE, N., ... & SOARES-FILHO, B. Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação*, 14(2), 35-45, 2016.

FEST, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. Relatório Semestral de Evolução do PMBA/Fest - Síntese Integrativa entre Ambientes. RT-42. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 204 pag. 2023.

FITZSIMMONS N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 12: p. 432-440, 1995.

JOMBART T, DEVILLAR S & BALLOUX F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BCM Genetics* 11:94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>. 2010.

JONES O & WANG J. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol* 10:551-555. 2010.

KALINOWSKI, S. T. Hp-Rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 187-189, 2005.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., 933 COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P., & DRUMMOND, 934 A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the 935 organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. 936 <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS199>. 2012

KICHLER, K.; HOLDER, M. T.; DAVIS, S. K.; MÁRQUEZ-M., R.; OWENS, D. W. Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 819-830, 1999. KOMOROSKE, L. M. et al. Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere*, v. 84, n. 5, p. 544-552, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolutionary*, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 6, p. 1110-1116, 2015.

LÓPEZ-MENDILAHARSU, M., GIFFONI, B., MONTEIRO, D., PROSDOCIMI, L., VÉLEZ-RUBIO, G. M., FALLABRINO, A., & MARCOVALDI, M. Â. Multiple-threats analysis for loggerhead sea turtles in the southwest Atlantic Ocean. *Endangered Species Research*, 41, 183-196, 2020.

MARCOVALDI, M. Â., & CHALOUPKA, M. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endangered Species Research*, 3(2), 133-143.2007

MONZÓN-ARGUELLO, C.; MUÑOZ, J.; MARCO, A.; LÓPEZ-JURADO, L. F.; RICO, C. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *Conservation Genetics*, v. 9, p. 1045-1049, 2008.

NARO-MACIEL, E.; BONDIOLI, A. C. V.; MARTIN, M.; ALMEIDA, A. P. A.; BAPTISTOTTE, C.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. A.; SANTOS, A. J. B.; AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: a focus on the southwestern atlantic. *Journal of Heredity* 103, 792-805, 2012.

NIKOLIC, N., & CHEVALET, C.. Estimation of effective population size and variation in the 1000 time scale (1.1; pp. 1–26).2014

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PIRY, S., LUIKART, G., & CORNUET, J. M. (1999). BOTTLENECK: a program for detecting recent 1029 effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity*, 1030 90(4), 502–503. <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/pub.html>

REIS, E. C, SOARES, L. S, VARGAS, S. M, SANTOS, F. R, YOUNG, R. J, BJORNDALE, K. A., BOLLEN, A. B., LÔBO-HAJDU. G. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics* 11, 1467-1477, 2010.

RODEN, S. E.; DUTTON, P. H. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and crossspecies amplification. *Conservation Genetics Resources*, v. 3, p. 49-52, 2011.

ROE, J. H.; SILL, N. S.; COLUMBIA, M. R.; PALADINO, F. V. Trace Metals in Eggs and Hatchlings of Pacific Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) Nesting at Playa Grande, Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 10, n. 1, p. 3–9, 2011.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v. 19, p. 2496-2497, 2003.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual – Anexo 6 Megafauna. RT-23, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 531 pag. 2019.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-35, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1070 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar, Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-37, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 143 pag. 2021.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Ambiente Marinho. RT-36D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia 1600 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM - Síntese integrativa entre Ambientes - RA2022 – PMBA/Fest-RRDM e ambientes. RT-36E, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 37 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Ambiente Marinho. RT-39D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1410 pag. 2022.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Matriz de Resultados Ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho. RT-39F, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 68 pag. 2022.

SAKAI, H.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, H.; TATSUKAWA, R. Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. Marine Pollution Bulletin, v. 30, n. 5, p. 347–353, maio 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0025326X9400185C>>.

SANTOS, M. R. de D. Parâmetros bioquímicos, hematócrito e condição corporal no monitoramento da saúde de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens no Espírito Santo, Brasil. 2005. Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.

SANTOS, M. R. de D.; FERREIRA, L. S.; BAPTISTOTTE, C.; GROSSMAN, A.; BELLINI, C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal science, v. 46, n. 6, p. 491–499, 2009.

SANTOS, M. R. de D.; SILVA MARTINS, A.; BAPTISTOTTE, C.; WORK, T. M. Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. Diseases of Aquatic Organisms, v. 115, n. 3, p. 193–201, 20 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/dao/v115/n3/p193-201/>>.

SAVADA, C. S.; PROSDOCIMI, L.; DOMIT, C.; ALMEIDA, F. S. Multiple haplotypes of *Chelonia mydas* juveniles in a threatened hotspot area in Southern Brazil. Genetic and Molecular Biology 44, 3, e20200410, 2021.

SHAMBLIN, B. M.; FAIRCLOTH, B. C.; DODD, M.; WOOD-JONES, A. L.; CASTLEBERRY, S. B.; CARROLL, J. P.; NAIRN, C. J. Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Resources*, v. 7, p. 784-787, 2007.

SHAMBLIN, B. M.; FAIRCLOTH, B. C.; DODD, M. G.; BAGLEY, D. A.; EHRHART, L. M.; DUTTON, P. H.; FREY, A.; NAIRN, C. J. Tetranucleotide markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conservation Genetics*, v. 10, p. 577-580, 2009.

SHAMBLIN, B. M.; BOLTEN, A. B.; ABREU-GROBOIS, F. A.; BJORNDAL, K. A.; CARDONA, L.; CARRERAS, C.; NEL, R.; CLUSA, M.; MONZÓN-ARGÜELLO, C.; NAIRN, C. J.; NIELSEN, J. T.; NEL, R.; SOARES, L. S.; STEWART, K. R.; VILAÇA, S. T.; TÜRKOZAN, O.; YILMAZ, C.; DUTTON, P.H. Geographic patterns of genetic variation in a broadly distributed marine vertebrate: new insights into loggerhead turtle stock structure from expanded mitochondrial DNA sequences. *PLoS One* 9, e85956, 2014.

STEWART, K. R., DUTTON, P. H. Paternal genotype reconstruction reveals multiple paternity and sex ratios in a breeding population of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Conservation Genetics* 12, 1101-1113, 2011.

TAMAR, FP. Monitoramento Reprodutivo das tartarugas marinhas na planície costeira do Rio Doce, Relatório Anual Praia e Telemetria. 2021.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. W. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.

TIWARI, M.; WALLACE, B. P.; GIRONDOT, M. *Dermochelys coriacea* (Southwest Atlantic Ocean subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T46967838A46967842. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013.RLTS.T46967838A46967842.en>. 2013.

VARGAS SM, ARAUJO FCF, MONTEIRO DS, ESTIMA CE, ALMEIDA AP, SOARES LS, SANTOS F. Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. *Journal of Heredity*, 99(2): 215-220. 2008.

VARGAS, S. M.; LINS, L. S. F.; MOLFETTI, É.; HO, S. Y. W.; MONTEIRO, D.; BARRETO, J.; COLMAN, L.; VILA-VERDE, L.; BAPTISTOTTE, C.; THOMÉ, J. C. A.; SANTOS, F. R. Revisiting the genetic diversity and population structure of the critically endangered leatherback turtles in the South-west Atlantic Ocean: insights for species conservation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 99, 31-41, 2019.

VARGAS, S. M., BARCELOS, A. C., ROCHA, R. G., GUIMARÃES, P., AMORIM, L., MARTINELLI, A., ... & LUDWIG, S. Genetic monitoring of the critically endangered leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) in the South West Atlantic. *Regional Studies in Marine Science*, 55, 102530, 2022.