

**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: Cetáceos

RT- 46/ JUN 24

RA2023 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2024

EQUIPE TÉCNICA

Coordenador

Dra. Ana Paula Cazerta Farro (CEUNES/UFES)

Responsáveis pelos subtemas

Dr. Alexandre de Freitas Azevedo (UERJ)

Dr. Leonardo Serafim da Silveira (UENF)

Dr. José Lailson Brito Jr. (UERJ)

Dra. Tatiana Lemos Bisi (UERJ)

Lupércio Barbosa (Instituto ORCA)

Ian Augusto Gusman Cunha (Instituto ORCA)

Adriana Castaldo Colosio (Instituto Baleia Jubarte)

Dr. Hernani Gomes da Cunha Ramos (Instituto Baleia Jubarte)

Equipe técnica

Dra. Drienne Messa Faria (CEUNES/UFES)

Dra. Haydée Andrade Cunha (UERJ)

Dr. Hernani Gomes da Cunha Ramos (Instituto Baleia Jubarte)

Ian Augusto Gusman Cunha (Instituto ORCA)

Dra. Bárbara Manhães Moura Reis (UERJ)

Dra. Juliana Ywasaki Lima (UENF)

Ms. Letícia Versiani Gomes da Silva (UENF)

Ms. Vanessa Kuboyama Marques de Oliveira (CEUNES/UFES)

Ms. Fernanda Lopes Teixeira (CEUNES/UFES)

Ms. Manoela da Silva Pereira (CEUNES/UFES)

Ms. Dahiani Nunes Bossi (CEUNES/UFES)

Ms. Mylla Carla Cescon (CEUNES/UFES)

Biol. Lharyssa Nunes Carara (CEUNES/UFES)

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL.....	6
2	METODOLOGIA.....	6
2.1	COLETA.....	6
2.1.1	Taxa anual de encalhes, de distribuição sazonal e espacial, e de óbitos de cetáceos na costa do Espírito Santo	6
2.1.2	Genética, concentração de elementos-traço, concentração de compostos organoclorados e organobromados, hpas, isótopos estáveis, estrutura etária e sexual, histopatologia e microbiologia.....	8
2.2	ANÁLISE.....	13
2.2.1	Taxa anual de encalhes, de distribuição sazonal e espacial e de óbitos de cetáceos na costa do Espírito Santo	13
2.2.2	Índices de diversidade e estruturação genética de cetáceos no litoral do Espírito Santo	14
2.2.3	Alterações nas concentrações de elementos-traço em cetáceos.....	17
2.2.4	Alterações nas concentrações de compostos organoclorados em cetáceos	18
2.2.5	Alterações nas concentrações de compostos organobromados de origem antrópica e de origem natural em cetáceos	18
2.2.6	Alterações nas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cetáceos	19
2.2.7	Razão isotópica de C e N em amostras de <i>S. guianensis</i> e <i>P. blainvillei</i>	20
2.2.8	Estrutura etária e sexual das populações de <i>S. guianensis</i> e <i>P. blainvillei</i>	20
2.2.9	Prevalência de histopatologias	21
2.2.10	Prevalência de patógenos bacterianos e fúngicos.....	21
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIA.....	22
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	23
3.1	TAXA ANUAL DE ENCALHES DE CETÁCEOS NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO. ATENÇÃO ESPECIAL PARA ODONTOCETOS (<i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i>)	23
3.1.1	Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	23
3.1.2	Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	26

3.1.3 Registro de encalhes das espécies cetáceos	28
3.2 TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO.....	29
3.2.2 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	29
3.2.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	31
3.3 TAXA DE ÓBITO PARA <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE	33
3.3.1 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	33
3.3.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	36
3.4 SAÚDE DOS CETÁCEOS	39
3.5 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i>	56
3.5.1 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	56
3.5.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	81
3.6 ESTRUTURA ETÁRIA E SEXUAL DAS POPULAÇÕES DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i>	89
3.6.1 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	89
3.6.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	91
3.7 ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS.....	92
3.7.1 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	92
3.7.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	96
3.8 RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i>	98
3.8.1 Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>).....	98
3.8.2 Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	102
3.8.3 Comparação da razão isotópica de C e N em amostras de <i>Sotalia guianensis</i> e <i>Pontoporia blainvillei</i>.....	103
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	105
5 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	107

6	REFERÊNCIAS	107
---	-------------------	-----

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostral do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento 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 continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) MS – Malha e Frequência amostral, 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 histórica referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais monitoradas 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 monitoradas a partir de agosto de 2022, à exceção do grupo da Ecotoxicologia, que iniciou a amostragem referente ao Novo Ciclo em janeiro de 2023.

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 agosto de 2022 (e dezembro de 2022 para o Tema Ecotoxicologia). 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

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

Área de estudo: A área de estudo, que compreende o litoral do estado do Espírito Santo, estende-se por aproximadamente 392 km, com uma orientação predominante de norte-nordeste (NNE) para sul-sudoeste (SSW). Essa região está situada em frente às bacias petrolíferas de Campos e Espírito Santo. A amplitude geográfica da área se estende entre as latitudes 18.33°S, no município de Conceição da Barra, e 21.30°S, no município de Presidente Kennedy. Caracteriza-se pelo escoamento sul-sudoeste sobre a plataforma continental, sendo este mais acentuado na quebra da plataforma, onde flui a Corrente do Brasil (GHISOLFI *et al.*, 2015). O padrão de ventos na região é majoritariamente norte-

nordeste, sobretudo durante a primavera e o verão austral. Associado à passagem de frentes frias, o vento também apresenta direções de sul-sudeste-leste, principalmente no inverno austral (GHISOLFI *et al.*, 2015). Em relação às temperaturas, o período estudado registrou uma média de $24.4^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ para a temperatura do ar, com uma mínima de 15.8°C e uma máxima de 29.9°C . A água na região apresenta temperaturas amenas, com uma média de 24°C no inverno (BEZAMAT *et al.*, 2015).

Monitoramento e dados de encalhe: Os procedimentos de registro, resgate e exame de cetáceos encalhados seguem as recomendações do Protocolo da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE) (IBAMA, 2005). Grande parte dos procedimentos também é baseada no guia “Marine Mammals Ashore” (GERACI & LOUNSBURY, 2005), bem como no Protocolo de Necrópsia de Baleias Francas (MCLELLAN *et al.* 2004). Os registros de cetáceos encalhados são obtidos pelo Programa de Monitoramento de Praias das Bacias de Campos e Espírito Santo (PMP-BC/ES). Este programa opera em um acordo de parceria técnica com duas instituições responsáveis, integrantes da REMAB (Rede Brasileira de Encalhamento de Mamíferos Aquáticos), o Instituto Baleia Jubarte (IBJ) e o Instituto ORCA (licenças SISBIO n. 13303-9 e 64724-10), e em cooperação com o PMBA/Fest. As praias são monitoradas diariamente pelo PMP-BC/ES, principalmente utilizando quadriciclos, para detectar cetáceos encalhados. Animais vivos encontrados são notificados imediatamente às equipes de resgate do IBJ e ORCA. Carcaças pequenas são recolhidas e entregues ao IBJ ou ORCA conforme área de atuação, enquanto grandes carcaças (acima de 3 metros) são examinadas *in situ*. O tratamento das carcaças inclui exames necroscópicos para diagnosticar a causa do óbito e a colheita de amostras biológicas para pesquisas específicas e complementação do diagnóstico. Esta amostragem segue padrões sistemáticos, visando atender os requisitos necessários para análise histopatológica e medição de contaminantes ambientais.

Espécies alvo: Embora um total de 20 espécies de mamíferos marinhos tenha sido relatado na região do monitoramento ao longo dos 40 anos anteriores ao rompimento da barragem de Fundão-MG (MAYORGA *et al.*, 2020), o presente estudo concentra-se em duas espécies de cetáceos, consideradas alvo, por serem costeiras e estuarinas: o boto-cinza (*Sotalia guianensis*) e a toninha (*Pontoporia blainvillei*). Além do aspecto costeiro, esses cetáceos são residentes, encontrados na área durante todo o ano, e provavelmente foram os mais afetados pelos rejeitos do rompimento da barragem de Fundão.

Estágios de decomposição: A classificação dos estágios de decomposição, inicialmente proposta por Kuiken & García-Hartmann (1991), foi utilizada para orientar a coleta de amostras biológicas. Os códigos de decomposição morfológica são subdivididos da seguinte forma:

Código I: o animal vivo (torna-se código II ao morrer);

Código II: a carcaça está muito fresca (sem inchaço);

Código III: decomposição moderada (inchaço, descamação da pele, mas órgãos ainda intactos);

Código IV: decomposição avançada (inchaço significativo, órgãos irreconhecíveis);

Código V: remanescente de carcaça com ausência de órgãos.

Quanto mais avançado o estágio de decomposição, maior a dificuldade para se realizar diagnósticos macroscópicos, e mais limitados tornam-se os aproveitamentos laboratoriais relacionados aos exames complementares.

Sexagem: A sexagem é definida com base na avaliação morfológica da genitália e do sistema reprodutor externo, ou na avaliação de estruturas anatômicas internas, como, por exemplo, a próstata, o útero e as gônadas.

Faixa etária: A faixa etária é definida com base no comprimento total (CT) dos animais, de modo que para o boto cinza na região do estudo, filhotes são considerados animais inferiores a 1m, juvenis acima de 1m até 1.75m, acima desse valor são animais adultos de acordo com Monteiro-Filho *et al.*, 2013. Já para as toninhas, os filhotes são considerados animais inferiores a 0.74m, juvenis acima de 0.74m e inferior a 1.1m e adultos superiores a 1.1m (Di Benedetto & Ramos, 2001).

2.1.2 Genética, concentração de elementos-traço, concentração de compostos organoclorados e organobromados, hpas, isótopos estáveis, estrutura etária e sexual, histopatologia e microbiologia

As análises laboratoriais são 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 podem 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 monitorada.

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

Procedimento de coleta por análise:

a) Mercúrio e elementos-traço

São coletadas amostras de músculo, fígado e rim de carcaças em códigos II e III (Geraci & Lounsbury 2005). Aproximadamente 100g de amostras de músculo (dorsal, lado esquerdo), fígado e rim (esquerdo) são enviadas para UERJ. As amostras são acondicionadas em saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

b) Organoclorados e organobromados

São coletadas amostras de gordura de carcaças em códigos II e III (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras devem ter aproximadamente 100g e são 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

São coletadas amostras de fígado de carcaças em códigos II e III (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras devem ter aproximadamente 100g e são 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

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

e) Análise reprodutiva

Devem ser coletadas amostras de carcaças em códigos II e III (Geraci & Lounsbury 2005). Os testículos e ovários são pesados, medidos e fotografados.

Os ovários inteiros devem 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 são enviados à UERJ, onde são examinados e um fragmento deve ser coletado e encaminhado à UENF para análise histopatológica, seguindo o protocolo descrito abaixo (seção h).

Os testículos direito e esquerdo devem ser seccionados longitudinalmente. Na face interna da metade direita devem ser coletados três fragmentos de cerca de 1cm³ cada, seguindo o protocolo de coleta para histopatologia. Os três fragmentos (das porções cranial, mediana e distal) são 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 são enviados à

UERJ.

f) Genética

Devem ser coletadas amostras de pele ou músculo de carcaças em qualquer estado de conservação. As amostras devem 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 são 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

Amostras de tecidos colhidas durante a realização das necropsias dos cetáceos já fixadas em formalina neutra tamponada a 10% são clivadas em fragmentos menores e acondicionadas em histossetes plásticos para o processamento histológico no processador automático, onde são desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras de tecidos são cortados no micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Os cortes são coletados em lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica no microscópio óptico. As patologias ósseas são 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.

i) Microbiologia

Para as análises microbiológicas, as amostras coletadas com swab com meio Stuart são semeadas e processadas 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 são incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano são repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. É 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 são realizados para auxiliar na classificação que é 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 microrganismos identificados, são realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas.

Procedimento de coleta por tecido

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

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

Código de decomposição	Mercúrio + elementos	Clorados + bromados	HPAs	Isótopos	Reprodução	Genética	Idade
II	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
III	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
IV						M ou P	D
V						M ou P	D

2.2 ANÁLISE

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

Análise sazonal: Análises sazonais são apresentadas apenas em relatórios anuais, uma vez que requer que os 12 meses de cada ano de monitoramento sejam analisados igualmente. No caso deste relatório RA 2023, que também abrange o primeiro quadrimestre do PMBA/Fest Ano 6, a análise sazonal deste último período será realizada caso haja continuidade do monitoramento, uma vez que o Ano 6 para esse relatório compreendeu apenas quatro meses. Em relação ao período da estação anual, foi considerado primavera a partir de 23 de setembro a 21 de dezembro, verão em 21 de dezembro a 21 de março, outono em 21 de março a 21 de junho e inverno 21 de junho a 23 de setembro. Além disso, ainda foram analisadas as épocas de período chuvoso (outubro a março) e seca (abril a setembro). As comparações de taxas de encalhe para ambas as análises apresentadas, são baseadas nas fases do monitoramento, entre elas Pré-rompimento, Pré-PMBA/Fest, Anos 1, 2, 3, 4 e 5.

Fases do estudo: As fases de estudo são divididas da seguinte forma: a fase Pré-rompimento, que abrange os dados de encalhes históricos dos Bancos de Dados do Instituto Baleia Jubarte e Instituto ORCA, desde 1/1/2012 até 22/11/2015, data em que o material oriundo do rompimento da barragem de Fundão atingiu o mar, totalizando 1421 dias. A fase Pré-PMBA/Fest inclui também dados históricos de encalhes destas instituições com ocorrências entre 23/11/2015 e 30/9/2018, perfazendo 1043 dias. As fases subsequentes do PMBA/Fest têm a duração de 365 dias cada: o Ano 1 abrange 1/10/2018 a 30/9/2019; o Ano 2, 1/10/2019 a 30/9/2020; o Ano 3, 1/10/2020 a 30/10/2021; o Ano 4, 1/10/2021 a 30/9/2022; e o Ano 5, 1/10/2022 a 30/9/2023 a o Ano 6 com duração de um quadrimestre, que vai de 1/10/2023 a 31/1/2024, somando 122 dias. Para este período do Ano 6, foram analisados os mesmos quadrimestres do Ano 1 até o Ano 5, e gerados índices correspondentes aos períodos mais longos como Pré-rompimento e Pré-PMBA/Fest para realizar uma comparação equivalente. O total destas fases foram divididos por 122 dias para gerar o índice.

Análises gerais: Os dados foram organizados e classificados através de tabelas dinâmicas no Microsoft Office Excel®. Para a elaboração dos mapas de distribuição, foi utilizado o *freeware* QGIS 3.32 (QGIS Development Team, 2023). Nas análises estatísticas foi aplicado o teste Z, para comparar as proporções entre amostras independentes e para testar a associação entre duas variáveis categóricas em uma tabela de contingência 2x2 foi utilizado o teste exato de Fisher.

Em relação aos encalhes, nos relatórios anuais são utilizados três indicadores para avaliar o impacto do rompimento da barragem de Fundão em Mariana-MG nas espécies de cetáceos do litoral do Espírito Santo (ES). Esses indicadores são: I) Taxa anual de encalhes por espécie de cetáceos na costa do ES; II) Taxa de distribuição sazonal de encalhes de cetáceos na costa do ES; e III) Taxa de óbito para cetáceos do ES, determinada pelo diagnóstico da causa da morte.

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

Os tecidos coletados são 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 é utilizado o método de solução salina em que, um pequeno pedaço de músculo é picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, é obtido a solução contendo o DNA extraído. Ao final do processo o DNA é ressuspendido com a adição de 20 µL de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. Em seguida, as amostras de DNA são quantificadas em espectrofotômetro e o DNA é amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Para as análises do DNA mitocondrial, o DNA dos indivíduos foi amplificado com marcadores moleculares da região controle do DNA mitocondrial D-loop utilizando os primers KRApLp1.5t-pro (Andrews et al., 2006) e DLP5 (Pichler et al., 2002). Após a amplificação dos fragmentos, as reações são purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Cada amostra é submetida a reações de sequenciamento nos dois sentidos para avaliação de marcadores mitocondriais e genotipagem para avaliação de marcadores nucleares (microsatélites).

As sequências mitocondriais são 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) são calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações. As redes de haplótipos são construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999).

Para as análises do DNA nuclear foram utilizados marcadores microsatélites e SNPS (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

Para os microsatélites, O DNA é amplificado utilizando 10 locos microsatélites para os botos-cinza e oito locos microsatélites para as toninhas, de acordo com os quadros abaixo, e em seguida os alelos são identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

Quadro 3: Locos microsatélites utilizados para as toninhas (*Pontoporia blainvillei*). Locos: Nomes dos locos; Pb: faixa de amplificação dos alelos; Fluorescência; TA°C: Temperatura de anelamento de cada loco; Referência.

Locos	Pb	Fluorescência	TA°C	Referência
D22	106-118	HEX	60	Shinohara et al., (1997)
EV5Pm	150-166	HEX	60	Valsecchi e Amos (1996)
FCB2	161-183	6-FAM	60	Buchanan et al., (1996)
FCB5	121-141	HEX	60	Buchanan et al., (1996)
FCB17	171-211	HEX	58	Buchanan et al., (1996)
EV76Mn	168-202	6-FAM	54	Valsecchi e Amos (1996)
Pb01	203-205	6-FAM	56	Cunha et al., (2021)
Pb03	165-173	HEX	60	Cunha et al., (2021)

Quadro 4: Locos microssatélites utilizados para botos-cinza (*Sotalia guianensis*). Locos: Nomes dos locos; Pb: faixa de amplificação dos alelos; Fluorescência; TA°C: Temperatura de anelamento de cada loco; Referência.

Locos	Pb	Fluorescência	TA°C	Referência
Sgui 002	210-250	HEX	50	Cunha e Watts, 2007
Sgui 003	160-200	FAM	5	Cunha e Watts, 2007
Sgui 006	210-240	FAM	62	Cunha e Watts, 2007
Sgui 011	410-460	FAM	5	Cunha e Watts, 2007
Sgui 016	150-200	HEX	60	Cunha e Watts, 2007
Sgui 017	150-190	FAM	60	Cunha e Watts, 2007
Sgui 018	240-280	HEX	62	Cunha e Watts, 2007
GATA 98	92-134	FAM	56	Palsboll et al., 1997
PPHO142	127-159	HEX	60	Rosel et al., 1999
MK6	145-189	HEX	60	Krutzen et al., 2001

O desequilíbrio de ligação entre os locos é verificado com o programa *GENEPOP on the Web* (<http://wbimed.curtin.edu.au/genepop>) (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também são 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 são calculados os índices de diversidade genética e endogamia 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) é realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Também são calculados os índices de estruturação genética entre as unidades de população, por meio dos testes estatísticos Fst par-a-par e AMOVA (Análise de Variância Molecular). Valores de P são considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Para os **SNPs**, na etapa de extração do DNA 1 µl de B-Mercaptoethano é adicionada ao final da metodologia a fim de melhorar a qualidade do DNA extraído. O DNA extraído é diluído para 35 ng/µl e encaminhado para uma empresa terceirizada. A biblioteca é montada a partir da metodologia 2bRAD e a digestão é realizada com a enzima de restrição 1 U BsaXI (New England Biolabs, cat. no. R0609) em uma reação de 15 µl a 37°C por 45 minutos. Para verificar a eficácia da digestão, 4 µl do DNA digerido é analisado em gel de agarose 1%. Um master mix de ligação contendo 0,2 µM de cada adaptador específico (cinco pares de adaptadores para cada cinco amostras), 0,5 mM de ATP (New England Biolabs), 200 U T4 DNA ligase (New England Biolabs), 2 µl 10x tampão ligase T4, 5,9 µl de água ultrapura e 10 µl de produto da digestão é utilizado. Os tubos são incubados a 16°C por 1 hora.

A amplificação dos produtos de reação é realizada em 50 µl PCRs, sendo cada composto por 0,16 µM para cada primer, 0,24 mM DNTP, 10 µl de HF buffer 5z, 0,8 U de DNA polimerase de alta-fidelidade Phusion (New England BioLabs), 18,8 µl de água ultrapura e 18 µl dos produtos de ligação. Os termocicladores MyCycler (Bio-Rad) são utilizados para realizar a PCR com 16 ciclos de 98°C por 5s, 60 ° C por 20s, e 72 ° C por 10s. O produto de PCR é verificado em gel de poliácridamida (8%), 50 µl de cada. O DNA é difundido em água ultrapura a 37°C por 30 minutos. Para melhorar o rendimento,

para cada tubo, são utilizados 2 µl de sobrenadante como modelo e são repetidos os passos de PCR acima durante 4-6 ciclos de PCR. O produto de PCR de 5 amostras é misturado e purificado com o kit de purificação *MinElute PCR Purification Kit*. É preparado 30 µl de digestão do master mix contendo 1 mM ATP, 3 µL 10x buffer *CutSmart*, 2 U SapI (New England Biolabs), 10 µl do produto de PCR purificado, e 13,8 µL água ultrapura, incubados a 37°C por 30 minutos. O produto digerido é adicionado ao tubo contendo *beads* magnéticas pré-tratadas e são incubados à temperatura ambiente. Um ímã é aplicado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, é adicionado 200 U T4 DNA ligase ao sobrenadante incubado a 16°C por 45 min. A purificação do gel é realizada conforme descrito acima. Os barcodes são acrescentados por PCR com primers contendo cada um desses. Os produtos de PCR são purificados com *MinElute PCR Purification Kit* para serem reunidos e sequenciados utilizando a plataforma Illumina Nova PE150.

Para mesclar as leituras emparelhadas é utilizado o software Pear (versão 0.9.6) (Zhang et al., 2014) e as leituras são processadas por meio de um script Perl personalizado para cortar sequências de adaptadores e remoção das leituras com qualidade *Phred Quality Score* <30. A montagem do catálogo de marcadores e o rastreamento de SNPs são realizados utilizando a abordagem de novo e posteriormente *Refmap*, ambos com o uso do STACKS (Catchen et al., 2011). São utilizados três parâmetros para o rastreamento de SNPs, sendo o primeiro $M=1$ para determinar o número de incompatibilidades toleradas entre dois alelos em um determinado loci, o segundo $m=2$ para determinar o número de leituras idênticas mínimas necessárias para iniciar um possível alelo e o terceiro $n=1$ para determinar o número de incompatibilidades toleradas entre dois loci durante a construção do catálogo. Em seguida, é construída a referência de novo utilizando o software Bowtie2 (v2.2.4). Ao final, o programa Populations (STACKS) é utilizado para selecionar SNPs que genotiparam em pelo menos 90% dos indivíduos de cada população ($r=0,80$) e SNPs que apresentaram valor de frequência mínima de alelos (MAF) <0,01 foram excluídos. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), os índices de fixação (F_{ST}) e AMOVA são calculados no programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al., 2010).

É feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados ou aqueles que não puderam ter o sexo definido morfológicamente. 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 são ZFX0582, ZFX0923 (Bérubé & Palsboll, 1996), PMSRYF (Richard et al. 1994) e TtSRYR (Rosel et al. 2003). As reações de PCR são confeccionadas com: Tampão 10x, 150 µM de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,3 µM de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que é aplicado 0,06 µM. O volume final é de 25µL. A amplificação é 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 são separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética é realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas é realizada com o auxílio de luz UV e estas são fotografadas.

2.2.3 Alterações nas concentrações de elementos-traço em cetáceos

As análises de contaminantes são 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 H₂O₂. Após essa etapa, foi adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃) 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 KMnO₄ (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 (HONH₃), 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-5 (músculo de *Dogfish*) do *National Research Council* do Canadá, apresentando recuperação média de $98 \pm 2 \%$, de $102 \pm 7 \%$, 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 µg.L⁻¹ e de quantificação foi de 0,03 µg.g⁻¹. 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 (Pd (NO₃)₂), preparada a partir de uma solução padrão 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 variaram de: 0,05 µg.L⁻¹ para cádmio (Cd) a 7,00 µg.L⁻¹ para ferro (Fe). Já os limites de detecção dos métodos variaram de: 0,01 µg.g⁻¹ para Cd a 0,30 µg.g⁻¹ para Fe. A recuperação do material certificado de referência DOLT-5 (em %) foi de: 98 ± 6 para As; 93 ± 1 para Cd; 97 ± 5 para Cu; 99 ± 6 para Fe e 101 ± 6 para Zn. A recuperação do TORT-2 para Mn foi de $103 \pm 6 \%$. 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).

2.2.4 Alterações nas concentrações de compostos organoclorados em cetáceos

As análises de contaminantes são 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 H₂SO₄ (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 30% na recuperação do padrão interno (média \pm DP: 111 \pm 11%). 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 quantificação. O limite de quantificação para os pesticidas organoclorados variou entre 0,001 e 0,002 g.g⁻¹lip.

2.2.5 Alterações nas concentrações de compostos organobromados de origem antrópica e de origem natural em cetáceos

As análises de contaminantes são 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 seguir às etapas de purificação com a adição de H₂SO₄, 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 30% na recuperação do padrão interno (média \pm DP: 95 \pm 21 %). 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 quantificação (LQ). Dentre os compostos antrópicos, o LQ variou entre 0,0001 e 0,0005 g.g⁻¹lip enquanto dentre os compostos naturais, o LQ variou entre 0,0001 e 0,0006 g.g⁻¹lip. 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).

2.2.6 Alterações nas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cetáceos

As análises de contaminantes são 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 óxido de alumínio neutro desativado 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 óxido de alumínio desativado 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 massa (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 77 ± 19 %. Ao todo, foram analisados 6 HPAs contendo de 2 a 3 anéis aromáticos (HPAs₂₋₃ anéis) em sua composição e 12 HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos (HPAs₄₋₆ anéis). O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através da determinação dos limites de quantificação (LQ). Dentre os HPAs₂₋₃ anéis, o LQ variou entre 0,0002 e 0,003 µg.g⁻¹lip enquanto dentre os HPAs₄₋₆ anéis, o LQ variou entre 0,001 e 0,006 µg.g⁻¹lip. 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).

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

Essas análises são 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 são 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 VAdvantage, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao analisador elementar C-N-S (Flash 2000). As razões isotópicas são expressas pela notação delta (δ) em partes por mil, segundo a equação $X = [(Ramostra/Rpadrão) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N , e R representa a razão $^{13}C/^{12}C$ ou $^{15}N/^{14}N$. Para o carbono o padrão utilizado é o fóssil Belemnita da formação PeeDee - PDB e para o nitrogênio o 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 $\delta^{13}C$, segundo a equação: $\delta^{13}C_{normalizado} = \delta^{13}C_{sem\ tratamento} - 3,32 + 0,99 \times C:N$ (Post et al., 2007).

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

As análises de determinação de estágio reprodutivo e de idade são 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 são colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, são 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 são colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados são colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lâminula e selados com Entellan. As leituras são realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas são coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, são fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Fragmentos da região central do testículo contendo 1 cm³ são emblocados em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak &

Paulete (1976). Em seguida, os blocos são seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções são coradas com hematoxilina- eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras são 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 são avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al., 1985). Os ovários são inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, são realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os corpora e folículos resultantes da ovulação são registrados. A determinação da maturidade sexual foi baseada em Perrin e Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans são consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpus lúteo ou albicans em um ovário são consideradas maduras.

2.2.9 Prevalência de histopatologias

Amostras de tecidos colhidas durante a realização das necropsias dos cetáceos já fixadas em formalina neutra tamponada a 10% são clivadas em fragmentos menores e acondicionadas em histossetes plásticos para o processamento histológico no processador automático, onde são desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras de tecidos são cortados no micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Os cortes são coletados em lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica no microscópio óptico. As patologias ósseas são 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.

2.2.10 Prevalência de patógenos bacterianos e fúngicos

Para as análises microbiológicas, as amostras coletadas com *swab* com meio *stuart* são semeadas e processadas 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 são incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano são repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. É 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 são realizados para auxiliar na classificação que é 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 microrganismos identificados, são realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas.

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIA

Ao longo do Ano 1 do PMBA/Fest as amostras de *Pontoporia blainvillei* não foram incluídas nas análises de contaminantes, isótopos estáveis, e de determinação de idade e de estágio reprodutivo porque estavam sendo analisadas no âmbito do Projeto Conservação da Toninha na Área de Manejo (Edital Funbio 01/2016, Contrato nº 81/2016, vigência de 6/9/2016 a 31/12/2021). No presente relatório os resultados destas análises foram incluídos para investigação da série temporal completa, e comparação com os dados de *Sotalia guianensis* obtidos desde o Ano 1 do PMBA.

Os parâmetros “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” e “Interação dos cetáceos com a pesca” não foram contemplados no Novo Ciclo do PMBA/Fest em agosto de 2022. Tais parâmetros foram avaliados de setembro de 2018 a julho de 2022.

Desde o início do PMBA/Fest, para as análises de isótopos estáveis, idade e reprodução e de contaminantes em cetáceos, a área de coleta do boto-cinza foi subdividida em cinco regiões, com o intuito de investigar o uso do habitat e possível ocorrência de populações ecológicas distintas da espécie ao longo da costa do estado do Espírito Santo. Ao longo do monitoramento, não foi verificada diferença nos resultados entre os indivíduos coletados nas regiões 3 e 4 em relação a área de forrageamento e ecologia alimentar, apontando que eles pertencem a um mesmo grupo ecológico. Sendo assim, a partir do presente relatório, os dados dessas duas regiões serão tratados de forma conjunta, identificado como: “região 3/4” ou “Barra do Riacho e Metropolitana”. Devido a integração dos dados que ocorreu durante a reunião do Tema Cetáceos, em Abril de 2024, optamos por apresentar os resultados de ecologia trófica (nível populacional) considerando a mesma divisão usada na apresentação dos dados de genética. No relatório anterior, os indivíduos das regiões 3 e 4 já foram tratados juntos e, no presente relatório, foram incluídos os animais da região 2. Assim, apresentamos a região Norte (1=São Mateus), Região Foz (2= Rio Doce; 3 = Barra do Riacho; 4 = Metropolitana) e Região Sul (5= Extremo Sul).

3 RESULTADOS DOS INDICADORES

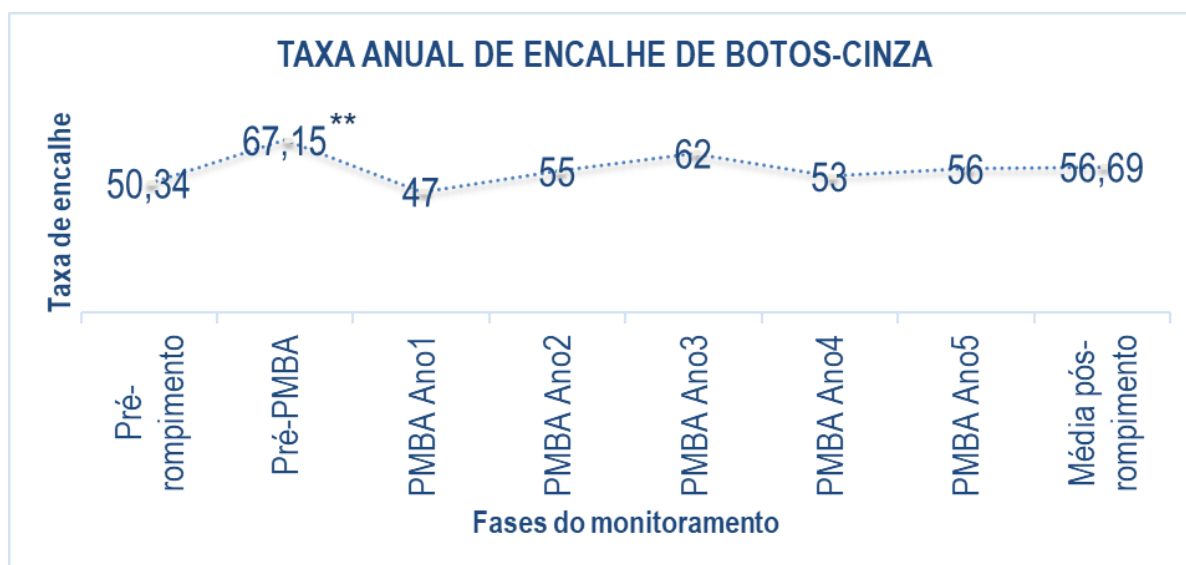
Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo de todo monitoramento na área ambiental I. No caso de *P. blainvillei* também são incluídos resultados para os indicadores “Alterações nas concentrações de contaminantes”, “Estrutura etária e sexual das populações”, e “Razão isotópica de C e N” obtidos de indivíduos coletados de outubro de 2018 a setembro de 2019 (Ano 1 do PMBA) analisados no âmbito do Projeto Funbio Contrato nº 81/2016). Vale ressaltar que os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretações e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte aos 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 do monitoramento e, seguindo a proposta estabelecida desde o Relatório Anual de 2022 (RA2022), 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 TAXA ANUAL DE ENCALHES DE CETÁCEOS NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO. ATENÇÃO ESPECIAL PARA ODONTOCETOS (*SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI*)

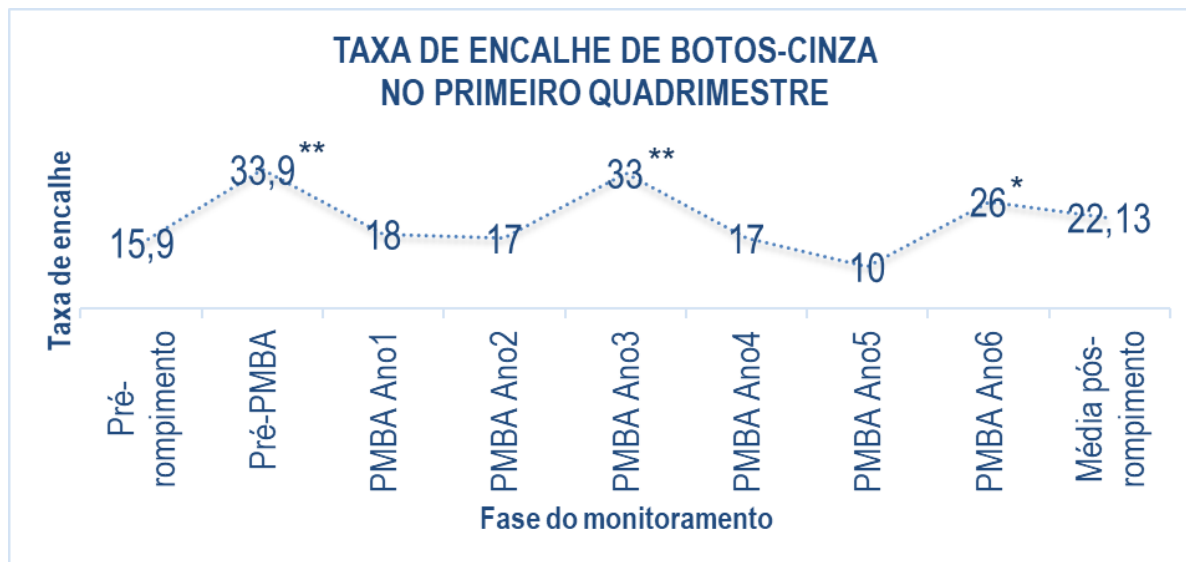
3.1.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Figura 1: Taxa anual de encalhes de botos-cinza (*S. guianensis*) entre início de janeiro de 2012 (fase Pré-rompimento) até final de setembro de 2023 (fase PMBA/Fest Ano 5). O valor de média pós-rompimento compreende as fases desde Pré-PMBA/Fest (23/11/2015) até PMBA/Fest Ano 5 (30/09/2023). No gráfico, o valor acompanhado de dois asteriscos (**) indica que esse é altamente significativo



Para o cálculo estatístico foi utilizado o Teste Z que analisa proporções independentes assumindo uma distribuição normal. Nas fases denominadas de Pré-rompimento (1421 dias) e Pré-PMBA (1043 dias) foram criados índices equivalentes ao período anual de 365 dias (PMBA Ano 1, 2, 3, 4 e 5). Dado ao fato de que as fases são distintas em quantidade de dias, a taxa anual de encalhes foi calculada com base em uma fórmula de ajuste. Devido ao fato desta taxa representar uma análise anual, o Ano 6 não irá entrar neste cálculo por corresponder apenas quatro meses (122 dias). Os resultados observados no período Pré-PMBA, que representa o período agudo, depois da chegada do material oriundo do rompimento da barragem de Fundão-MG ao mar (23/11/2015) até a véspera do início do monitoramento PMBA/Fest (30/09/2018), indicaram um aumento estatístico altamente significativo de encalhes de botos-cinza ($Z = -3,09$, $p < 0,01$) em relação à fase Pré-rompimento, que corresponde aos dados pretéritos (01/01/2012) até a data da véspera da chegada do material oriundo do rompimento da barragem de Fundão. As taxas de encalhe Pós-rompimento não apresentaram diferenças significativas em relação à fase pretérita, resultados que corroboram com o estudo de Da Cunha Ramos, 2024. Este mesmo autor, em outro trabalho, analisou os índices de encalhes de botos-cinza na costa do ES, em diferentes cenários ambientais para verificar se houve impacto devido ao rompimento da barragem de Fundão, considerando vento e corrente marítima como variáveis, por se tratarem das principais forças que afetam a deriva de carcaças (Da Cunha Ramos, 2024). Apesar de suas análises irem até o Ano 2 do PMBA, observou-se que para o boto-cinza, na fase aguda houve um aumento significativo de 30% no total de encalhes após o rompimento da barragem em comparação com a fase anterior (Pré-rompimento). Isto foi seguido por uma diminuição nos encalhes durante a fase crônica, mas a taxa permaneceu cerca de 10% mais elevada do que na fase anterior (Da Cunha Ramos, 2024). Os resultados do estudo citado, correspondem com todos os resultados encontrados nas análises deste monitoramento, mesmo não utilizando variáveis ambientais.

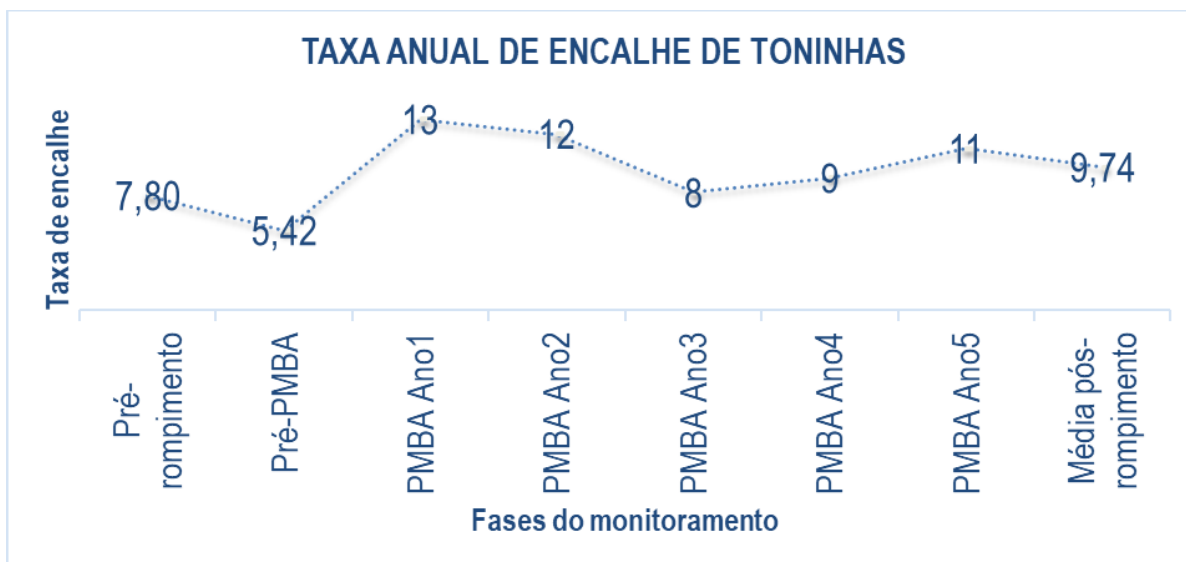
Figura 2: Comparação quadrimestral das taxas de encalhes de botos-cinza (*S. guianensis*) observada durante o primeiro quadrimestre da fase PMBA/Fest Ano 6 em relação às demais fases do projeto. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indicam que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam valores altamente significativos



A comparação das taxas de encalhes entre os quadrimestres considerou apenas os meses de outubro a janeiro de cada fase para coincidir com o primeiro quadrimestre da fase PMBA/Fest Ano 6. Na comparação do quadrimestre do Ano 6 (01/10/2023 a 31/01/2024) com o quadrimestre da fase Pré-rompimento observou-se uma significância estatística no aumento de encalhes de botos-cinza nesta fase ($Z = -2,30$, $p < 0,05$), não tão expressiva como foram as observações das taxas da fase Pré-PMBA ($Z = -5,00$, $p < 0,01$) e da fase PMBA/Fest Ano 3 ($Z = -3,76$, $p < 0,01$) que apresentaram aumentos de encalhes para esta espécie, altamente significativos na fase aguda do rompimento da barragem de Fundão-MG e na fase crônica (Ano 3), corroborando com os resultados gerados nas taxas anuais.

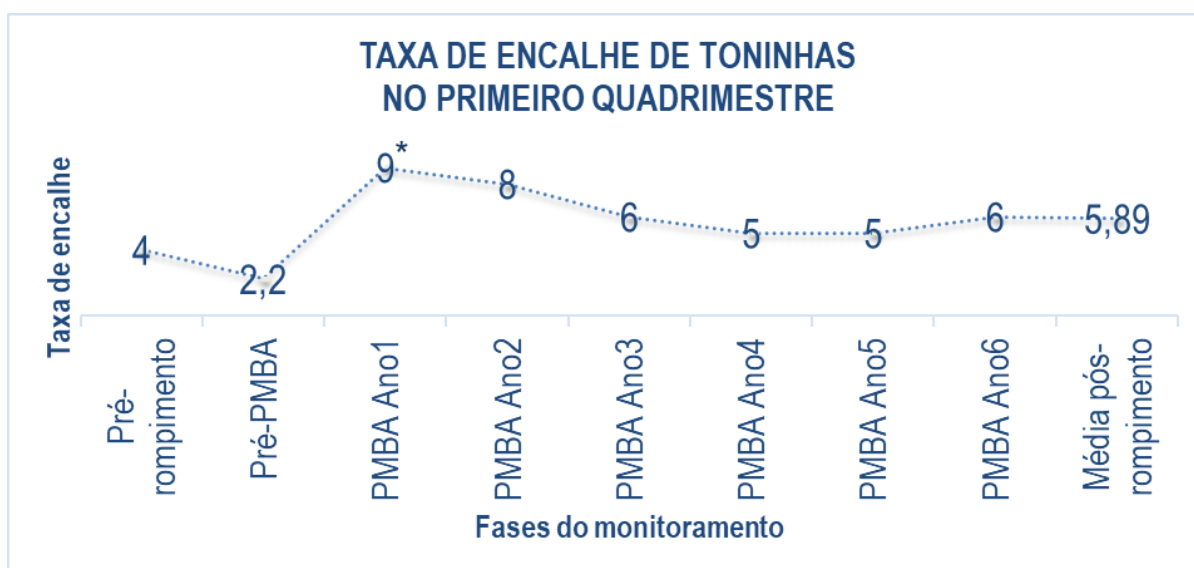
3.1.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Figura 3: Taxa anual de encalhes de toninhas (*P. blainvillei*) entre início de janeiro de 2012 (fase Pré-rompimento) até final de setembro de 2023 (fase PMBA/Fest Ano 5). O valor de média pós-rompimento compreende as fases desde Pré-PMBA (23/11/2015) até PMBA/Fest Ano 5 (30/09/2023)



Para análise estatística foi utilizado o Teste Z que calcula proporções independentes assumindo uma distribuição normal. Para as fases denominadas de Pré-rompimento (1421 dias) e Pré-PMBA (1043 dias) foram criados índices equivalentes ao período anual de 365 dias (PMBA Ano 1, 2, 3, 4 e 5). Dado ao fato de que as fases são distintas em quantidade de dias, a taxa anual de encalhes foi calculada com base numa fórmula de ajuste. Devido ao fato desta taxa representar uma análise anual, o Ano 6 não irá entrar neste cálculo por corresponder a apenas quatro meses (122 dias). Apesar das variações observadas entre as taxas anuais de encalhes para toninhas, as diferenças observadas nas fases após o rompimento da barragem de Fundão-MG em relação ao período pretérito não apresentaram significância estatística. De acordo com Da Cunha Ramos (2024), para que houvesse a detecção de significância deveria se observar ao menos 15 carcaças desta espécie detectadas nos monitoramentos. Este mesmo autor, analisando as taxas anuais de encalhes de toninhas em relação as variáveis ambientais (vento e corrente marítima) observou uma redução de 20% na fase aguda, possivelmente devido à proibição de pesca na costa Norte do ES, decorrente do rompimento da barragem de Fundão-MG. Contudo, é importante destacar que a diminuição de encalhes não reflete necessariamente um indicador positivo para a espécie, pois podem indicar uma diminuição populacional (Da Cunha Ramos, 2024).

Figura 4: Comparação quadrimestral das taxas de encalhes de toninhas (*P. blainvillei*) observadas durante o primeiro quadrimestre da fase PMBA/Fest Ano 6 em relação às demais fases do projeto. No gráfico, o valor acompanhado de um asterisco (*) indica que é estatisticamente significativo



Para a comparação das taxas de encalhes entre os quadrimestres considerou-se apenas os meses de outubro a janeiro de cada fase para coincidir com o primeiro quadrimestre da fase PMBA Ano 6. Na comparação do quadrimestre do Ano 6 (01/10/2023 a 31/01/2024) com o quadrimestre da fase Pré-rompimento observamos um aumento significativo dos encalhes de toninhas para a fase PMBA Ano 1 em relação aos índices de base observados pela série histórica e pretérita ao rompimento da barragem de Fundão ($Z = -2,14$, $p < 0,05$). Há um singelo decréscimo dos encalhes a partir da fase PMBA Ano 2 que parece se estabilizar a partir do PMBA Ano 4. Esses resultados corroboram com os resultados gerados por Da Cunha Ramos (2024), que demonstraram alteração no padrão de encalhes após o rompimento da barragem de Fundão-MG. O primeiro quadrimestre do PMBA Ano 6 não demonstrou diferença significativa no número de encalhes de toninhas, mas a média de encalhes no período pós-rompimento permanece superior aos índices históricos da fase pretérita.

3.1.3 Registro de encalhes das espécies cetáceas

Quadro 5: Lista de espécies com ocorrência de encalhe durante as fases de monitoramento (desde 01 de janeiro de 2015 a 31 de janeiro de 2024), espécies-alvo estão destacadas em cinza

Espécies	Pré- rompimento	Pré- PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Ano 6**	Total
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>			1			1			1
<i>Balaenoptera bonaraensis</i>				1					
<i>Balaenoptera edeni</i>						1			
Balaenopterídeo			4	2	1				3
Delfínídeo				1			1		1
<i>Stenella attenuata</i>						1			
<i>Kogia sp.</i>				1					1
<i>Megaptera novaeangliae</i>			11	14	17	11	20	3	73
<i>Orcinus orca</i>							1		1
<i>Peponocephala electra</i>				1					1
<i>Physeter macrocephalus</i>				1					1
<i>Pontoporia blainvillei</i> *	8 [31]	5,2 [15]	13	12	8	9	11	6	99
<i>Sotalia guianensis</i> *	51,4 [200]	186 [65,1]	47	55	62	53	56	26	659
<i>Stenella sp.</i>	0,3 [1]				1				
<i>Steno bredanensis</i>	0,3 [1]		2		2		1		3
<i>Tursiops truncatus</i>				2	2		2		2
Total*	59,8 [233]	70,3 [201]	78	90	93	77	92	35	864

* Valores entre colchetes correspondem ao total observado no período.

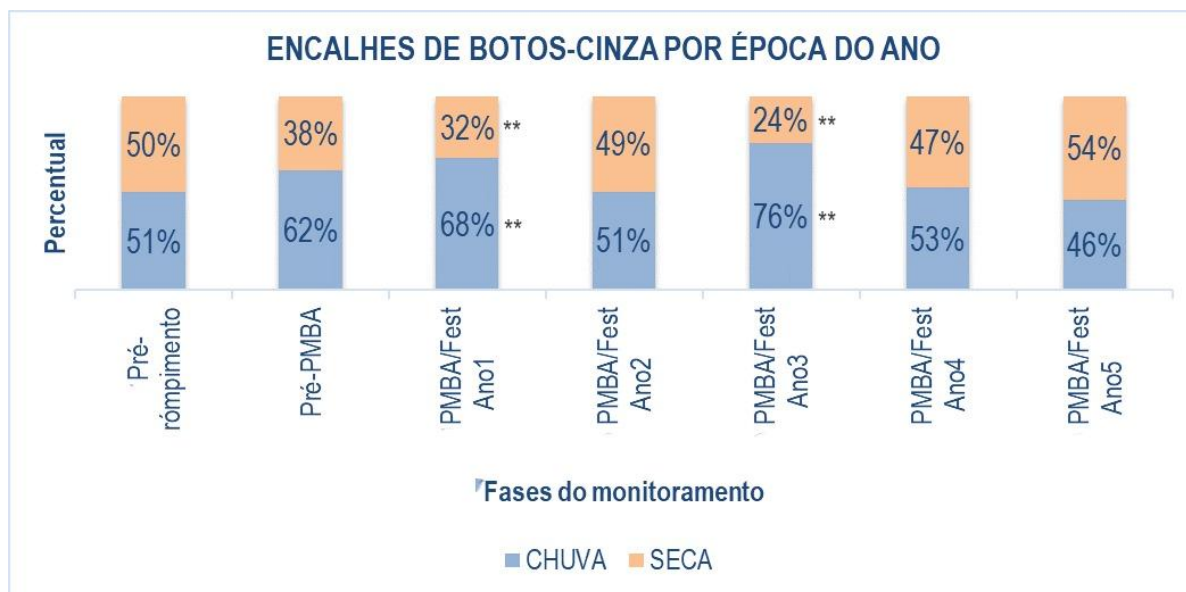
** Valores correspondentes ao total observado apenas no primeiro quadrimestre.

As células destacadas em cinza no quadro acima identificam as espécies-chave de cetáceos costeiros que são consideradas como as mais suscetíveis aos impactos decorrentes do rompimento da barragem. Os valores do Ano 6 representam apenas o primeiro quadrimestre deste período. Ao todo, durante os cinco anos e quatro meses de PMBA/Fest foi registrada a ocorrência de 14 gêneros de cetáceos ao longo da costa do Espírito Santo. Em termos de biodiversidade de cetáceos, esses resultados corroboram com o levantamento feito por Mayorga et al. (2020), antes do rompimento da barragem de Fundão-MG.

3.2 TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI* NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO

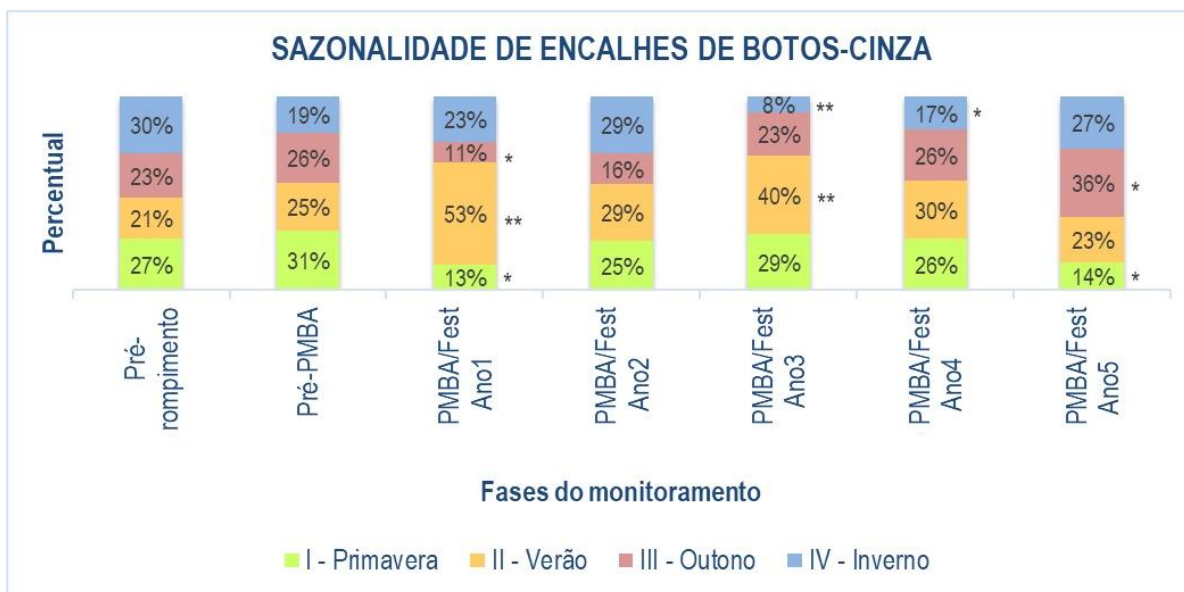
3.2.2 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Figura 5: Frequência da distribuição de encalhes de botos-cinza (*S. guianensis*) entre períodos seco (abril a setembro) e chuvoso (outubro a março) desde início de janeiro de 2012 até final de setembro de 2023. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indicam que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam que é altamente significativo



Nesta análise também foi utilizado o Teste Z, que demonstrou diferenças nas proporções de encalhes de boto-cinza entre as épocas de chuva e seca em razão do período pretérito ao rompimento da barragem de Fundão-MG. O PMBA Ano 6 não entrou na análise por apresentar um intervalo de tempo menor e o período sazonal incompleto, podendo enviesar a análise, já que nesse último ano foram avaliados apenas 4 meses até o momento. Como resultados, observou-se diferenças apenas nas fases PMBA Ano 1 e Ano 3 ($Z = 2,58$, $p < 0,01$ e $Z = 3,81$, $p < 0,01$, respectivamente). No Ano 1 (01/10/2018 a 30/09/2019) e Ano 3 (01/10/2020 a 30/09/2021) houve aumento significativo dos encalhes no período chuvoso e diminuição significativa no período seco, indicando que algum fator pode estar interferindo e alterando os padrões de encalhes neste período.

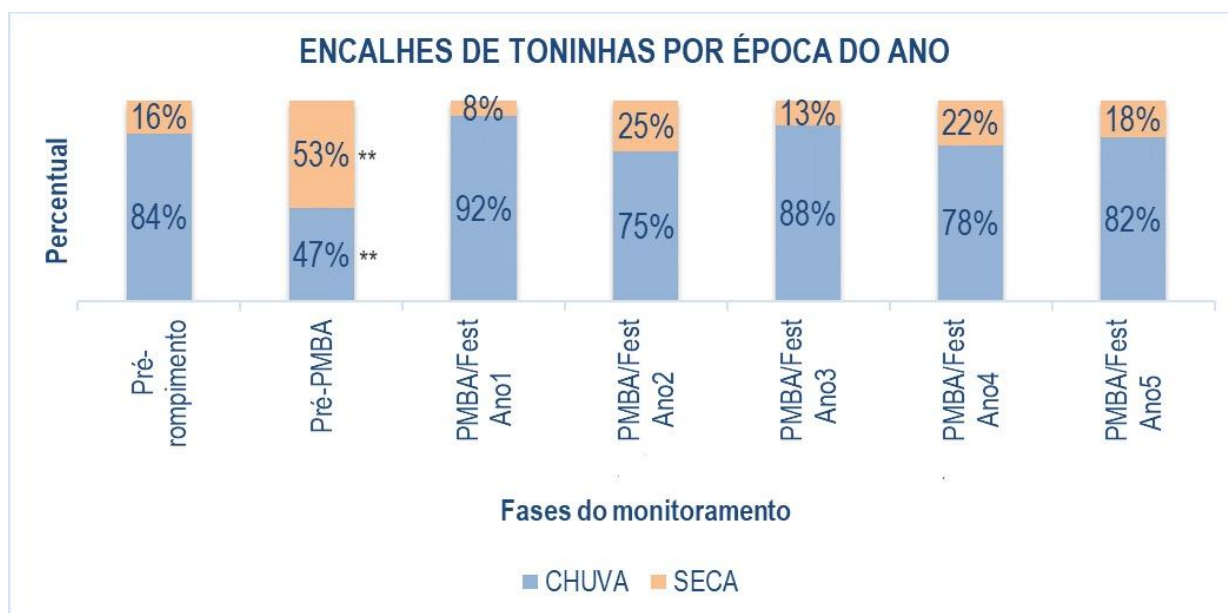
Figura 6: Distribuição de encalhes de botos-cinza (*S. guianensis*) em relação às estações anuais desde início de janeiro de 2012 até final de setembro de 2023. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indicam que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam que é altamente significativo



Para análise estatística foi utilizado o Teste Z e o Teste Exato de Fisher, com exclusão dos dados do PMBA Ano 6, devido ao período sazonal de monitoramento ser de apenas quatro meses para esse relatório. As comparações dos resultados foram embasadas nos padrões de encalhes pretéritos da fase Pré-rompimento com as demais fases do monitoramento. Diminuições significativas na proporção de encalhes de botos-cinza foram observadas nas estações anuais das fases PMBA Ano1 e Ano 5 para primavera ($Z = 2,47$, $p < 0,05$; $Z = 2,28$, $p < 0,05$), na fase PMBA Ano1 para outono ($Z = 2,26$, $p < 0,05$), e PMBA Ano 3 e Ano 4 durante inverno ($Z = 3,97$, $p < 0,01$; $Z = 2,17$, $p < 0,05$). Já aumentos significativos na proporção de encalhes de botos-cinza foram observados no verão, para PMBA Ano1 e Ano 3 ($Z = -4,69$, $p < 0,01$; $Z = -2,92$, $p < 0,01$), e também no outono na fase PMBA Ano 5 ($Z = -2,017$, $p < 0,05$). Da Cunha Ramos (2024) observou aumentos significativos nos encalhes de boto-cinza na primavera durante a fase aguda (Pré-PMBA) e no verão durante a fase crônica.

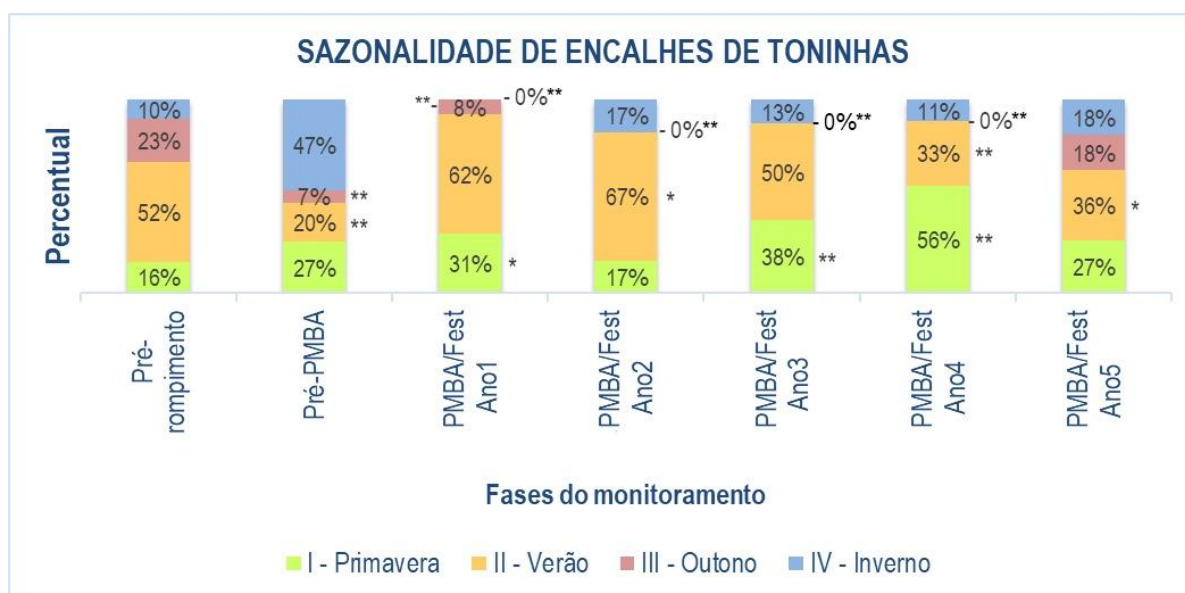
3.2.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Figura 7: Frequência da distribuição de encalhes de toninhas (*P. blainvillei*) entre períodos seco (abril a setembro) e chuvoso (outubro a março) desde início de janeiro de 2012 até final de setembro de 2023. No gráfico, os valores acompanhados de dois asteriscos (**) indicam que são altamente significativos



O Teste Z foi aplicado para análise estatística com exclusão dos dados do PMBA Ano 6, devido ao período sazonal de monitoramento ser de apenas quatro meses para esse relatório. Os encalhes de toninha foram mais frequentes no período chuvoso em todas as fases do monitoramento, com a única exceção na fase Pré-PMBA (23/11/2015 a 30/09/2018), fase aguda após o rompimento da barragem de Fundão-MG, apresentando uma diferença altamente significativa no padrão de encalhes ($Z = -5,50$, $p < 0,01$). Nesta fase foi observado uma inversão no padrão de encalhes com maior proporção no período seco, diferente da fase pretérita ao acidente e das demais fases subsequentes do estudo. Da Cunha Ramos (2024), também detectou essa disparidade para a espécie, entre as estações chuvosa e seca na fase Pré-PMBA em relação a fase pretérita (Pré-rompimento) e a fase crônica (Anos 1 e 2), com ocorrências de encalhes 5,3 e 5,2 vezes maiores, respectivamente. Esta alteração de padrão é um alerta que precisa ser destacado, pois pode sinalizar uma fragilidade de indivíduos desta espécie para perturbações abruptas do ambiente.

Figura 8: Distribuição de encalhes de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) em relação às estações anuais desde início de janeiro de 2012 até final de setembro de 2023. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indicam que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam que são altamente significativos

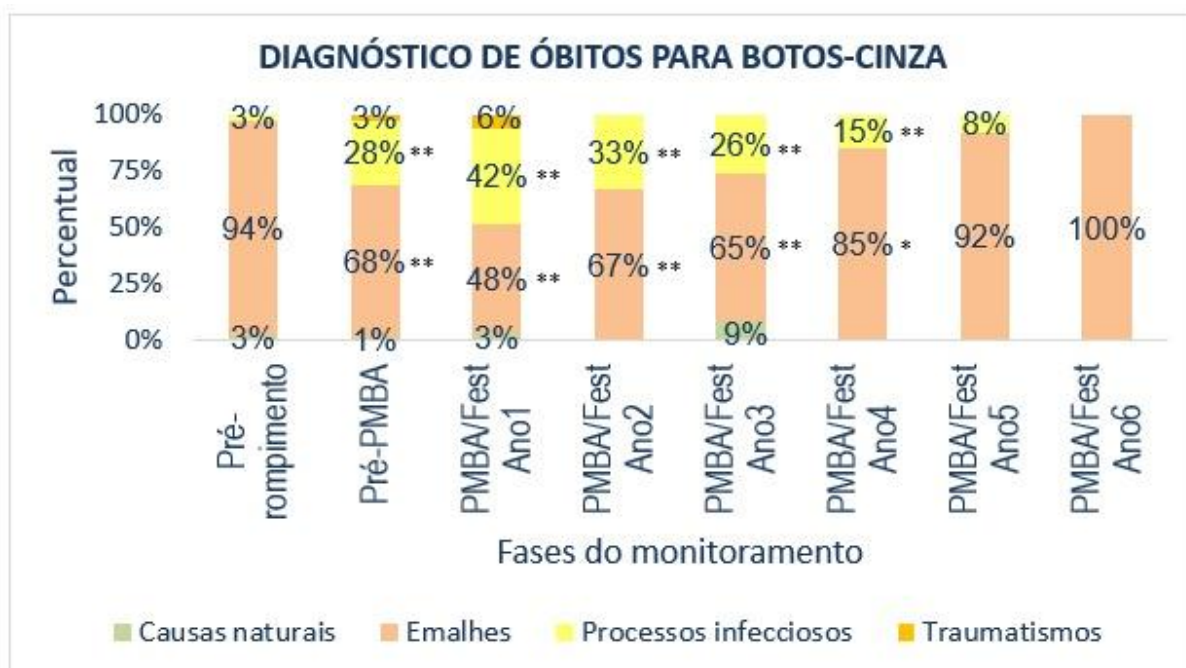


Nesta análise, além do Teste Z também foi utilizado o Teste Exato de Fisher com exclusão dos dados do PMBA Ano 6, devido ao período sazonal de monitoramento ser de apenas quatro meses para esse relatório. As comparações dos resultados foram embasadas nos padrões de encalhes pretéritos da fase Pré-rompimento com as demais fases do monitoramento. Diminuições significativas na proporção de encalhes de toninhas foram observadas nas estações anuais das fases Pré-PMBA, Ano 4 e Ano 5 no verão ($Z = 4,71$, $p < 0,01$; $Z = 2,72$, $p < 0,01$ e $Z = 2,28$, $p < 0,05$), na fase PMBA Ano 1 para inverno (Teste de Fisher, $p < 0,01$), nas fases PMBA Ano 2, Ano 3 e Ano 4 durante outono (Teste de Fisher, $p < 0,01$), e fase Pré-PMBA e PMBA Ano 1, para outono ($Z = 3,17$, $p < 0,01$ e $Z = 2,93$, $p < 0,01$). Já em relação aos aumentos significativos na proporção de encalhes de toninhas foram observadas no verão, para PMBA Ano 2 ($Z = -2,16$, $p < 0,05$), também para a primavera nas fases PMBA Ano 1, Ano 3 e Ano 4 ($Z = -2,50$, $p < 0,05$; $Z = -3,50$, $p < 0,01$ e $Z = -5,89$, $p < 0,01$), e no inverno no momento agudo do impacto, correspondente à fase Pré-PMBA ($Z = -5,80$, $p < 0,01$). Esses resultados correspondem com os achados por Da Cunha Ramos (2024), evidenciando uma mudança nos padrões de encalhes das toninhas após o rompimento da barragem de Fundão-MG, mostrando uma predominância no inverno durante a fase aguda (Pré-PMBA) com aumento de 3,1 vezes em comparação com a fase anterior, e aumento significativo do verão nas fases crônicas do monitoramento.

3.3 TAXA DE ÓBITO PARA *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI* DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE

3.3.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Figura 9: Percentual de diagnósticos conclusivos para botos-cinza (*Sotalia guianensis*) ao longo das fases de monitoramento entre início de janeiro de 2012 até janeiro de 2024. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indicam que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam que são altamente significativos



O diagnóstico de óbito por emalhe accidental para botos-cinza apresentou diminuição significativa na análise proporcional aos demais diagnósticos e em relação ao período Pré-rompimento (01/01/2012 a 22/11/2015). Esta diminuição proporcional foi observada em todas as fases posteriores ao rompimento, exceto para as fases PMBA no Ano 4 (01/10/2021 a 30/09/2022) e Ano 5 (01/10/2023 a 30/09/2023) que compreendem os últimos anos analisados no relatório. Em relação ao quadrimestre do Ano 6 (01/10/2023 a 31/01/2024), todos os animais diagnosticados vieram a óbito devido ao emalhe accidental. Segue a descrição dos valores de p de acordo com a figura acima (Pré-PMBA, $Z = 4,69$, $p < 0,01$; PMBA Ano 1, $Z = 7,17$, $p < 0,01$; Ano 2, $Z = 4,82$, $p < 0,01$; Ano 3, $Z = 5,08$, $p < 0,01$ e Ano 4, $Z = 2,08$, $p < 0,05$). Outras causas de óbito apresentaram aumento significativo, por exemplo, traumatismo no Ano 1 (Teste de Fisher, $p < 0,05$), e os óbitos relacionados com processos infecciosos estiveram significativamente mais elevados desde a fase Pré-PMBA até PMBA Ano 4 (Teste de Fisher, $p < 0,01$). Esse aumento altamente significativo dos óbitos de botos-cinza devido a doenças após o rompimento da barragem de Fundão-MG, sugere que esses animais sofreram influência do evento e com o passar dos anos a população tem apresentado uma melhora. Os animais mais fracos e vulneráveis possivelmente morreram na fase aguda e crônica, e no Ano 5 houve uma melhora com uma geração de animais mais resistentes. Em relação à diminuição dos óbitos por emalhe accidental a partir da fase Pré-PMBA, possivelmente pode estar relacionada à liminar de 22 de fevereiro de 2016, que proibiu a pesca de qualquer natureza, com exceção aquela destinada à pesquisa científica, numa faixa marinha delimitada ao

sul por Barra do Riacho, no município de Aracruz, ao norte pela praia de Degredo, no município de Linhares, e ao leste até onde a plataforma continental alcança 25 metros, por consequência do rompimento da barragem de Fundão-MG.

Quadro 6: Código de decomposição dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhados, aplicado nas fases de monitoramento correspondentes, no âmbito do Projeto de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA/Fest). Códigos de decomposição: COD I (vivo); COD II (recém-morto, até 24 horas); COD III (decomposição inicial); COD IV (decomposição avançada); e COD V (decomposição final). As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência, e os valores com asterisco indicam valores significativos. O Ano 6 de monitoramento abrange apenas quatro meses, sendo de 01/10/2023 a 31/01/2024

Boto-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	PMBA Ano 1	PMBA Ano 2	PMBA Ano 3	PMBA Ano 4	PMBA Ano 5	PMBA Ano 6
I	0,0%	0,5%**	0,0%	2,2%	0,0%	1,3%	5,4%	0,0%
II	11,6%	5,5%*	6,4%	8,9%	4,3%*	7,8%	0,0%	2,9%*
III	28,4%	23,9%	20,5%	14,4%	12,9%	9,1%	13,0%	11,4%
IV	48,3%	56,7%	56,4%	56,7%	57,0%*	70,1%**	69,6%	60,0%
V	11,6%	13,4%	16,7%	17,8%	25,8%	11,7%	12,0%	25,7%
Total	200	186	47	55	62	53	56	26

Na análise do código de decomposição dos botos-cinza foi possível observar que em todas as fases do monitoramento a maior parte dos animais avaliados estavam em processo de decomposição avançada (COD IV) e que nas fases do PMBA Ano 3 e Ano 4, esse aumento foi altamente significativo. Por outro lado, já os animais vivos (COD I) foram os que menos encalharam e apresentaram um aumento significativo na fase Pré-PMBA, correspondendo ao período agudo da chegada do material oriundo do rompimento da barragem de Fundão-MG no mar, sugerindo que os botos-cinza podem ter sido afetados diretamente. Os animais que encalharam em bom estado (COD II), com menos de 24 horas de óbito, apresentaram resultados significativamente menor nas fases Pré-PMBA, PMBA Ano 3 e PMBA Ano 6.

Quadro 7: Relação entre percentuais de carcaças de botos-cinza com sexagem definida e razão sexual dos animais ao longo das fases de monitoramento. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência e os valores com um asterisco indicam valores significativos e com dois (**) altamente significativos. Razão M/F é expressa pela divisão entre o número absoluto de machos por fêmeas

Sexagem	Pré-rompimento	Pré-PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano5	PMBA Ano6
Determinada	53%	60,2%	95,7%**	78,2%**	88,7%**	88,7%**	85,7%**	30,8%*
Indeterminada	47%	39,8%	4,3%**	21,8%**	11,3%**	11,3%**	14,3%**	23,1%*
Totais	200	186	47	55	62	53	56	26
Macho	33%	31,3%	33,3%	34,9%	45,5%	44,7%	39,6%	60%

Sexagem	Pré- rompimento	Pré- PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano5	PMBA Ano6
Fêmea	67%	68,8%	66,7%	65,1%	54,5%	55,3%	60,4%	40%
Totais	106	112	45	43	55	47	48	20
Razão macho/fêmea	0,49	0,45	0,5	0,54	0,83	0,81	0,66	1,5

A proporção de carcaças de boto-cinza que puderam ter o seu sexo definido durante as necropsias foi significativamente maior para todas as fases pós rompimento da barragem de Fundão-MG, Pré-PMBA ($Z = -1,26$, $p < 0,05$), PMBA Ano 1 ($Z = -22,32$, $p < 0,01$), PMBA Ano 2 ($Z = -15,20$, $p < 0,01$), PMBA Ano 3 ($Z = -16,09$, $p < 0,01$), PMBA Ano 4 ($Z = -18,37$, $p < 0,01$), PMBA Ano 5 ($Z = -16,78$, $p < 0,01$), PMBA Ano 6 ($Z = 2,13$, $p < 0,01$). A estatística e valores de p para sexagem indeterminada seguiram os mesmos parâmetros para as respectivas fases. Na análise das frequências sexuais ao longo das fases de monitoramento comparando com a fase Pré-rompimento e em relação à razão sexual, também não houve diferenças significativas. Contudo, a frequência de encalhes das fêmeas de boto-cinza se apresentou mais elevada em todas as fases do estudo, com a única exceção no quadrimestre do Ano 6 (01/10/2023 a 31/01/2024).

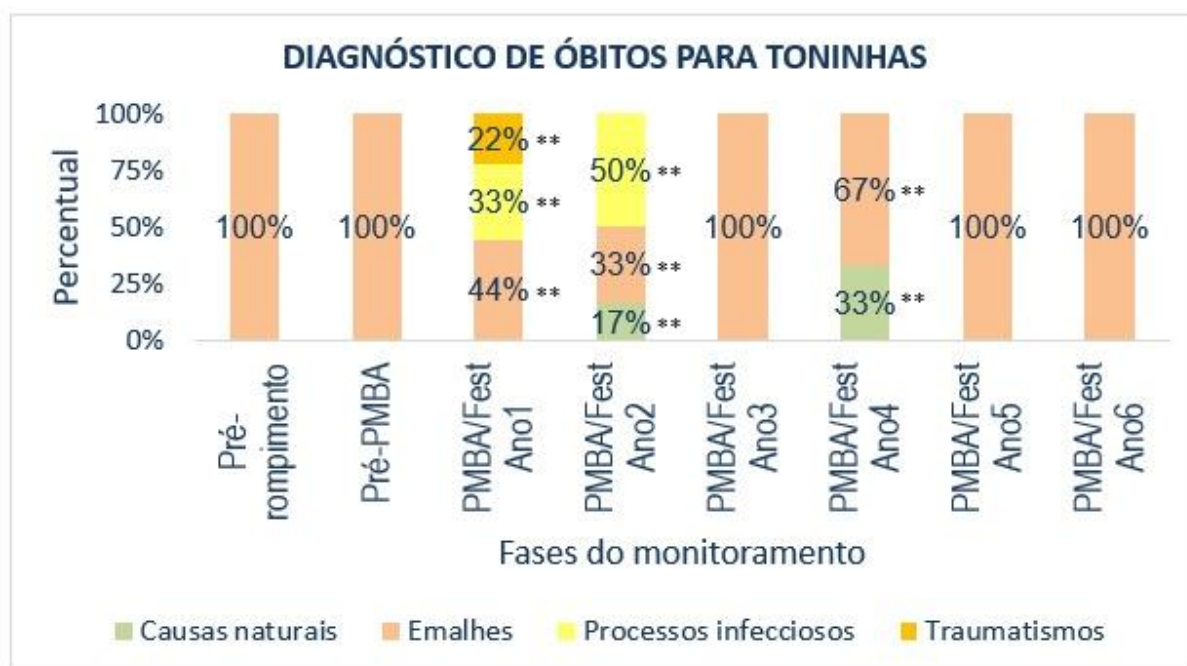
Quadro 8: Percentual de faixa etária de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhados nas fases de monitoramento. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência. O Ano 6 de monitoramento abrange apenas quatro meses, sendo de 01/10/2023 a 31/01/2024

Boto-cinza	Pré-rompi- mento	Pré- PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano 5	PMBA Ano 6
Determinada	89%	93%	100%*	96,4%	96,8%	96,2%	100%**	96%
Indeterminada	11%	7%	0%*	3,6%	3,2%	3,8%	0%**	4%
Filhote	3%	5,4%	12,8%*	5,5%	6,5%	5,7%	1,8%	0%
Juvenil	31%	42,5%	31,9%	32,7%	38,7%	24,5%	35,7%	32%
Adulta	55%	45,2%	55,3%	58,2%	51,6%	66%	62,5%	64%
Total	200	186	47	55	62	53	56	25

Em relação a faixa etária de maior frequência, os encalhes de adultos apresentaram maior ocorrência em todas as fases do monitoramento, porém sem relevância estatística. No entanto, houve aumento significativo de encalhe de juvenis na fase Pré-PMBA e de filhotes na fase PMBA Ano1, ou seja, na fase aguda do rompimento da barragem de Fundão-MG, morreu um número maior de animais imaturos. Esses resultados são sugestivos de impacto do rompimento sobre a mortalidade de botos-cinza mais jovens nos primeiros anos após a rompimento da barragem.

3.3.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Figura 10: Percentual de diagnósticos conclusivos para toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ao longo das fases de monitoramento entre início de janeiro de 2012 até janeiro de 2024. O Ano 6 abrange apenas quatro meses de monitoramento, sendo de 01/10/2023 a 31/01/2024. No gráfico, os valores acompanhados de um asterisco (*) indica que é estatisticamente significativo e acompanhado de dois asteriscos (**) indicam que são altamente significativos



A análise de óbitos de toninhas revelou que todos os animais cujo diagnóstico foi determinado, faleceram devido ao emalhe nos períodos Pré-rompimento, Pré-PMBA, Ano 3, Ano 5 e Ano 6. Os óbitos de toninhas decorrentes do emalhe apresentaram um decréscimo significativo nas fases do PMBA Ano 1, Ano 2 e Ano 4 em relação ao índice da fase pretérita devido à detecção de outras causas de mortalidade (Teste de Fisher, $p < 0,01$). O índice de traumatismo foi significativo no Ano 1 (Teste de Fisher, $p < 0,01$), os processos infecciosos foram significativos nos Anos 1 e 2 (Teste de Fisher, $p < 0,01$) e as mortes por causas naturais foram significativas nos Anos 2 e 4 (Teste de Fisher, $p < 0,01$). Este aumento proporcional de diagnósticos de processos infecciosos nos Anos 1 e 2 do PMBA acendem um alerta para a possibilidade de impacto do rompimento da barragem de Fundão-MG para a saúde e sobrevivência de indivíduos no período posterior.

Quadro 9: Código de decomposição das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encalhadas, aplicado nas fases de monitoramento correspondentes ao período chuvoso, no âmbito do Monitoramento do PMBA/Fest. Códigos de decomposição: COD I (vivo); COD II (recém-morto, até 24 horas); COD III (decomposição inicial); COD IV (decomposição avançada); e COD V (decomposição final). As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência. O ano 6 abrange apenas quatro meses de monitoramento, sendo de 01/10/2023 a 31/01/2024

Toninha	Pré- rompiment o	Pré- PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano 5	PMBA Ano 6
I	0,0%	0,5%	0,0%	2,2%	0,0%	1,3%	5,4%	0,0%
II	11,6%	5,5%	6,4%	8,9%	4,3%	7,8%	0,0%	2,9%
III	28,4%	23,9%	20,5%	14,4%	12,9%	9,1%	13,0%	11,4%
IV	48,3%	56,7%	56,4%	56,7%	57,0%	70,1%	69,6%	60,0%
V	11,6%	13,4%	16,7%	17,8%	25,8%	11,7%	12,0%	25,7%
Total	200	186	47	55	62	53	56	26

As toninhas apresentaram em maior frequência o estado de decomposição avançado (COD IV) em todas as fases, porém entre os anos não houveram diferenças significativas. Na avaliação dos outros códigos de decomposição, também não foram observadas diferenças significativas ao longo dos anos de monitoramento.

Quadro 10: Relação entre percentuais de carcaças de toninhas com sexagem definida e razão sexual dos animais ao longo das fases de monitoramento. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência e os valores com um asterisco indicam valores significativos e com dois (**) altamente significativos

Sexagem	Pré- rompimento	Pré- PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano5	PMBA Ano6
Determinada	48%	53%	77%	67%	25%	44%	64%	33%
Indeterminada	52%	47%	23%	33%	75%**	56%	36%	67%
Totais	31	15	13	12	8	9	11	6
Macho	33.3%	93.3%*	73.3%	73.3%	100%	93.3%	60%	100%
Fêmea	66.7%	6.7%*	26.7%	26.7%	0%	6.7%	40%	0%
Totais	15	8	10	8	2	4	7	2
Razão macho/fêmea	0.5	14**	2.75	2.75	#DIV/0!	14**	1.5	#DIV/0!

* Razão M/F é expressa pela divisão entre o número absoluto de machos por fêmeas.

A proporção de carcaças de toninhas que puderam ter o seu sexo definido durante as necropsias foi significativamente maior para as fases PMBA Ano 1, Ano 2 e Ano 5 ($Z = -4,24$, $p < 0,01$; $Z = -2,78$, $p < 0,01$ e $Z = -2,28$, $p < 0,05$) e significativamente menor no Ano 3 ($Z = 3,39$, $p < 0,01$). A estatística e valores de p para sexagem indeterminada seguiram os mesmos parâmetros para as respectivas fases. Em relação à razão sexual das toninhas, pode-se observar que no Pré-rompimento havia maior porcentagem de fêmeas mortas encalhadas e que a partir do rompimento da barragem de Fundão-MG, desde a fase Pré-PMBA foi possível observar uma inversão estatisticamente significativa na proporção de óbitos predominantes após a chegada do material oriundo do rompimento da barragem de Fundão-MG no mar, aumentando sete vezes a mortalidade de animais machos. Essa significância foi observada durante toda a fase Pós-rompimento, sendo assim, Pré-PMBA ($Z = -8,80$, $p < 0,01$), PMBA Ano 1 ($Z = -5,67$, $p < 0,01$), PMBA Ano 2 ($Z = -5,67$, $p < 0,01$), PMBA Ano 3 (Fisher, $p < 0,01$), PMBA Ano 4 ($Z = -8,80$, $p < 0,01$), e PMBA Ano 5 ($Z = -3,78$, $p < 0,01$). As estatísticas e valores de p são os mesmos para ambos os sexos. Em relação a fase do Ano 6, que compreende quatro meses (01/10/2023 a 31/01/2024), foi identificado o sexo somente de dois machos e não apresentaram relevância estatística.

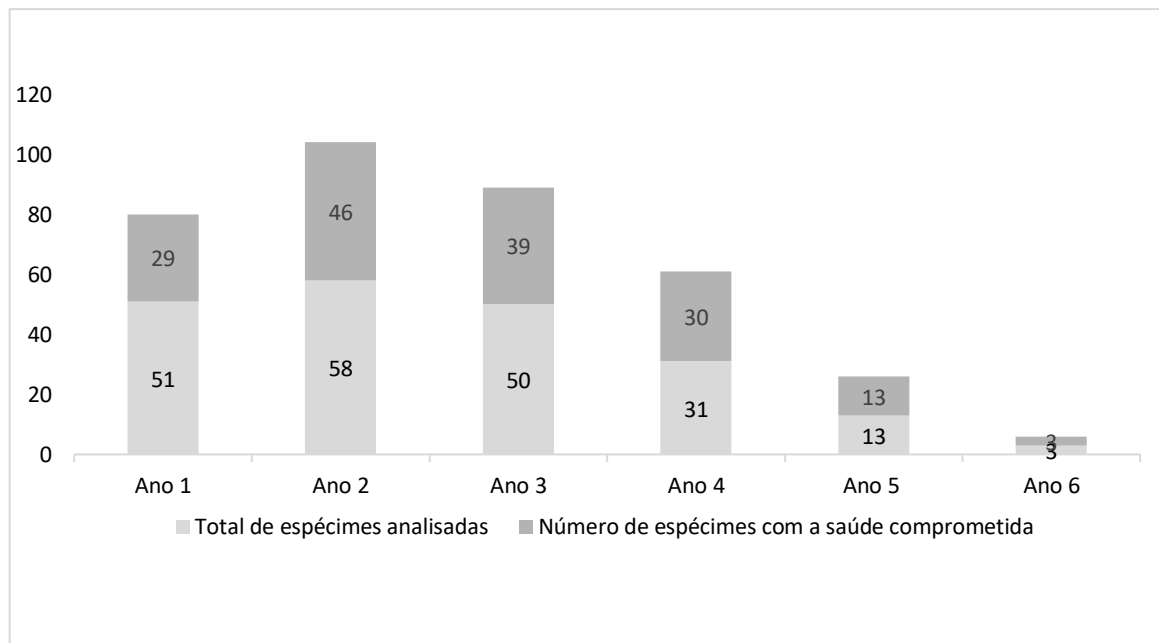
Quadro 11: Percentual de faixa etária de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encalhadas nas fases de monitoramento durante o período chuvoso. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência

Toninha	Pré-rompimento	Pré-PMBA	PMBA Ano1	PMBA Ano2	PMBA Ano3	PMBA Ano4	PMBA Ano 5	PMBA Ano 6
Determinada	90,3%	93,3%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Indeterminada	9,7%	6,7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Filhote	16,1%	33,3%	23,1%	16,7%	25%	33,3%	27,3%	0,0%
Juvenil	51,6%	46,7%	61,5%	25%	62,5%	55,6%	45,5%	50%
Adulta	22,6%	13,3%	15,4%	58,3%	12,5%	11,1%	27,3%	50%
Total	31	15	13	12	8	9	11	6

Não foram observadas diferenças significativas entre as faixas etárias para toninhas entre as fases do monitoramento. Em relação a frequência da faixa etária predominante, os animais jovens se destacaram em quase todas as fases, com exceção no Ano 2 (01/10/2019 a 30/09/2020) em que encalharam mais toninhas adultas. Mesmo não apresentando valores estatisticamente significativos, esses achados podem sugerir que para essa espécie os animais mais jovens são mais vulneráveis.

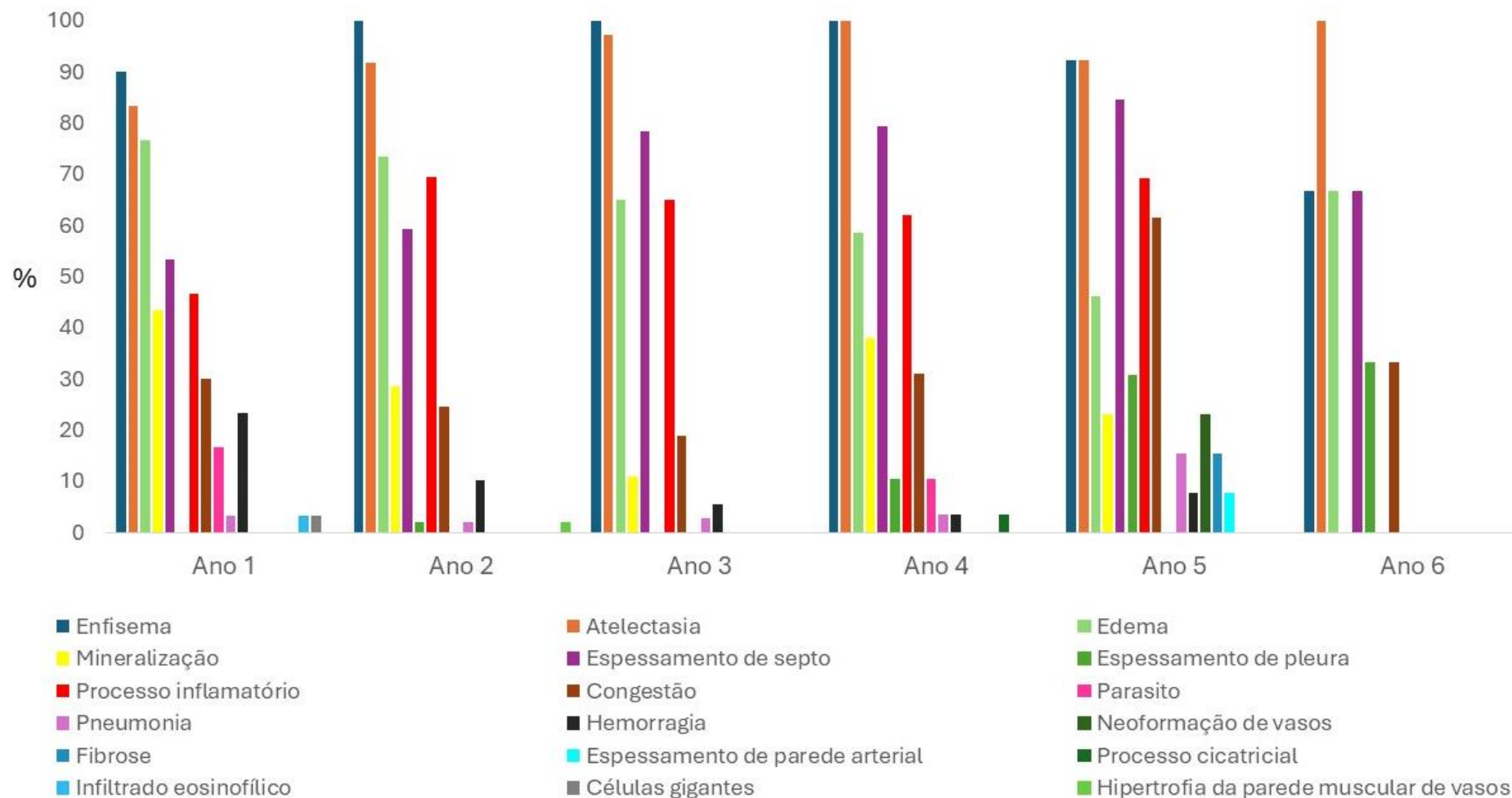
3.4 SAÚDE DOS CETÁCEOS

Figura 11: Número total de espécimes avaliados e número de espécimes que apresentavam a saúde comprometida, baseado na análise histopatológica do Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest



Até o Ano 4 foram avaliadas todas as espécies que encalharam, a partir do Ano 5, considerando a solicitação do novo escopo, foram mantidas nas análises somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. O número de espécimes avaliados histologicamente em todos os anos do PMBA/Fest foram os seguintes, Ano 1: 51 espécimes, Ano 2: 58 espécimes, Ano 3: 50 espécimes, Ano 4: 31 espécimes, Ano 5: 13 espécimes, Ano 6 (amostras até janeiro de 2024): 3 espécimes. Para as análises histopatológicas, o nível de degradação das amostras tem influência na avaliação, e o número amostral de órgãos/tecidos coletados variam conforme o espécime, por isso, o número de indivíduos estudados diferencia-se do número de órgãos analisados. O número de espécimes avaliados que apresentaram a saúde comprometida baseou-se em amostras que possuíam qualidade favorável para a análise histopatológica. Em razão disso, embasado nos achados patológicos e no estudo das características das lesões e alterações funcionais dos órgãos afetados, todos os espécimes que puderam ser examinados com acurácia apresentaram a saúde comprometida e não houve variação anual, com órgãos que apresentavam debilidade, mal desempenho das funções fisiológicas e como efeito, presumivelmente uma alteração sistêmica desfavorável aos organismos, para o Ano 1: 29 espécimes, Ano 2: 46 espécimes, Ano 3: 39 espécimes, Ano 4: 30 espécimes, Ano 5: 13 espécimes e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024): 3 espécimes. Os achados patológicos, embora possam ter origem diversa, desde congênitos, contaminação ambiental direta ou indireta, alterações fisiológicas causadas por toxinas e acidentes mecânicos, causam baixa no sistema imune, permitindo uma chance maior de infecções secundárias por microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas. Animais com a saúde impactada possuem diferentes níveis de desempenho físico em resposta a debilidade de seu organismo, muitos, inclusive, se tornam mais apáticos e lentos, prejudicando a performance no forrageamento, alimentação e desvio de barcos ou aparatos de pesca, facilitando o emalhe accidental.

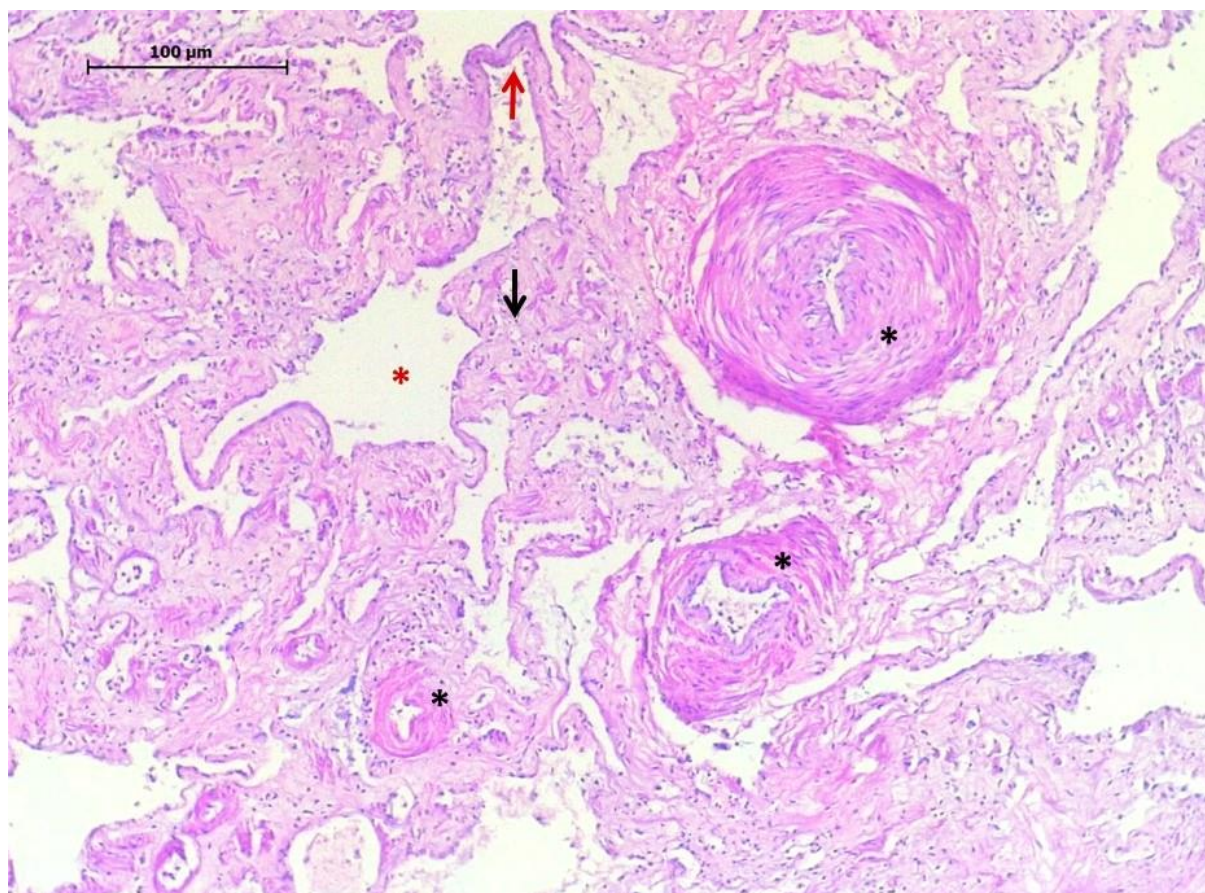
Figura 12: Achados histopatológicos em amostras de pulmão dos cetáceos encontrados encalhados no ES, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest



Para os pulmões, no Ano 1 foram avaliadas 30 amostras, para o Ano 2: 49 amostras, para o Ano 3: 37 amostras, para o Ano 4: 29, sendo que até o Ano 4 foi avaliado o conjunto de dados completo, com todas as espécies encalhadas. Para o Ano 5: 13 amostras e para o Ano 6 (amostras até janeiro de 2024): 3 amostras, sendo que a partir do Ano 5 foram avaliadas somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. O nível de deterioração das amostras biológicas influencia diretamente a análise histopatológica. Cada espécime possui um nível de decomposição diferente e nem todos os animais estudados possuíam pulmões em condições de análise, devido a autólise post-mortem ou não tiveram os pulmões coletados, por isso o número de animais estudados diferencia-se do número de amostras analisadas por órgão. Os achados pulmonares foram compatíveis com a literatura e são, por vezes, associados a causa de morte dos animais marinhos por afetarem o sistema respiratório, prejudicando o funcionamento de outros órgãos. Dentre as várias lesões descritas, enfisema e atelectasia são achados que sozinhos já evidenciam insuficiência respiratória nos animais, prejudicando a distribuição de oxigênio para outros órgãos, debilitando de forma sistêmica, permitindo o aumento de infecção por organismos patogênicos, sejam parasitas, vírus, fungos ou bactérias. Referente a série temporal completa do PMBA/Fest, parasitos foram identificados em algumas amostras pulmonares (N=8), além da mineralização (N=45), que também pode indicar a presença desses organismos, contudo, a proliferação parasitária e a resposta imunológica para combater depende diretamente da saúde do espécime, não sendo possível apontar a presença como a causa da morte. Outras patologias como, fibrose, espessamento de septo, espessamento de parede arterial, espessamento de pleura, processos cicatriciais, hipertrofia de parede muscular de vasos são processos crônicos que podem afetar o funcionamento de todo o sistema respiratório e de todo o organismo. Até mesmo alguns espécimes, que tiveram como causa da morte o emalhe, apresentavam processos infecciosos e danos no sistema respiratório, o que indica que a saúde desses animais também já estava comprometida, impactando o desempenho físico em resposta a debilidade, tornando-os mais suscetíveis a emalhes.

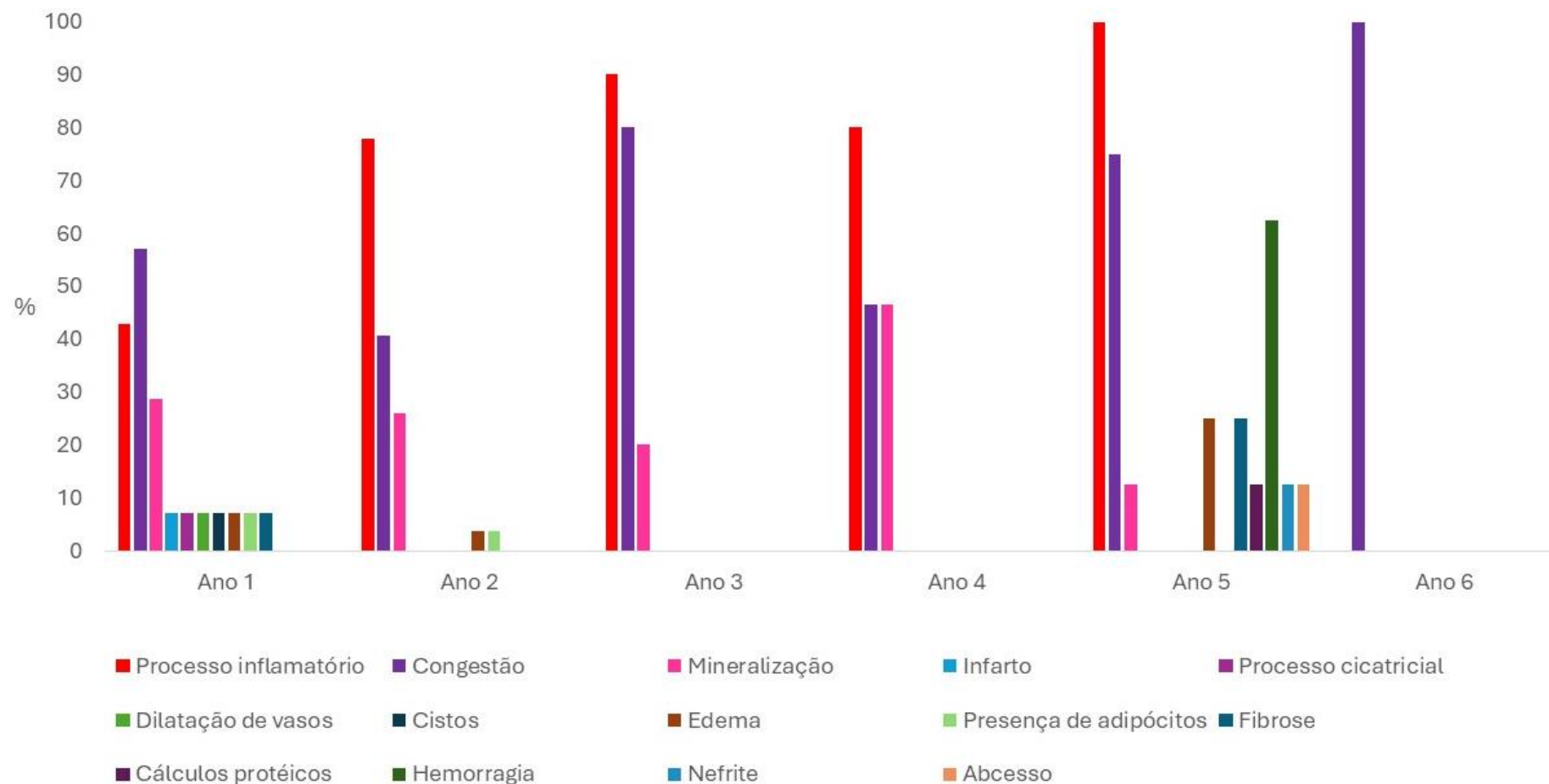
Figura 13: Fotomicrografia de Pulmão de *Pontoporia blainvillei*, EAE_N178: Espessamento de parede arterial (asterisco preto), espessamento de septo interalveolar (seta vermelha), atelectasia (seta preta) e enfisema (asterisco vermelho). Coloração: HE.

Aumento: 10X. Ano 5 PMBA/Fest



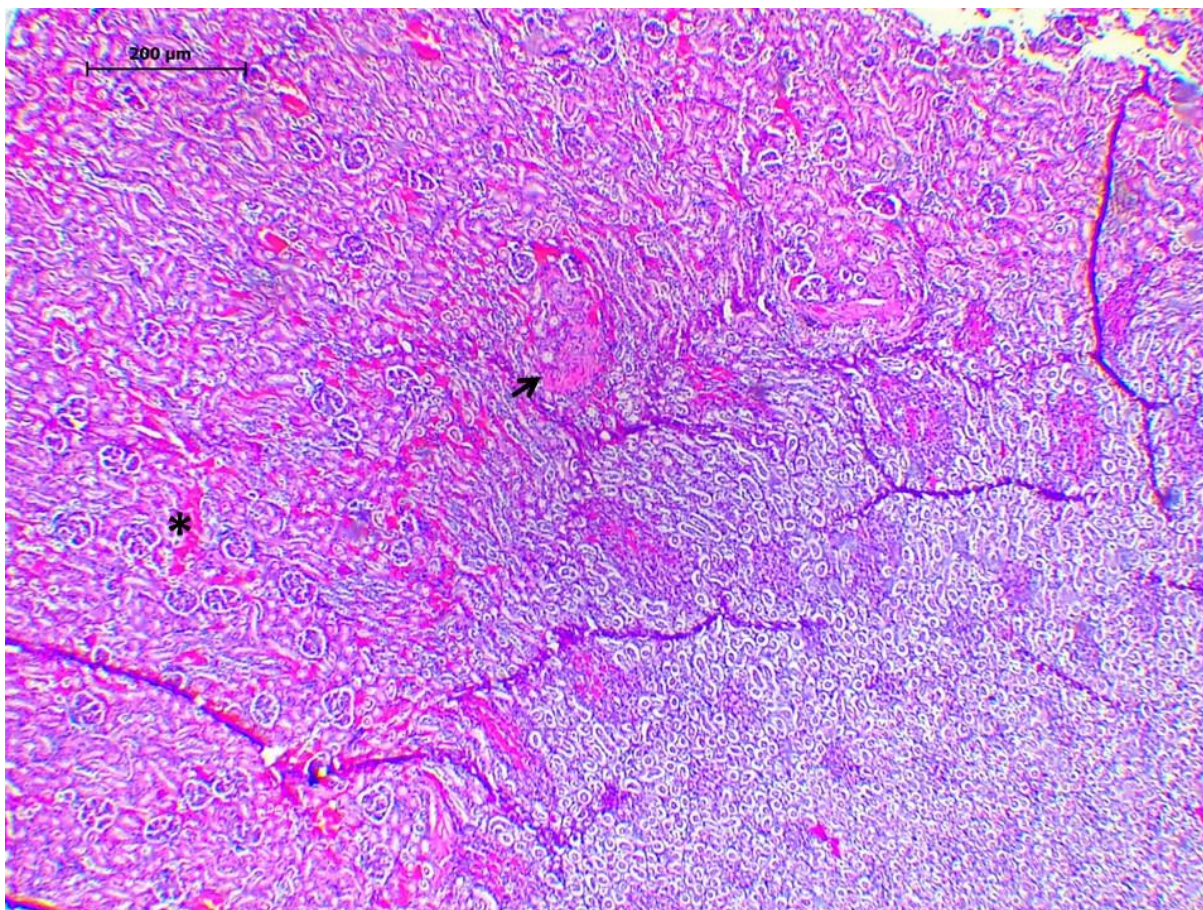
Os achados histopatológicos descritos na fotomicrografia do pulmão da toninha (*Pontoporia blainvillei*) evidenciam que o indivíduo apresentava insuficiência respiratória, principalmente pelas patologias atelectasia e enfisema, que são patologias crônicas, prejudicando o organismo de forma sistêmica, pois a falta de oxigenação afeta outros tecidos, órgãos e sistemas, afeta a imunidade, e pode permitir consequentemente o aumento de infecções, doenças, infestações de microrganismos.

Figura 14: Achados histopatológicos em amostras de rim dos cetáceos encontrados encalhados no ES, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest



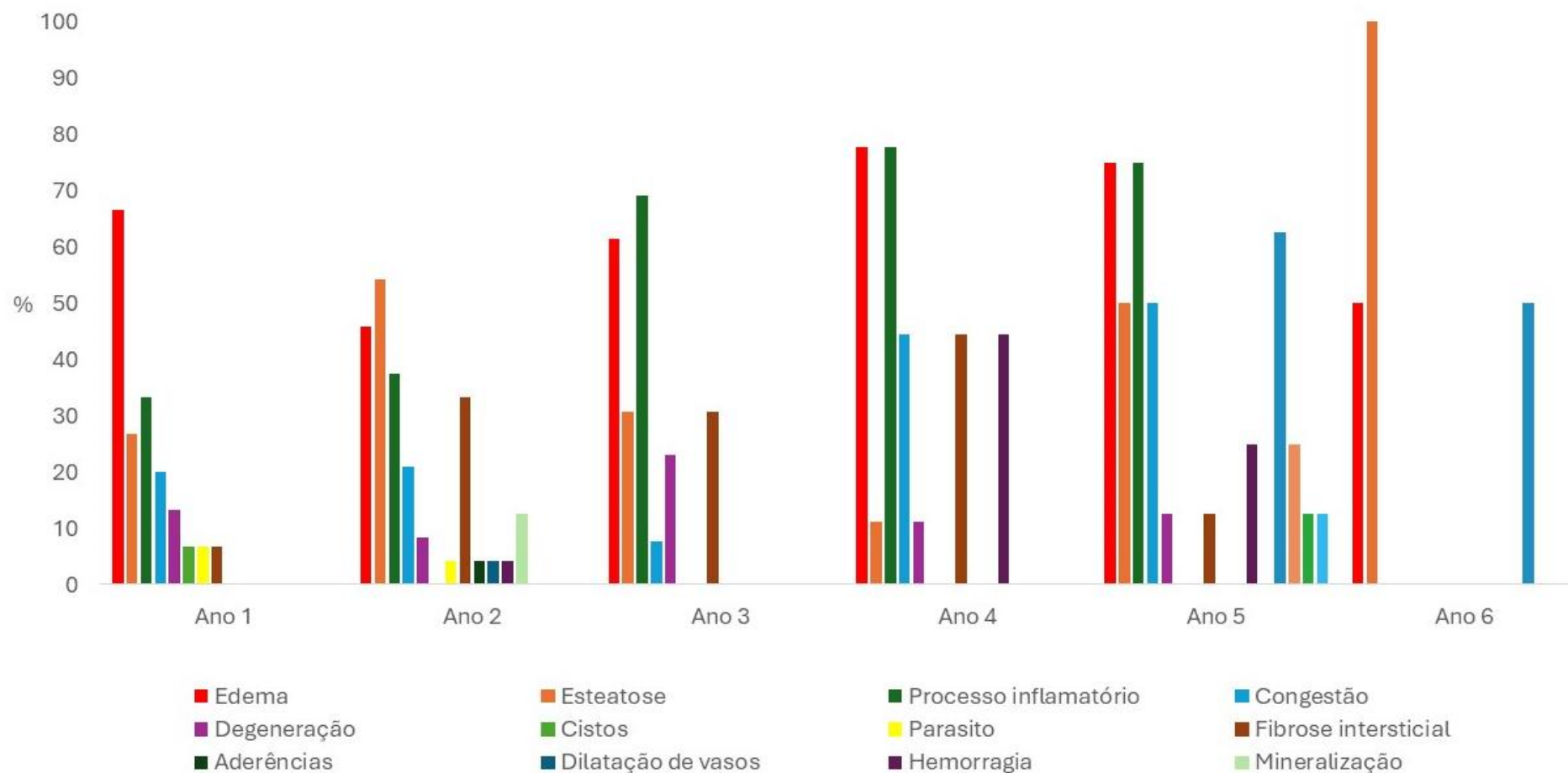
Para o Ano 1: 14 amostras de rins foram avaliadas, para o Ano 2: 27 amostras, para o Ano 3: 10 amostras, para o Ano 4: 15 amostras, sendo que até o Ano 4 foi avaliado o conjunto de dados completo, com todas as espécies encalhadas. Para o Ano 5: 8 amostras e para o Ano 6 (amostras até janeiro de 2024): 1 amostra, sendo que a partir do Ano 5 foram avaliadas somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. O nível de decomposição das amostras influencia diretamente sobre a análise histopatológica, e nem todos os animais estudados possuíam rins em condições de análise, devido a degradação ou tiveram os rins coletados, por isso o número de animais estudados diferencia-se do número de amostras analisadas por órgão. Destaca-se que processo inflamatório, congestão e mineralização apareceram na maioria dos espécimes, principalmente para amostras do Ano 3, Ano 4 e Ano 5 (exceto para o Ano 6 que ainda possui o número amostral pequeno), esses achados, incluindo a mineralização, dilatação de vasos, cálculos proteicos, cistos, infarto, abscesso e fibrose, que são consideradas lesões crônicas, evidenciam que os espécimes apresentavam debilidade no órgão, por conseguinte, tinham seu sistema renal afetado e a saúde geral do organismo comprometida. O acúmulo de alguns contaminantes, que em níveis elevados pode sobrecarregar os rins também tem sido associado a lesões hepáticas e pode ademais ser observado nos números elevados encontrados neste estudo.

Figura 15: Fotomicrografia de Rim de *Sotalia guianensis*, EAE_S212: Congestão (asterisco preto), processo inflamatório difuso e fibrose (seta preta). Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



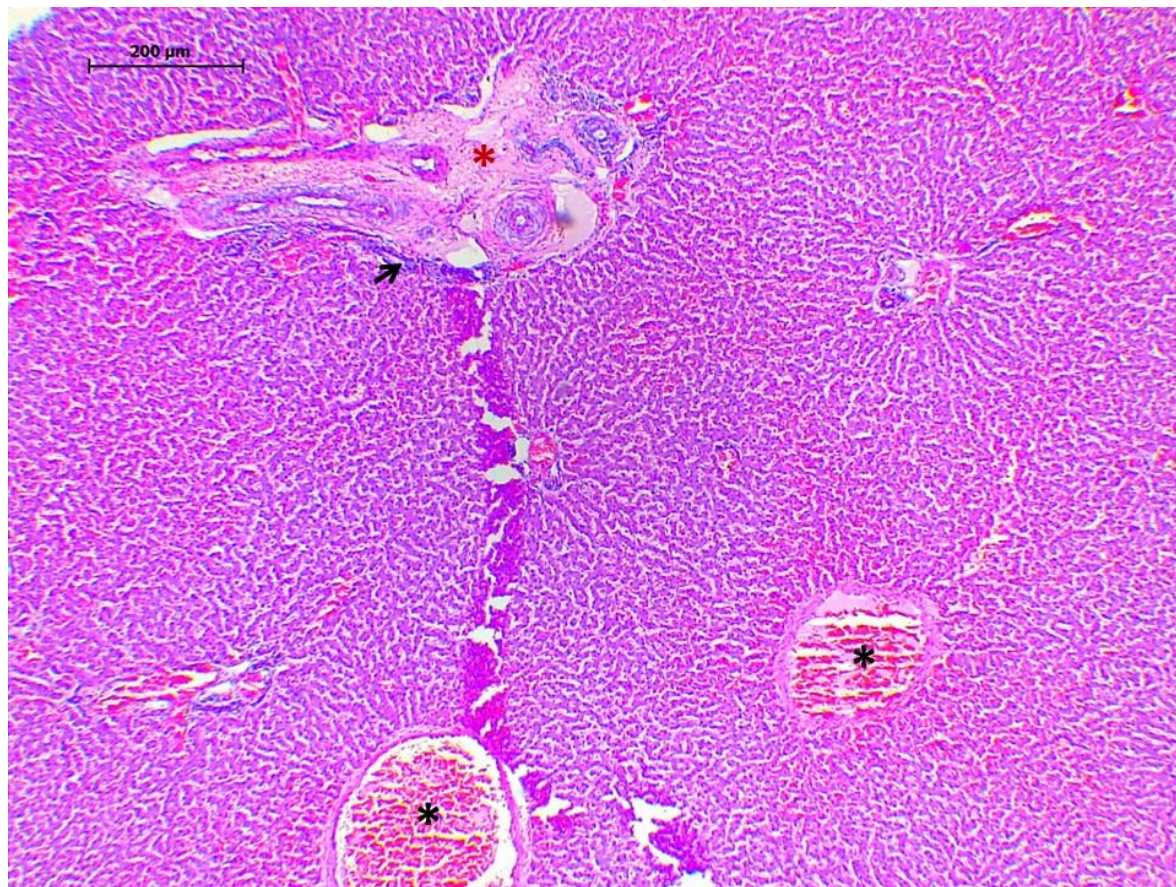
Os achados histopatológicos, fibrose e processo inflamatório, encontrados nos rins do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) EAE_S212, evidenciam que o órgão apresentava debilidade, podendo causar insuficiência renal, comprometendo a saúde do espécime de forma sistêmica.

Figura 16: Achados histopatológicos em amostras hepáticas dos cetáceos encontrados encalhados no ES, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest



Para as análises hepáticas, no Ano 1 foram avaliadas 15 amostras, para o Ano 2: 24 amostras, para o Ano 3: 13 amostras, para o Ano 4: 9, sendo que até o Ano 4 foi avaliado o conjunto de dados completo, com todas as espécies encalhadas. para o Ano 5: 8 amostras e para o Ano 6 (amostras até janeiro de 2024): 2 amostras, sendo que a partir do Ano 5 foram avaliadas somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. O nível de decomposição das amostras influencia diretamente sobre a análise histopatológica, e nem todos os animais estudados possuíam fígados em condições de análise, devido a degradação ou tiveram os fígados coletados, por isso o número de animais estudados diferencia-se do número de amostras analisadas por órgão. Os achados hepáticos revelaram principalmente altas frequências de edema, esteatose e processo inflamatório, sendo que a esteatose é normalmente relacionada a distúrbios metabólicos primários, devido a mudanças fisiológicas causadas inicialmente por jejum, inanição ou alterações alimentares, é uma lesão frequente no fígado dos cetáceos e pode estar relacionada ao óbito, tanto de forma direta quando indireta. Cisto, fibrose intersticial, aderências, dilatação de vasos e mineralização, são patologias crônicas que levam a debilidade do órgão e do sistema hepático e consequentemente prejudicam a saúde do animal. Lesões hepáticas identificadas neste estudo já foram mencionadas na literatura por Gulland et al. (2001) e Jaber et al. (2004), e muitas vezes associadas a contaminantes ambientais, que em níveis elevados no ambiente pode prejudicar a função hepática e outros órgãos. De forma sistêmica as alterações podem baixar a imunidade dos espécimes de cetáceos, tornando-os mais suscetíveis a outras infecções e doenças. Níveis elevados de contaminantes foram identificados nos espécimes deste estudo, afetando diretamente a saúde dos indivíduos e podendo prejudicar a população por conter toxinas que causam lesões, alteram a imunidade, o sistema endócrino e reprodutor.

Figura 17: Fotomicrografia de Fígado de *Sotalia guianensis*, EAE_S214: Congestão (asterisco preto), processo inflamatório (seta preto), fibrose (asterisco vermelho). Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 4 PMBA/Fest



Com os achados hepáticos pode-se evidenciar o comprometimento do órgão e, se tratando de um órgão de metabolização, pode afetar outros sistemas, debilitar o espécime, diminuir a resposta imune, aumentando o risco de infecções secundárias.

Figura 18: Costela com fratura e remodelamento, com calo ósseo (seta) de *Sotalia guianensis* (EAE_N183), Ano 5 do PMBA/Fest



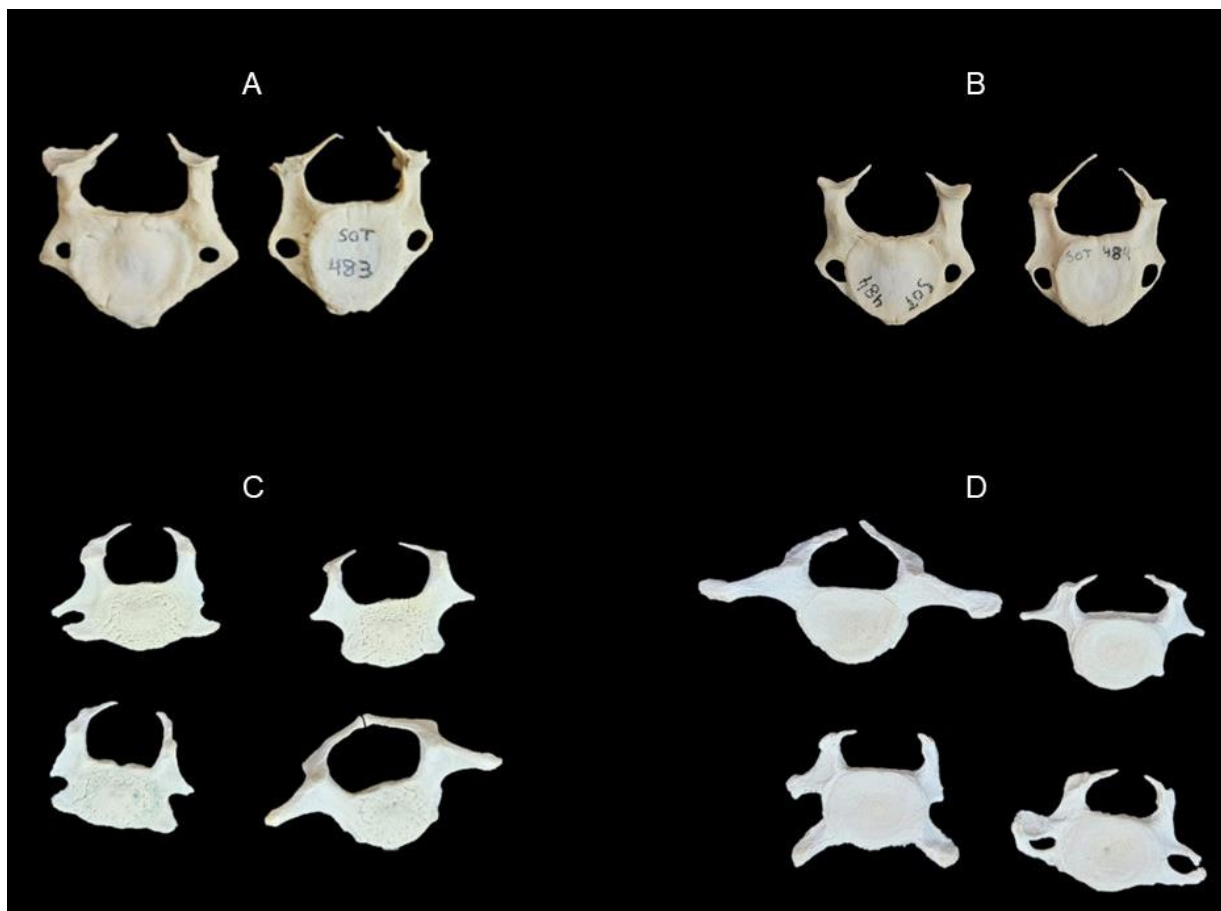
Diversas alterações ósseas foram observadas durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest, sendo algumas consideradas alterações de senilidade, fraturas e outras congênitas, que podem ser decorrentes tanto de acidentes com embarcações e aparatos de pesca, quanto traumas decorrentes de comportamentos intraespecíficos ou interespecíficos. As alterações têm sido encontradas tanto em indivíduos jovens quanto adultos e ainda não foi possível identificar um padrão nessas alterações. Na Figura 18 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** é possível uma costela de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) com uma fratura já consolidada e o calo ósseo, remodelações em fraturas são comuns e encontradas principalmente em ossos considerados mais frágeis/longos ou que estão em regiões corporais mais comuns de acidentes, como as costelas. As alterações não puderam ser relacionadas até o momento com os achados histopatológicos e as condições de saúde dos espécimes.

Figura 19: Remodelamento ósseo com presença de fio de nylon (rede de pesca) no terço médio de hemimandíbula direita, em *Sotalia guianensis* (EAE_S208), Ano 5 do PMBA/Fest



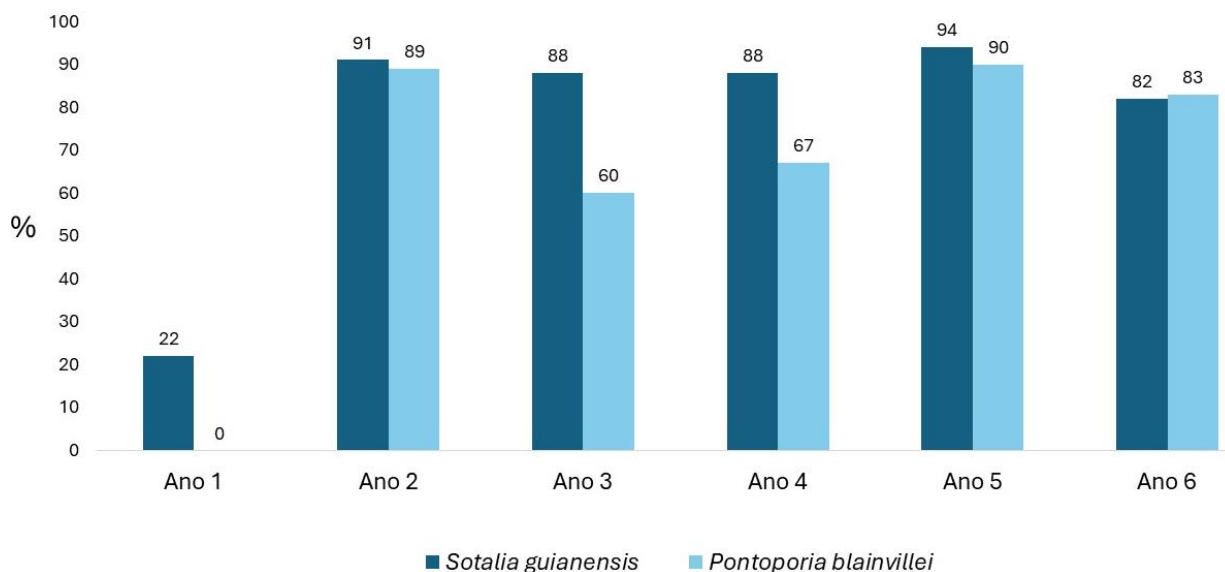
Na Figura 19 é possível observar um remodelamento ósseo na mandíbula de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) com a presença de um fio de nylon, indicando emalhe em aparato de pesca. O fio permaneceu preso a mandíbula durante o processo de remodelação óssea. Este tipo de acidente, em muitos casos, pode levar o animal a óbito, seja por causar danos físicos e/ou fisiológicos irreversíveis, quanto por lesionar o animal de forma permanente e dificultar seu forrageamento e alimentação.

Figura 20: Abertura do arco neural em vértebra cervical. A: *Sotalia guianensis* (EAE_S194); B: *Sotalia guianensis* (EAE_S203); C: *Pontoporia blainvillei* (EAE_N192); D: *Pontoporia blainvillei* (EAE_N175). Ano 5 PMBA/Fest



Na Figura 20 pode-se observar vértebras cervicais com arco neural aberto em diferentes espécimes, A e B: *Sotalia guianensis*, C e D *Pontoporia blainvillei*. Considerada uma anomalia congênita, a abertura do arco neural em pequenos cetáceos pode variar sua taxa por população. Algumas populações de pequenos cetáceos de regiões distintas, foram mencionadas por Fettucia et al. (2013) e Laeta et al. (2010) por apresentarem uma alta taxa de indivíduos com arco neural aberto em vértebras. Nas amostras dos cetáceos do PMBA/Fest, a frequência de espécimes de *S. guianensis* com abertura do arco neural foi alta, sendo maior se comparado a população centro-norte do Rio de Janeiro que apresentou 45% de indivíduos com arco neural aberto (Laeta et al., 2010). Outro estudo, realizado com a espécie *Sotalia fluviatilis*, de diversas localidades da Bacia Amazônica, apresentou uma taxa de 90% de espécimes com arco neural aberto (Fettucia et al., 2013).

Figura 21: Frequência de ocorrência (%) de abertura do arco neural em vértebra cervical de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* encalhados no ES, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 (amostras até janeiro de 2024) do PMBA/Fest



Na Figura 21 é possível observar a frequência de ocorrência em espécimes com uma ou mais vértebras apresentando arco neural aberto das espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 do PMBA/Fest. A frequência no Ano 1 foi mais baixa em comparação aos anos seguintes. Para *S. guianensis* a frequência nos anos 2 (91%), Ano 3 (88%), Ano 4 (88%), Ano 5 (94%) e Ano 6 (82%) não tiveram grande variação e permaneceram altas. Para *P. blainvillei*, uma variação maior ocorreu durante os anos do estudo do PMBA/Fest, sendo zero no ano 1, alta para o Ano 2 (89%), tendo baixado as frequências no Ano 3 (60%) e Ano 4 (67%) e aumentado no Ano 5 (90%) e Ano 6 (83%). Comparativamente a outra população de *S. guianensis*, a frequência alta chama atenção e precisa ser mais investigada, pois pode se tratar de uma característica das populações avaliadas ou uma resposta as condições bióticas/abióticas do habitat, incluindo patógenos ou doenças que possam acometer estes indivíduos.

Quadro 12: Lista de bactérias e fungos encontrados por Ano nas amostras de swab avaliadas dos cetáceos encalhados no ES. Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 PMBA/Fest. No ano 6 não foram incluídas amostras de microbiologia pois não houveram indicações para esse procedimento durante a necrópsia

Ano de amostragem	Gêneros de bactérias e fungos encontrados nos cetáceos do PMBA/Fest
Ano 1	<i>Actinomyces</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Candida</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>
Ano 2	<i>Candida</i> <i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i>

Ano de amostragem	Gêneros de bactérias e fungos encontrados nos cetáceos do PMBA/Fest
	<i>Hafnia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Kluyvera</i> <i>Koserella</i> <i>Pantoea</i> <i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Ano 3	<i>Candida</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i>
Ano 4	<i>Candida</i> <i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Koserella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Ano 5	<i>Aeromonas</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Candida</i>

Até o Ano 4 foram avaliadas todas as espécies encalhadas, a partir do Ano 5 somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. No Ano 6 (até janeiro de 2024) não foram coletadas amostras de microbiologia pois a coleta dessas amostras depende de outros achados macroscópicos e de suspeitas de doenças durante a etapa de necropsia. É possível observar uma variação na composição bacteriológica e fúngica entre os anos do PMBA/Fest. Algumas espécies/gêneros aparecem em diversos anos de estudo e outras possuem baixa frequência. A análise bacteriana dos espécimes de cetáceos é complexa, pois a falta de informações adicionais do histórico do animal dificulta definir se a bactéria se trata de um patógeno oportunista, primário, comensal ou oriundo da poluição ambiental. Ainda assim, o panorama dos microrganismos, dependendo da frequência de ocorrência, pode trazer informações significativas sobre a composição bacteriológica e fúngica de algumas regiões e da qualidade do ambiente, pois alguns patógenos atuam como indicadores de mudanças ambientais, influenciando na saúde e composição da comunidade do ecossistema. Até o presente momento foram avaliados 48 espécimes, com 205 amostras de *swab*, mas apenas 152 amostras apresentaram o crescimento dos microrganismos para identificação. O aumento no número amostral contribuirá para

uma avaliação mais efetiva desses microrganismos e seu papel no ambiente e na saúde dos espécimes.

Quadro 13: Lista de bactérias e fungos encontrados por órgão nas amostras de swab avaliadas dos cetáceos encalhados no ES, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 do PMBA/Fest. No ano 6 não foram incluídas amostras de microbiologia pois não houveram indicações para esse procedimento durante a necrópsia

Pulmão	Orifício respiratório	Olho	Ânus
<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
<i>Candida</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Koserella trabulsii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Kluyvera</i> spp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp.
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		
<i>Kluyvera</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp.		
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia</i> spp.		
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Streptococcus</i> spp.		
<i>Providencia</i> spp.			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Pseudomonas</i> spp.			
<i>Pseudomonas stutzeri</i>			
<i>Rhodotorula</i> spp.			
<i>Serratia marcescens</i>			
<i>Serratia</i> spp.			
<i>Staphylococcus</i> spp.			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			
<i>Streptococcus</i> spp.			
Vulva/Vagina	Cavidade oral	Mandíbula	Prepúcio
<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Kluyvera</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.		
Pedúnculo caudal	Pele	Traquéia	Cavidade torácica
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Candida</i> spp.

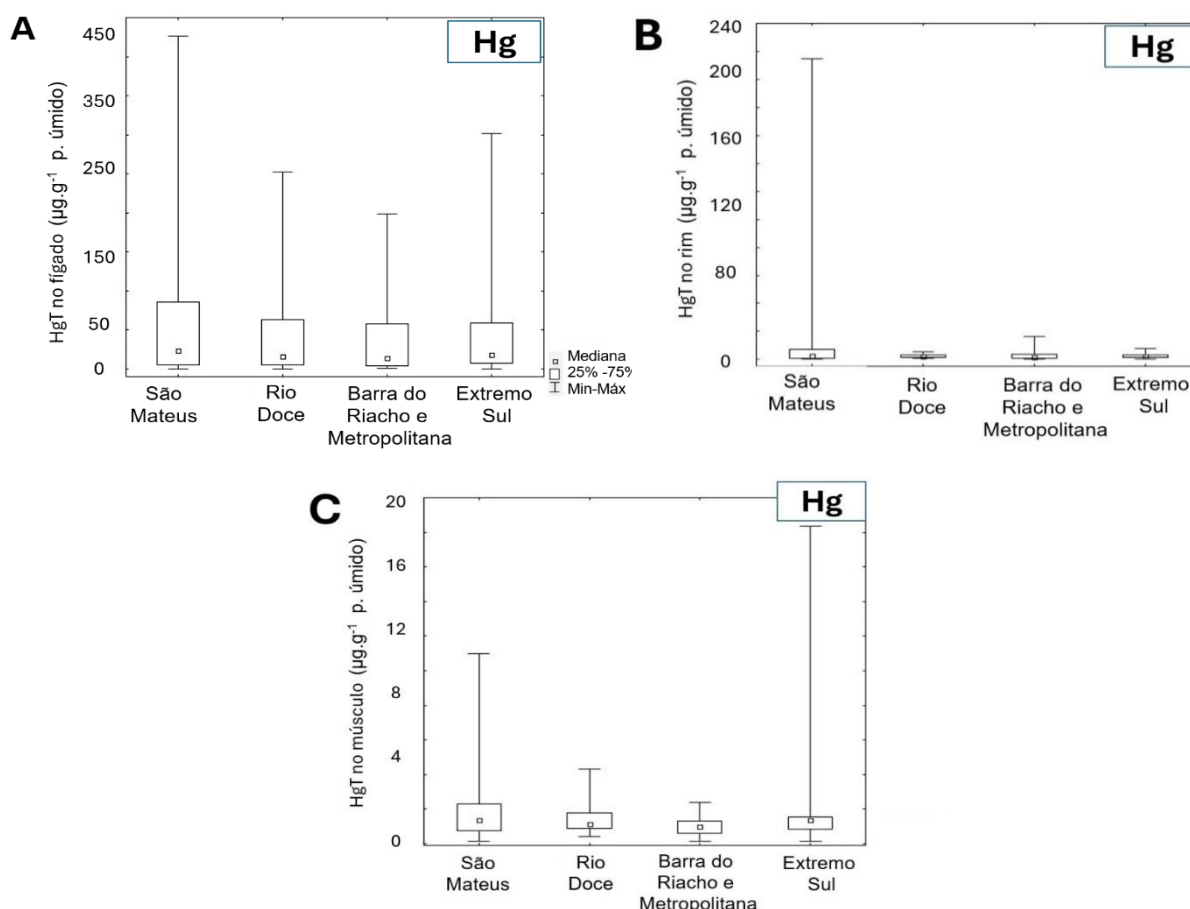
Pulmão	Orifício respiratório	Olho	Ânus
<i>Serratia</i> spp.	<i>Proteus vulgaris</i>		
Urina	Útero	Cavidade abdominal	Outros
<i>Koserella trabulsii</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Abcesso no mesentério: <i>Alcaligenes</i> spp.
			Lesão próximo ao ouvido direito: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			Lesão peitoral: <i>Pseudomonas</i> spp.
			Lesão de pele no pedúnculo caudal: <i>Klebsiella</i> spp.

Até o Ano 4 foram avaliadas todas as espécies encalhadas, a partir do Ano 5 somente as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. É possível observar a composição bacteriológica e fúngica de acordo com órgãos/regiões onde foram encontradas. O pulmão é o órgão com o maior número de espécies detectadas e apontando que o sistema respiratório é um dos principais afetados pelos cetáceos, não só pelos achados bacteriológicos, mas por toda a avaliação da saúde dos espécimes. Da mesma forma que o pulmão, organismos encontrados dentro de órgãos considerados vitais podem ter um grande impacto na saúde dos animais, a depender de sua patogenicidade. Bactérias e fungos encontrados em regiões externas/orifícios naturais, como ânus, vulva, orifício respiratório, pele, olho e lesões são regiões de fácil contaminação e as bactérias isoladas destas partes corporais podem ser consideradas, com certa prudência, ambientais e até oportunistas, a depender de outras avaliações da saúde do espécime. Algumas espécies já são conhecidamente parte da microbiota intestinal, como a *Escherichia coli*, mas em alguns casos podem ser consideradas patogênicas. Alguns gêneros sabidamente patogênicos já foram isolados em cetáceos e descritos nos espécimes analisados no PMBA/Fest, como *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp., e requerem monitoramento. Causas ambientais e antropogênicas têm potencial de influenciar na composição dos microrganismos dos cetáceos e podem ser indicadores de desequilíbrios ecológicos, sendo importante a verificação da composição e da frequência de ocorrência, com análises mais minuciosas.

3.5 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI*

3.5.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

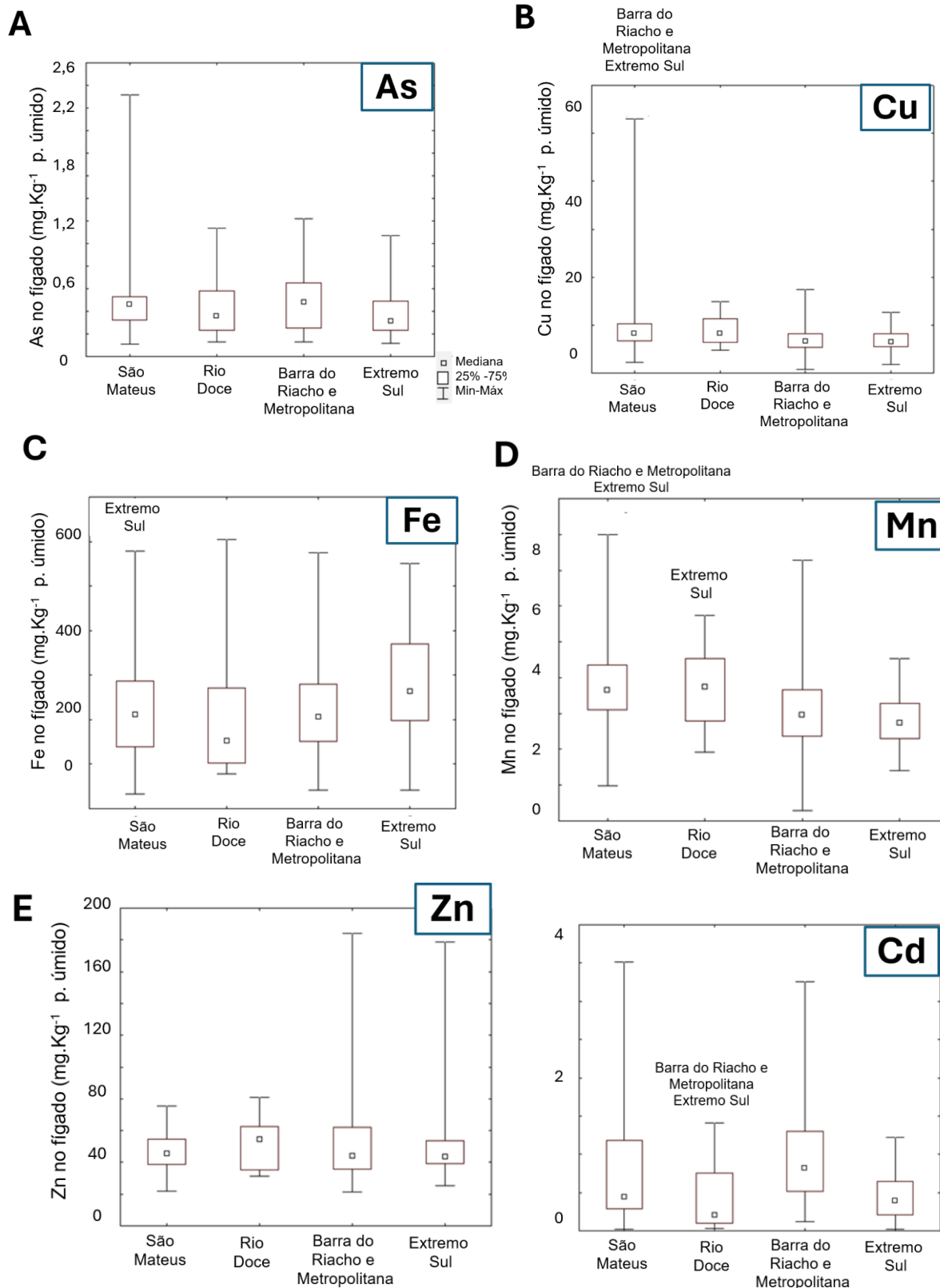
Figura 22: Concentrações de HgT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) no fígado (A), rim (B) e músculo (C) de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados nas diferentes regiões da costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) , incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



As concentrações de HgT em fígado de botos-cinza são elevadas, sendo que as concentrações máximas encontradas em botos-cinza de todas as regiões da costa do ES estão acima do limite de tolerância estabelecido na literatura que pode causar efeitos adversos nos mamíferos marinhos (100 a $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, p. u.) (Wagemman e Muir, 1984). Além disso, também estão acima do limite relacionado a danos hepáticos em outras espécies de cetáceos ($61 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, p. u.), como o golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (Rawson et al., 1993). Para indivíduos da Região 1 (São Mateus), destaca-se também a média acima deste valor ($64,11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, p. u.). Em relação à variação espacial não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em fígado (A) e rim (B) de botos-cinza das regiões analisadas. Porém, foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no músculo em botos-cinza (C) das regiões analisadas, sendo as concentrações mais elevadas na Região

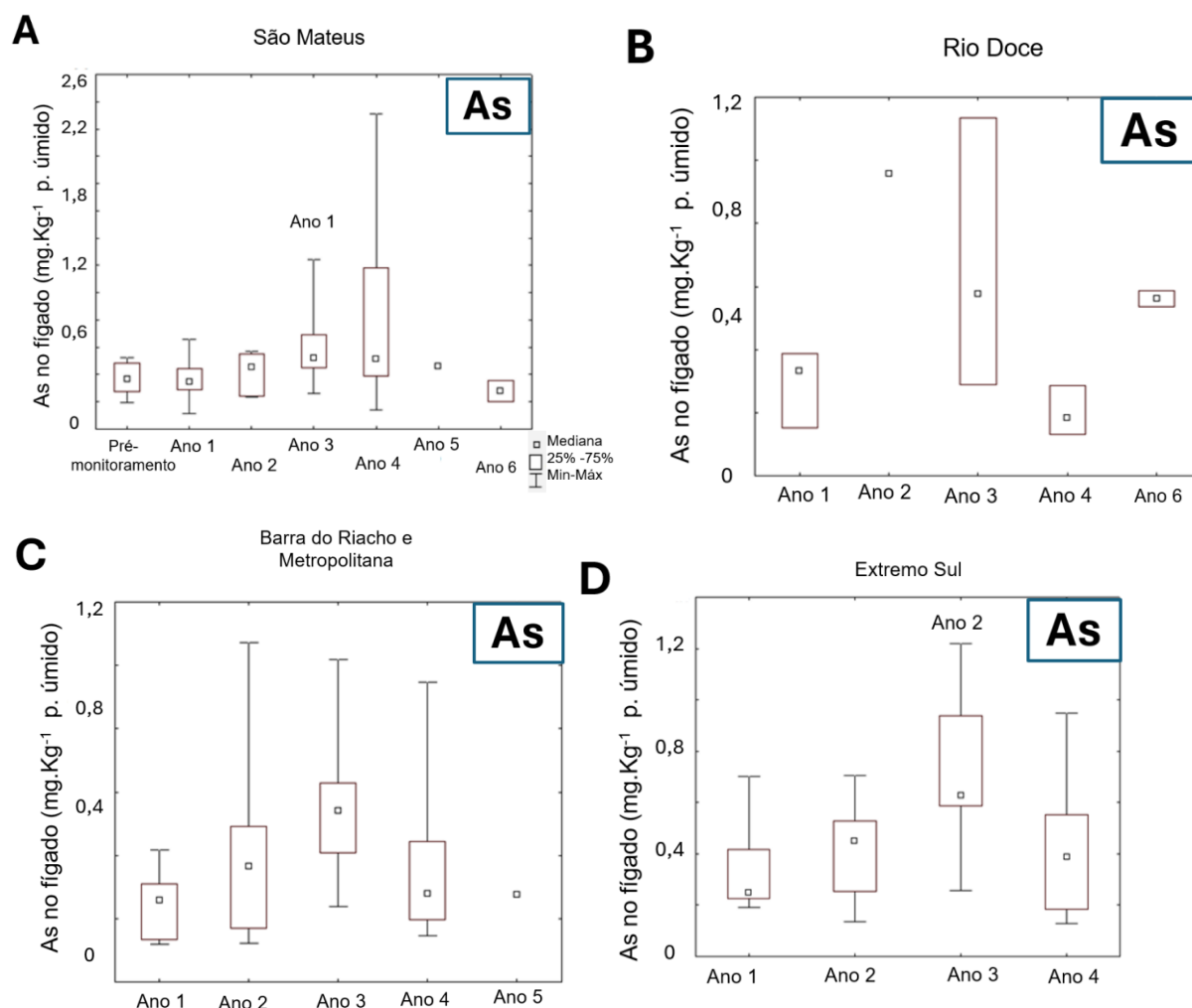
1 (São Mateus) que a Região 3/4 (Barra do Riacho/Metropolitana), provavelmente devido ao impacto do rompimento da barragem de Fundão, já que esta região foi mais afetada. Em relação à variação temporal, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no fígado, rim e músculo de botos-cinza ao longo dos anos de monitoramento, porém destacam-se as concentrações mais elevadas nos primeiros anos do monitoramento do PMBA/Fest, especialmente nos Anos 1 a 4 para os três tecidos/órgãos analisados. As concentrações mais elevadas foram encontradas no fígado, seguido do rim e do músculo nos botos-cinza analisados. Comparando com dados anteriormente publicados na literatura, as concentrações hepáticas médias dos indivíduos de botos-cinza analisados (n=192) durante os anos monitoramento do PMBA/Fest encontram-se na mesma ordem de grandeza que as médias mais elevadas do Brasil, como em botos-cinza da costa do Rio de Janeiro (Seixas et al., 2009; Lailson-Brito et al., 2012). Esses dados corroboram os resultados obtidos no último relatório (RSE2023). Tais concentrações são preocupantes especialmente devido a toxicidade do Hg (neurotoxicidade, imunotoxicidade, hepatotoxicidade), trazendo consequências à saúde dos indivíduos (Kershall and Hall, 2019)

Figura 23: Concentrações de As (A), , Cu (B), Fe (C), Mn (D) e Zn (E) (mg.Kg^{-1} de peso úmido) no fígado e de Cd no rim (F) de *Sotalia guianensis* das diferentes regiões da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados ao longo de todo o PMBA/Fest (Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) . Os nomes das regiões acima das barras indicam as regiões com as quais foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$)



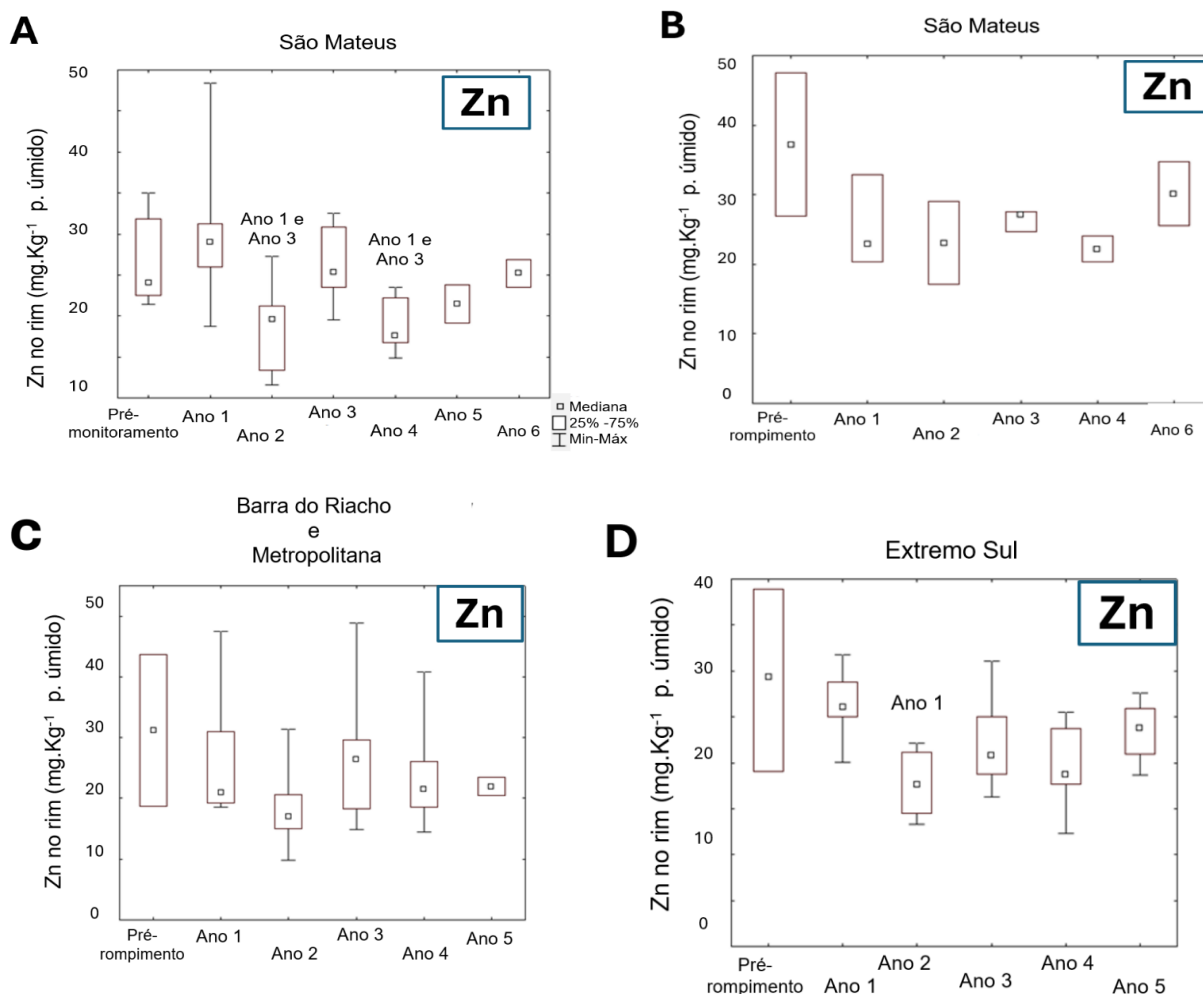
Os indivíduos da Região 1 (São Mateus) apresentaram concentrações hepáticas de Cu e Mn significativamente maiores que os da Região 3/4 (Barra do Riacho/Metropolitana) e 5 (Extremo Sul) (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Além disso, os animais da Região 2 (Rio Doce) apresentaram concentrações significativamente menores de Cd que as regiões mais ao sul (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Já as concentrações hepáticas de Fe na Região 5 (Extremo Sul) foram sutilmente mais elevadas do que da Região 1 (São Mateus) (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). As concentrações medianas de Cd no rim estão maiores que as reportadas na literatura para a espécie, com destaque para a região Barra do Riacho/Metropolitana. A região de São Mateus apresentou concentrações renais significativamente maiores de Zn do que no Extremo Sul (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Figura 24: Concentrações de As (mg.Kg^{-1} de peso úmido) no fígado de *Sotalia guianensis* das diferentes regiões da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas depois do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG), mas anteriores ao monitoramento do PMBA/Fest (pré monitoramento). Os nomes das regiões acima das barras indicam as regiões com as quais foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Os dados representados na figura referem-se a resultados que apresentam diferença significativa



As concentrações hepáticas de As apresentaram uma tendência geral de aumento no Ano 3, que abrange outubro de 2019 a setembro de 2020. Essa tendência é observável em todos os gráficos, porém só foi significativa nas Regiões 1 (São Mateus) e 5 (Extremo Sul) (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Considerando que o verão de 2020 foi o mais chuvoso do período amostrado (INMET, 2024), os resultados reforçam a importância da pluviosidade sobre a remobilização do As e demais contaminantes presentes no sedimento das bacias dos rios que desaguam na costa do ES (Queriroz et al., 2018; Longhini et al., 2022). Essa tendência é alarmante, uma vez que os estados do sudeste brasileiro vêm enfrentando sucessivos aumentos na temperatura e pluviosidade devido às mudanças climáticas. As elevadas concentrações de As reportadas no presente relatório e as preocupantes tendências temporais reforçam os impactos crônicos do rompimento da barragem do fundão, Mariana (MG) aos cetáceos residentes dessa região.

Figura 25: Concentrações de Zn (mg.Kg^{-1} de peso úmido) em rim de *Sotalia guianensis* coletados na costa do ES (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento (Pré-rompimento) da barragem de Fundão, Mariana (MG), e depois do rompimento, mas anteriores ao monitoramento do PMBA/Fest (Pré-PMBA)



As concentrações renais de Zn também parecem ser impactadas pela pluviosidade e, consequentemente, pela vazão dos rios e capacidade de remobilização dos sedimentos. É notável em todas as regiões que os anos com verões mais chuvosos (2018 e 2020) (INMET, 2024) também apresentaram as maiores concentrações renais de Zn, porém essa tendência só é estatisticamente significativa nas regiões 1 (São Mateus) e 5 (Extremo Sul). Mesmo considerando o Zn como um elemento essencial, sabe-se que em altas concentrações esses elementos podem ser tóxicos (Bowles, 1999). Portanto, as concentrações observadas podem evidenciar os impactos que verões chuvosos parecem possuir sobre a remobilização de elementos-traço no sedimento e da cronicidade dos impactos do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG), sobre os ecossistemas costeiros do estado do Espírito Santo.

Quadro 14: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn no fígado, músculo e rim de *Sotalia guianensis* na costa do Espírito (Regiões: 1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana; 5= Extremo Sul) analisados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), expressos em mg.Kg⁻¹ de peso úmido, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)

Região	Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
São Mateus	Fígado	70	Média ± DP	0,36±0,42	15,0±25,1	222±125	3,8±1,2	49±22	0,52±0,35
			Mediana	0,16	8,8	212	3,7	46	0,46
			Mín. Máx.	<0,01-1,85	2,2-186	33-578	0,98-8,0	15-175	0,11-2,31
	Músculo	70	Média ± DP	0,06±0,08	0,9±0,6	93±40	0,2±0,1	20±5	0,24±0,10
			Mediana	0,02	0,8	89	0,15	19	0,22
			Mín. Máx.	<0,01-0,16	0,3-4,4	25-266	0,02-0,68	11-36	<0,11-0,67
	Rim	56	Média	0,79±0,80	3,8±1,4	126±107	0,7±0,5	25±7	0,35±0,22
			Mediana	0,44	3,7	100	0,7	24	0,29
			Mín. Máx.	<0,01-3,51	1,7-8,2	29-668	0,1-3,35	12-48	0,11-1,04
Rio Doce	Fígado	14	Média ± DP	0,21±0,23	8,8±3,2	206±145	3,8±1,2	53±17	0,46±0,32
			Mediana	0,17	8,3	153	3,7	54	0,36
			Mín. Máx.	<0,01-0,73	4,8-14,9	78-604	1,9-5,7	31-81	0,13-1,13
	Músculo	19	Média ± DP	-	1,1±0,5	93±35	0,16±0,08	20±4	0,42±0,36
			Mediana	-	0,8	92	0,13	20	0,31
			Mín. Máx.	<0,01-0,006	0,4-2,2	26-173	<0,02-0,33	15-29	0,14-1,38
	Rim	14	Média	0,44±0,45	5,9±4,0	126±41	1,1±1,9	27±8	0,34±0,16
			Mediana	0,21	3,6	112	0,6	26	0,32
			Mín. Máx.	0,03-1,41	2,5-17,2	76-205	0,2-6,7	17-47	0,14-0,62

Região	Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
Barra do Riacho e Metropolitana	Fígado	58	Média ± DP	0,32±0,28	13,0±30,4	228±113	3,4±1,6	59±43	0,49±0,27
			Mediana	0,27	6,8	206	3,0	46	0,48
			Mín. Máx.	<0,01-1,55	0,8-231	42-575	0,3-7,3	22-288	0,13-1,22
	Músculo	65	Média ± DP	0,01±0,007	1,0±0,9	93±41	0,26±0,44	19±6	0,28±0,18
			Mediana	0,006	0,88	79	0,15	19	0,25
			Mín. Máx.	<0,01-0,02	0,24-7,7	25-206	0,02-2,70	5,5-45	0,03-1,16
	Rim	58	Média ± DP	0,97±0,69	3,9±1,6	129±58	0,7±0,5	24±9	0,34±0,28
			Mediana	0,82	3,4	122	0,6	21	0,29
			Mín. Máx.	0,12-3,26	2,5-12,4	27-317	0,2-2,7	9,9-49	0,05-1,32
Extremo Sul	Fígado	41	Média ± DP	0,24±0,16	16,0±42,3	285±119	2,8±0,7	48±23	0,40±0,25
			Mediana	0,19	6,7	264	2,7	43	0,31
			Mín. Máx.	<0,01-0,71	1,9-247	42-551	1,4-4,5	25-179	0,12-1,07
	Músculo	51	Média ± DP	0,008±0,009	0,9±0,4	96±44	0,17±0,17	20±5	0,31±0,24
			Mediana	0,005	0,90	85	0,12	20	0,22
			Mín. Máx.	<0,01-0,03	0,14±2,3	40-257	<0,02-0,69	11-37	0,10-1,07
	Rim	40	Média	0,47±0,27	3,8±1,9	145±78	0,8±1,5	22±5	0,36±0,32
			Mediana	0,39	3,2	125	0,5	21	0,23
			Mín. Máx.	0,02-1,22	1,9-11,1	42-469	0,3-9,8	12-39	0,09-1,51

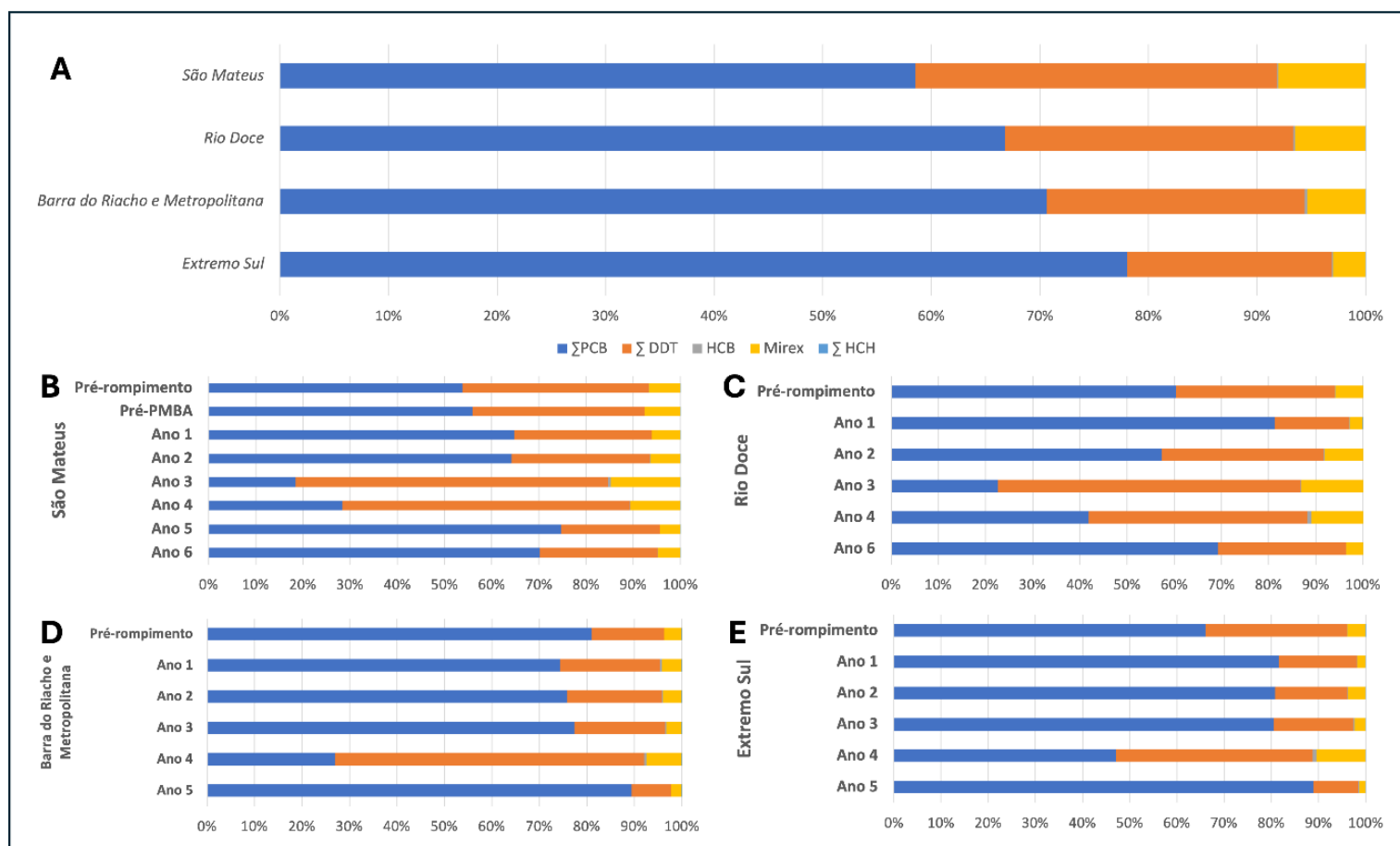
Todas as regiões apresentam concentrações medianas de As maiores que as reportadas na literatura para a espécie. As medianas das concentrações dos demais elementos-traço estão na mesma ordem de magnitude daquelas reportadas em estudos prévios (Kunito et al., 2004; Seixas et al., 2009). Entretanto, a literatura abrange diferentes estados da costa brasileira, inclusive áreas mais urbanizadas e industrializadas que a costa do ES (Seixas et al., 2009; Kunito et al., 2004). As concentrações medianas de Cd no rim de *S. guianensis* em toda área de estudo estão maiores do que aquelas reportadas na literatura (Monteiro-Neto et al., 2003), com destaque para a Região 3/4 (Barra do Riacho/Metropolitana) (0,82 mg.Kg⁻¹).

Quadro 15: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH, expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico, em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)

		Σ PCB	Σ DDT	HCB	Mirex	Σ HCH
<i>Sotalia guianensis</i>						
São Mateus N= 62	Mediana	11,9	6,8	0,03	1,6	<0,002
	Média \pm Desvio Padrão	23,1 \pm 36,8	44,3 \pm 92,1	0,17 \pm 0,32	6,3 \pm 13,4	<0,002
	Mínimo - Máximo	0,28 - 220,2	0,08 - 414,3	<0,002 - 1,6	0,11 - 82,6	-
Rio Doce N= 20	Mediana	19,5	7,8	0,04	1,9	0,001
	Média \pm Desvio Padrão	22,0 \pm 16,6	37,1 \pm 72,9	0,15 \pm 0,27	6,9 \pm 13,5	0,1 \pm 0,02
	Mínimo - Máximo	1,7 - 74,4	2,1 - 265,1	<0,002 - 0,9	<0,001 - 56,2	<0,002 - 0,08
Barra do Riacho e Metropolitana N= 61	Mediana	20,6	6,9	0,07	1,6	0,001
	Média \pm Desvio Padrão	46,2 \pm 55,4	47,7 \pm 123,3	0,3 \pm 0,5	6,2 \pm 13,4	0,003 \pm 0,02
	Mínimo - Máximo	0,07 - 241,1	0,2 - 651,0	<0,001 - 1,9	<0,001 - 75,1	<0,002 - 0,12
Extremo Sul N= 50	Mediana	26,1	6,3	0,05	1,0	-
	Média \pm Desvio Padrão	37,1 \pm 45,6	37,6 \pm 98,3	0,17 \pm 0,36	7,9 \pm 21,1	-
	Mínimo - Máximo	1,2 - 261,3	0,2 - 530,8	<0,002 - 1,7	0,14 - 97,1	-

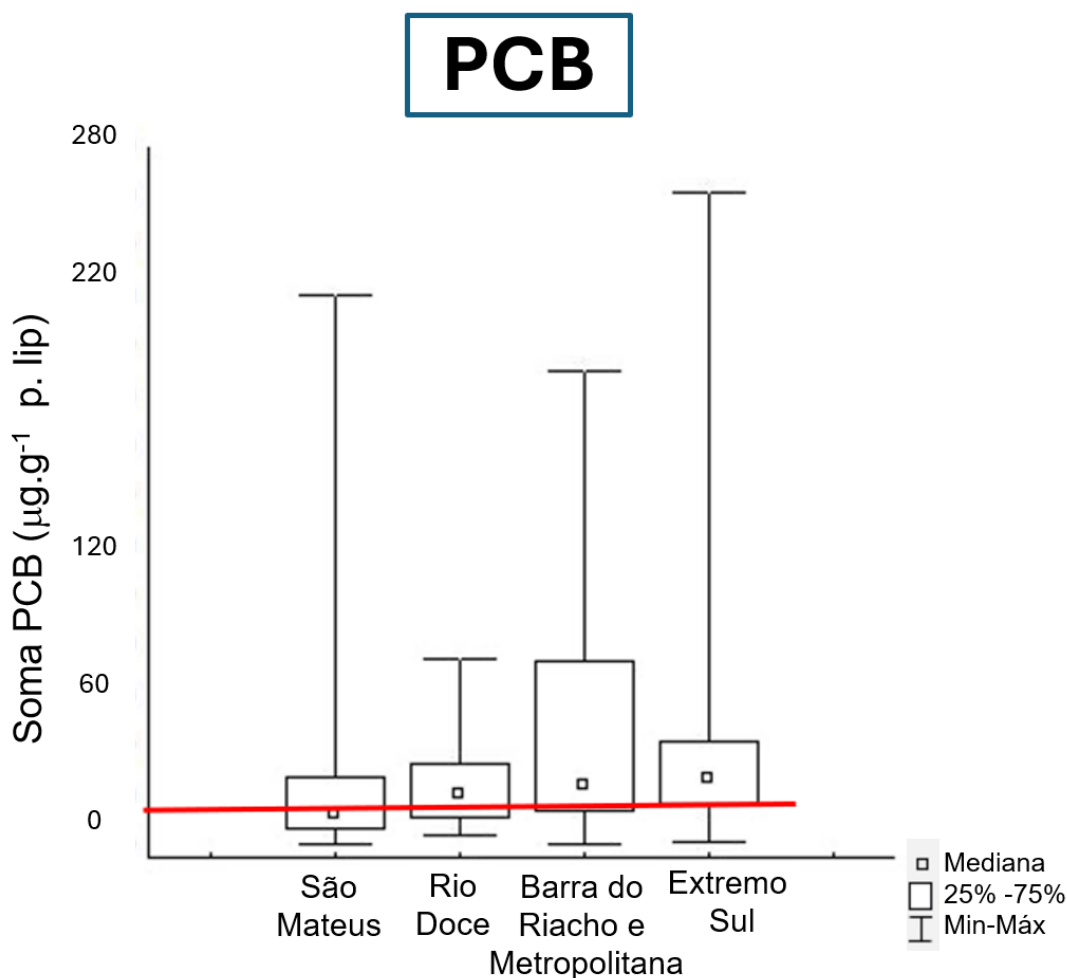
Foram encontradas altas concentrações de bifenilas policloradas (Σ PCB) em botos-cinza de todas as regiões monitoradas, que excedem os valores de $17 \mu\text{g.g}^{-1}$ lip, sugeridos para desencadear efeitos deletérios em mamíferos marinhos (Kannan et al., 2000). As medianas das concentrações de PCBs no tecido adiposo subcutâneo de botos-cinza (n=194) coletados no ES aumentaram gradativamente da Região 1- São Mateus (Norte) para a Região 5- Extremo Sul (Sul), refletindo as variações espaciais encontradas. E ainda, foi observada diferença significativa entre a Região 1 e as Regiões 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana) e 5 (Extremo Sul). No entanto, não são observadas tendências temporais do acúmulo de PCBs nas Regiões 1 e 3/4, refletindo o caráter recalcitrante desta classe de compostos. Em relação aos pesticidas organoclorados (DDT, HCB, HCH e Mirex), as concentrações foram similares entre as Regiões, mas apresentaram uma variação temporal nas Regiões 1 (São Mateus), 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana) e 5 (Extremo Sul). As concentrações de DDT e mirex foram maiores nos Anos 3, 4 e 5 em comparação ao período Pré-PMBA e Anos 1 e 2 do PMBA/Fest, enquanto as concentrações de HCB foram maiores no Ano 3 que o período Pré-PMBA e o no Ano 1 de monitoramento.

Figura 26: (A) Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo da costa do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG) naqueles anos em que se possuía n amostral suficiente para comparação; (B) Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Região 1 (1= São Mateus); (C) Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Região 2 (1= Rio Doce); (D) Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Região 3/4 (3/4= Barra do Riacho e Metropolitana); (E) Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da Região 5 (5= Extremo Sul).



O perfil de contaminação dos botos-cinza é dominado por PCBs, seguido de DDTs, mirex, HCB e HCHs. Interessantemente, o percentual de contribuição do DDT vai reduzindo gradativamente nos botos-cinza da Região 1 (São Mateus) até a Região 5 (Extremo Sul). Os botos-cinza da Região 1 (São Mateus) sofreram uma influência maior do rompimento da barragem de Fundão do que os botos-cinza da Região 5 (Extremo Sul), o que pode refletir nessa maior contribuição de pesticidas organoclorados que foram remobilizados na região mais próxima ao Rio Doce Figura 26. Além disso, foram observadas um aumento na contribuição de DDTs nos Anos 3 e 4 nas regiões 1 (São Mateus) e 2 (Rio Doce) (Figura 26 B e C), que foram as regiões mais afetadas pelo rompimento. As demais regiões também apresentaram este aumento no Ano 4 (Figura 26 D e E).

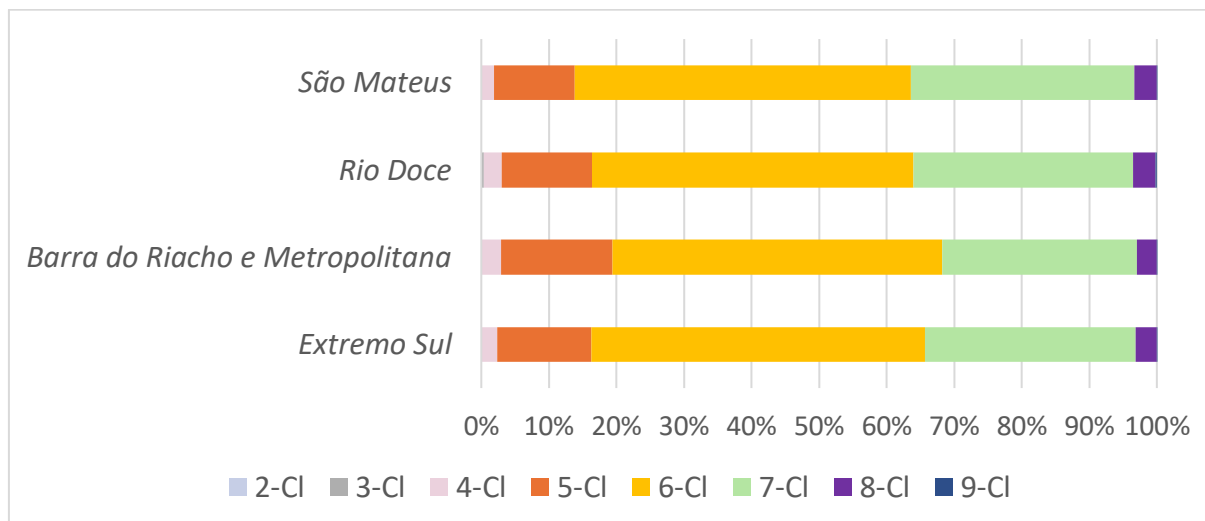
Figura 27: Concentração de Σ PCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG). A linha vermelha mostra a concentração de $17 \mu\text{g.g}^{-1}$, limite estabelecido para efeitos adversos na saúde de cetáceos (Kannan et al., 2000).



A concentração de Σ PCB em botos-cinza da Região 1 (São Mateus) é menor que nas Regiões 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana) e 5 (Extremo Sul), sendo as últimas consideradas regiões metropolitanas, de alta impacto urbano. Vale ressaltar que as concentrações medianas em botos-cinza das Regiões 2, 3/4 e 5 ultrapassam o limite de $17 \mu\text{g.g}^{-1}$ (marcado pela linha vermelha) estabelecido para efeitos adversos na saúde de cetáceos (Kannan et al., 2000). E, apesar de a mediana da Região 1 (São Mateus) encontrar-se abaixo deste limite, cerca de 33% dos indivíduos analisados nesta região apresentam concentrações superiores a esta ao longo dos anos. As concentrações de Σ PCB são similares às reportadas para populações que residem em áreas que sofrem com a alta pressão antrópica (Lailson-Brito et al., 2010). Tais concentrações observadas podem ter consequências para a manutenção das populações e devem ser monitoradas, especialmente considerando que declínios populacionais em cetáceos já foram relacionados a elevadas concentrações desses compostos (Hall et al., 2006; 2018 Desforges et al., 2018), incluindo um estudo na costa brasileira (Oliveira-Ferreira et

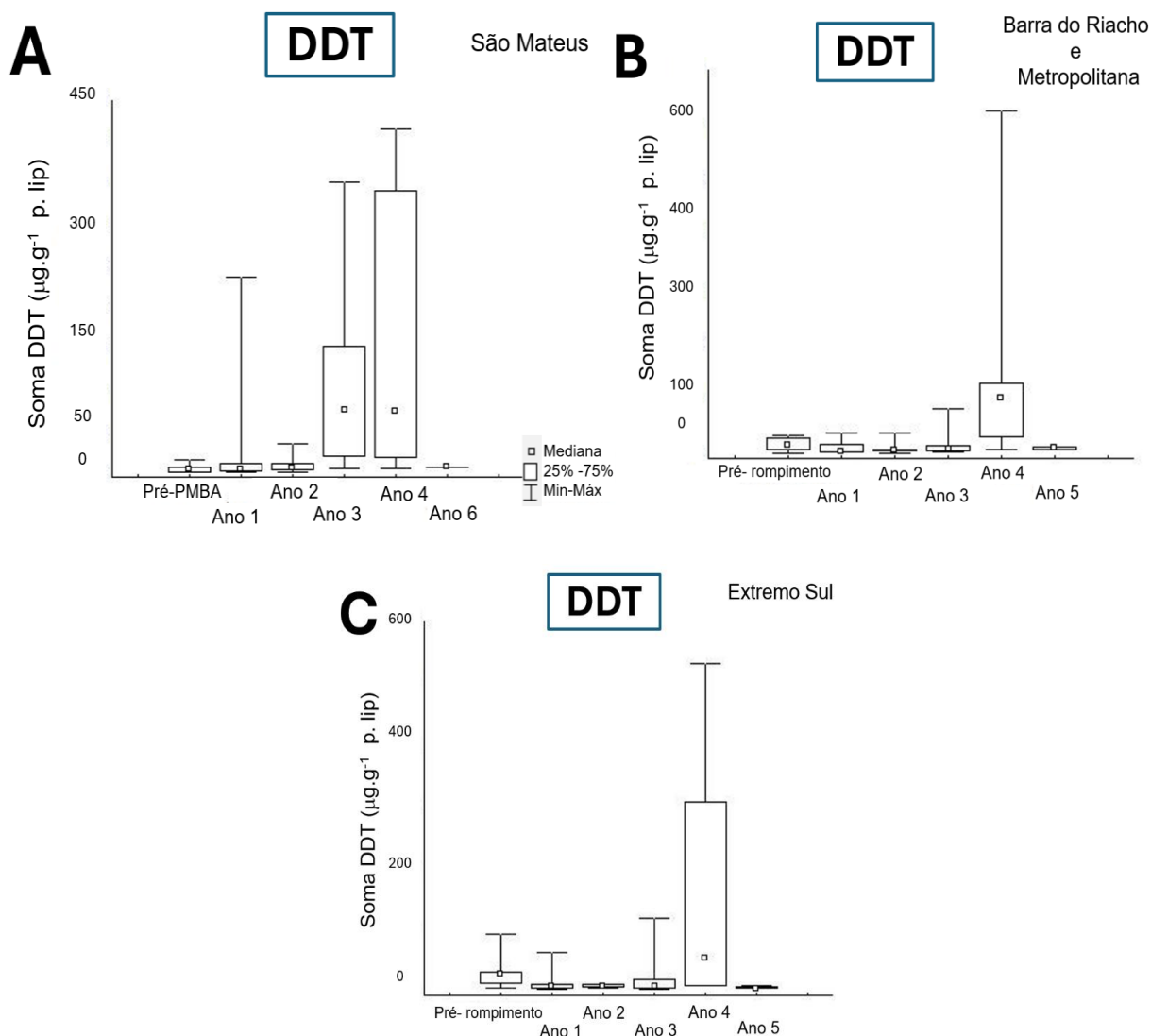
al., 2021). As concentrações de pesticidas organoclorados não foram significativamente diferentes entre botos-cinza das Regiões 1 (São Mateus) a 5 (Extremo Sul).

Figura 28: Perfil de contribuição de PCBs por grau de cloração em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo (ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



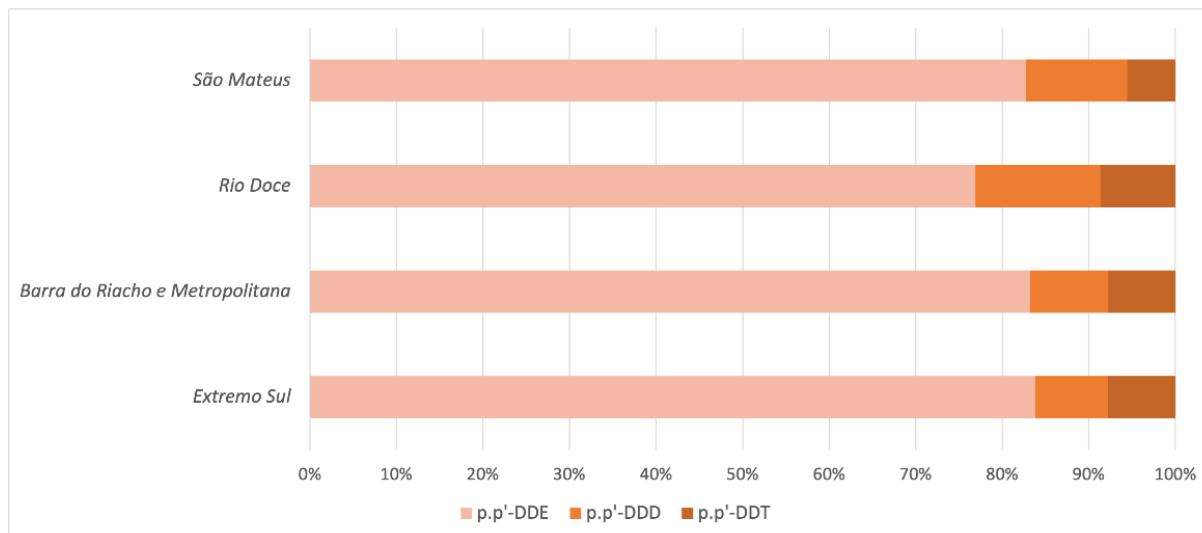
Os botos-cinza apresentaram um perfil de PCBs com predomínio de congêneres contendo 5, 6 e 7 átomos de cloro, refletindo a maior disponibilidade e baixa taxa de degradação destes. De modo geral, não são observadas diferenças no perfil de PCBs relacionados ao grau de cloração em botos-cinza ao longo da costa do ES, sendo este semelhante ao observado em outras espécies de cetáceos na costa do Brasil (Santos-Neto et al., 2014).

Figura 29: Concentração de Σ DDT em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1 (A), 3/4 (B) e 5 (C) (1= São Mateus; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG) e antes do monitoramento do PMBA (pré-PMBA), naqueles anos em que se possuía a amostral suficiente para comparação.



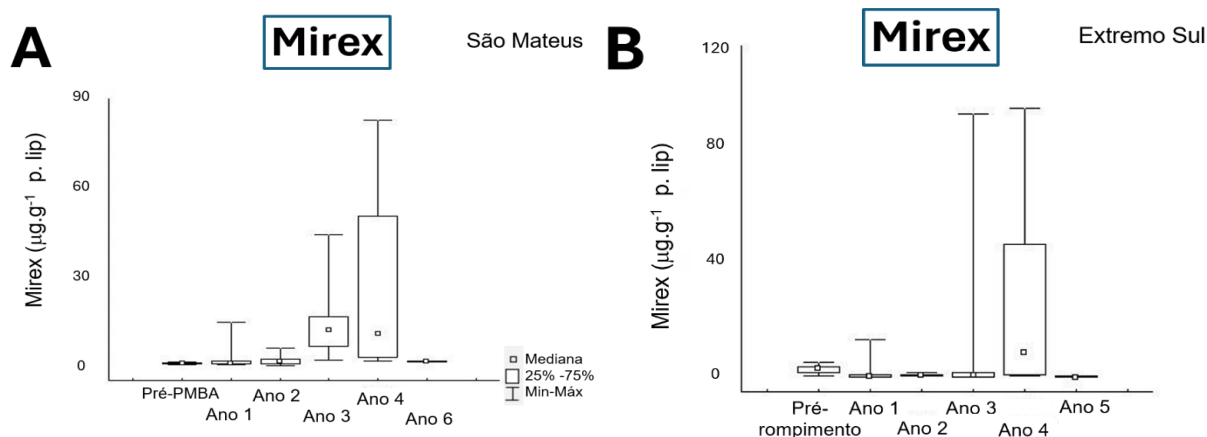
Analisando a variação temporal do DDT, foi detectado um aumento em sua concentração em botos-cinza ao longo do monitoramento nas Regiões 1 (São Mateus) e 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana). Na Região 1 (São Mateus), as concentrações de DDT foram maiores no Ano 3 que no período Pré-PMBA e no Ano 1 enquanto na Região 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana), as concentrações de DDT foram maiores no Ano 4 que nos Anos 1 e 2, o que pode ser em função de sua remobilização e redistribuição por fatores bióticos e abióticos. Em contrapartida, na Região 5 (Extremo Sul), as concentrações de DDT diminuíram do Ano 4 para o Ano 5.

Figura 30: Perfil de contribuição de *p.p'*-DDD, *p.p'*-DDE e *p.p'*-DDT em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



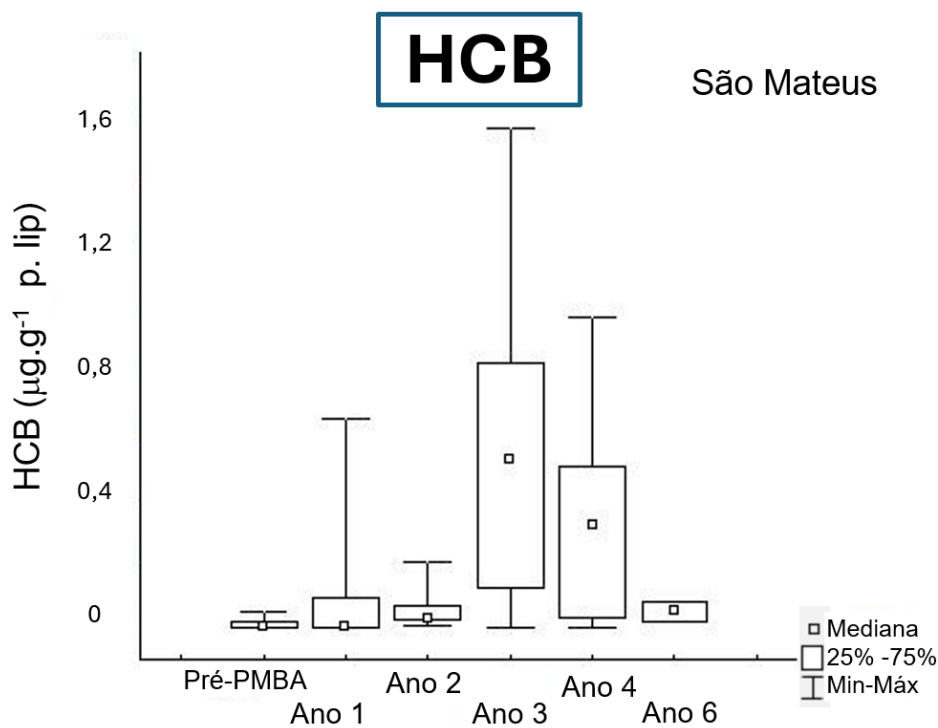
O predomínio do metabólito *p.p'*-DDE em botos-cinza sugere uma contaminação histórica por DDTs nas teias tróficas destes cetáceos ao invés de utilização recente deste pesticida, corroborando o que é observado em cetáceos costeiros do sudeste do Brasil (Lailson-Brito et al., 2010; Santos-Neto et al., 2014).

Figura 31: Concentração de Mirex em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (A) e 5 (B) (1= São Mateus; 5= Extremo Sul) coletados na costa do estado do Espírito Santo (ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG) e antes do monitoramento do PMBA (pré-PMBA), naqueles anos em que se possuía n amostral suficiente para comparação



As concentrações de mirex em botos-cinza sofreram um aumento gradativo na Região 1 (São Mateus) ao longo do monitoramento, sendo estatisticamente maiores nos Anos 3 e 4 do que no período pré-PMBA. Já na Região 5 (Extremo Sul). As concentrações de mirex também diminuiram do Ano 4 para o Ano 5, e, também em relação ao período Pré-rompimento da barragem de Fundão e Ano 5.

Figura 32: Concentração de HCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da regiões 1 (1=São Mateus) da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG) e antes do monitoramento do PMBA (pré-PMBA),



As concentrações de HCB em botos-cinza foram maiores no Ano 3 que no período Pré-PMBA e no Ano 1, sugerindo também uma remobilização deste pesticida ao longo do período de monitoramento do PMBA-Fest, assim como foi observado para os outros pesticidas organoclorados, conforme mencionado anteriormente.

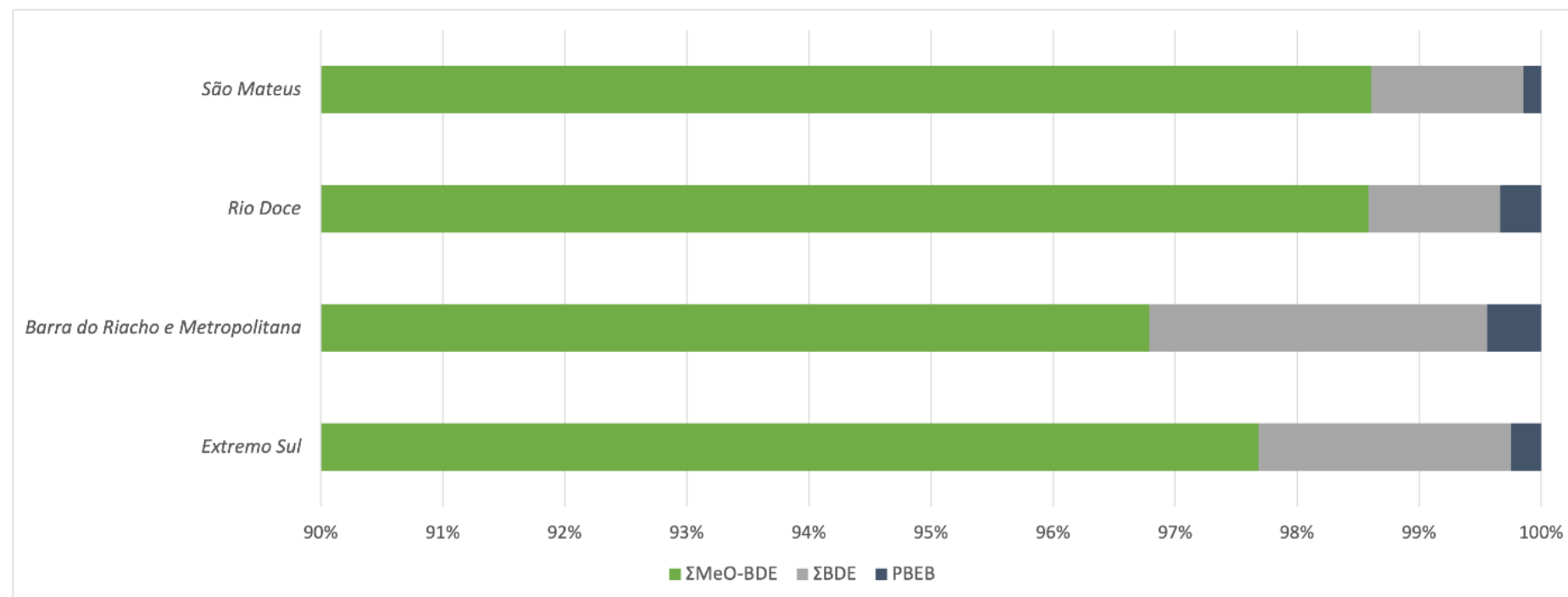
Quadro 16: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organobromados de origem natural, $\Sigma\text{MeO-BDE}$, e de origem antrópica, ΣPBDE , PBEB e HBBZ, expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6)

		$\Sigma\text{MeO-BDE}$	ΣPBDE	PBEB	HBBZ
<i>Sotalia guianensis</i>					
São Mateus (N= 63)	Mediana	5,46	0,07	0,01	-
	Média \pm Desvio Padrão	14,3 \pm 26,7	0,19 \pm 0,37	0,03 \pm 0,04	-
	Mínimo - Máximo	0,24 - 184	<0,0001 - 2,1	<0,0002 - 0,09	-
Rio Doce (N= 20)	Mediana	6,95	0,08	0,02	-
	Média \pm Desvio Padrão	10,2 \pm 14,0	0,24 \pm 0,43	0,02	-

		$\Sigma \text{MeO-BDE}$	ΣPBDE	PBEB	HBB Z
	Mínimo - Máximo	1,47 – 63,9	<0,0001 - 1,8	<0,0002 - 0,02	-
Barra do Riacho e Metropolitana (N= 60)	Mediana	6,99	0,20	0,03	-
	Média \pm Desvio Padrão	12,4 \pm 14,5	0,35 \pm 0,50	0,04 \pm 0,03	-
	Mínimo - Máximo	0,42 – 84,5	<0,0001 – 3,3	<0,0002 - 0,10	-
Extremo Sul (N= 50)	Mediana	6,59	0,14	0,02	-
	Média \pm Desvio Padrão	10,68 \pm 12,0	0,31 \pm 0,54	0,02 \pm 0,02	-
	Mínimo - Máximo	0,49 - 57,8	<0,0001 - 3,4	<0,0002 - 0,05	-

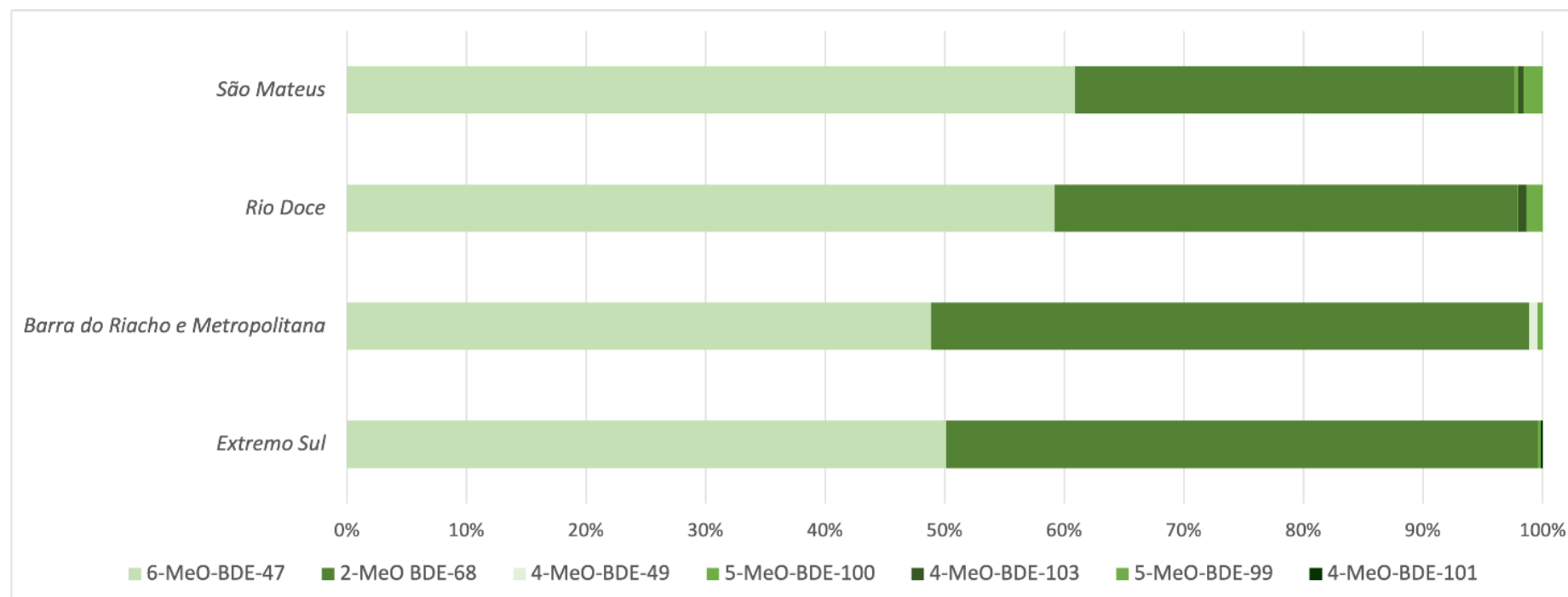
Destacam-se as elevadas concentrações de compostos metoxilados em todas as regiões, que podem refletir a influência do Banco de Abrolhos na costa do Espírito Santo.

Figura 33: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE, e de origem antrópica, Σ PBDE e PBEB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6)



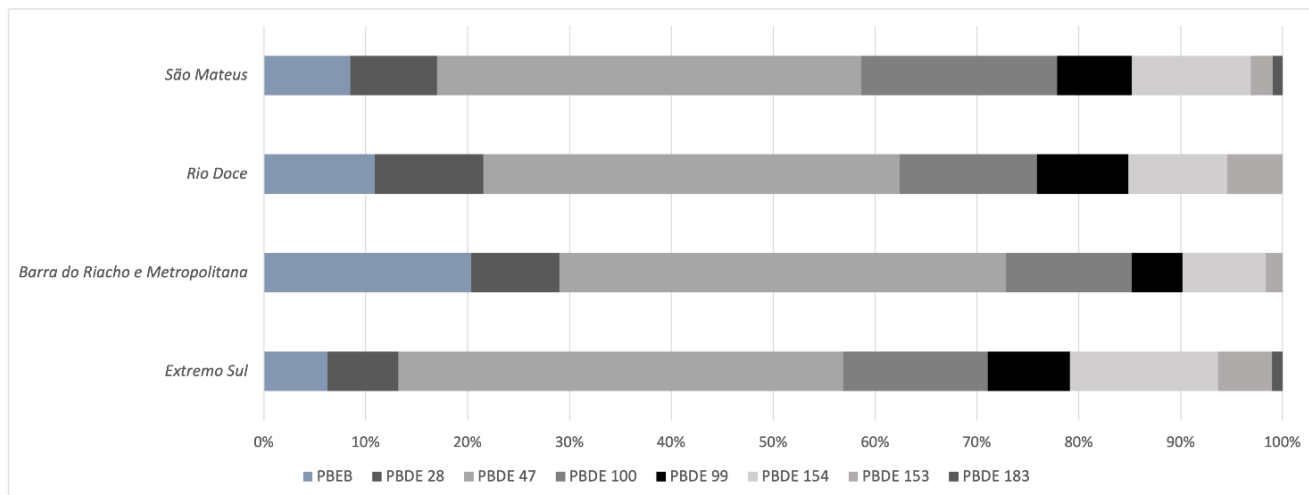
Os compostos metoxilados representaram mais de 90% do perfil para os cetáceos coletados, seguidos dos PBDEs e PBEB.

Figura 34: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).



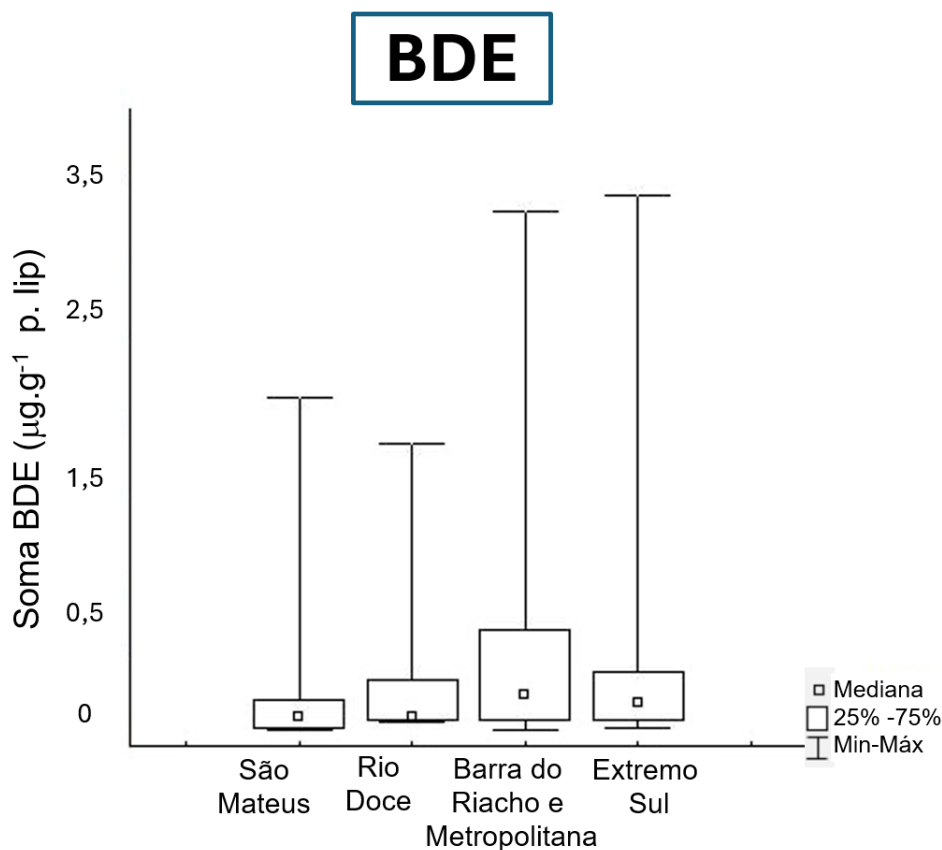
Observa-se um predomínio de 6-MeO-BDE-47 e 2-MeO-BDE-68 para botos-cinza de toda a costa do ES.

Figura 35: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem antrópica convencionais (por congêneres de PBDE) e emergente (PBEB) em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2= Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6)



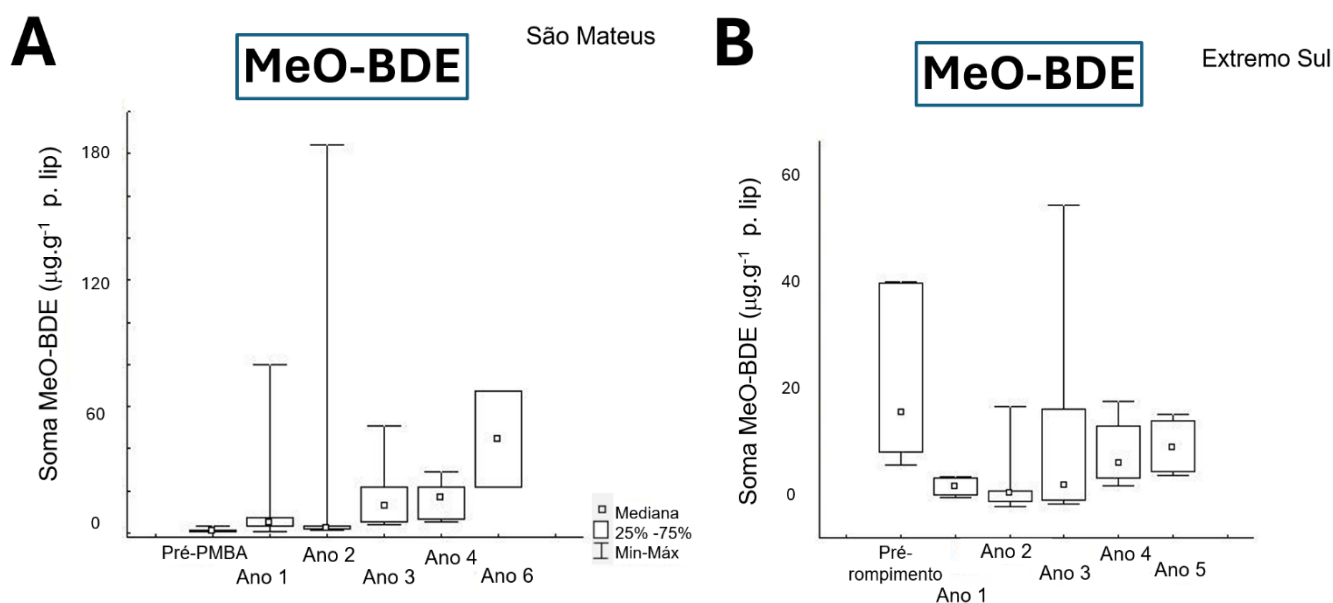
Observa-se um predomínio dos PBDEs em relação ao retardante de chama emergente (PBEB) para os botos-cinza de todas as regiões da costa do ES. Dentre os PBDEs, o PBDE-47 predominou no tecido adiposo subcutâneo de botos-cinza de toda a costa do ES (Vidal et al., 2023).

Figura 36: Concentração de Σ PBDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 (1= São Mateus; 2= Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) coletados na costa do estado do Espírito Santo) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6)



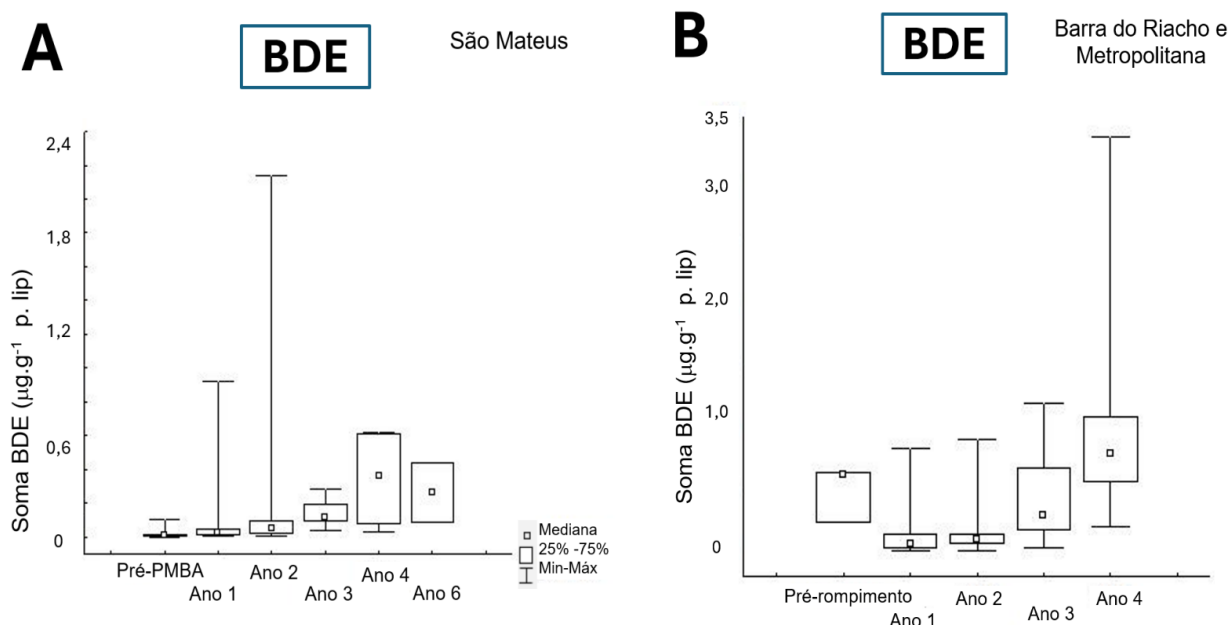
Na análise de tendências espaciais de compostos organobromados em botos-cinza, foram identificadas diferenças nas concentrações de PBDEs, sendo as concentrações mais altas nas Regiões 3/4 (Barra do Riacho e Metropolitana) e 5 (Extremo Sul) do que na Região 1 (São Mateus). Em contrapartida, as concentrações de MeO-BDEs não apresentaram diferenças espaciais.

Figura 37: Concentração de Σ MeO-BDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (1- São Mateus) e região 5 (Extremo Sul) coletados na costa do estado do Espírito Santo por ano ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) e incluindo o período pré-rompimento e antes do monitoramento do PMBA (pré-PMBA), naqueles anos em que se possuía amostra suficiente para comparação. As diferenças foram significativas entre o período Pré-PMBA e os Anos 3, 4 e 6 ($p < 0,05$).



Em relação à avaliação temporal, foi observado um aumento gradual das concentrações de compostos orgânicos naturais em botos-cinza e as diferenças foram significativas entre o período Pré-PMBA/Fest e os Anos 3, 4 e 6 de monitoramento na Região 1 (São Mateus). No entanto, na Região 5 (Extremo Sul), observou-se uma redução das concentrações dos compostos naturais entre o período Pré-rompimento da barragem de Fundão e o Ano 2 de monitoramento. Para os botos-cinza, as concentrações de compostos metoxilados podem refletir a influência do Banco de Abrolhos na costa do Espírito Santo (Vidal et al., 2023).

Figura 38: Concentração de ΣPBDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (1- São Mateus) (A) e 3/4 (Barra do Riacho/Metropolitana) (B) coletados na c osta do estado do Espírito Santo por ano ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) e incluindo o período pré-rompimento e antes do monitoramento do PMBA (pré-PMBA), naqueles anos em que se possuía n amostral suficiente para comparação.



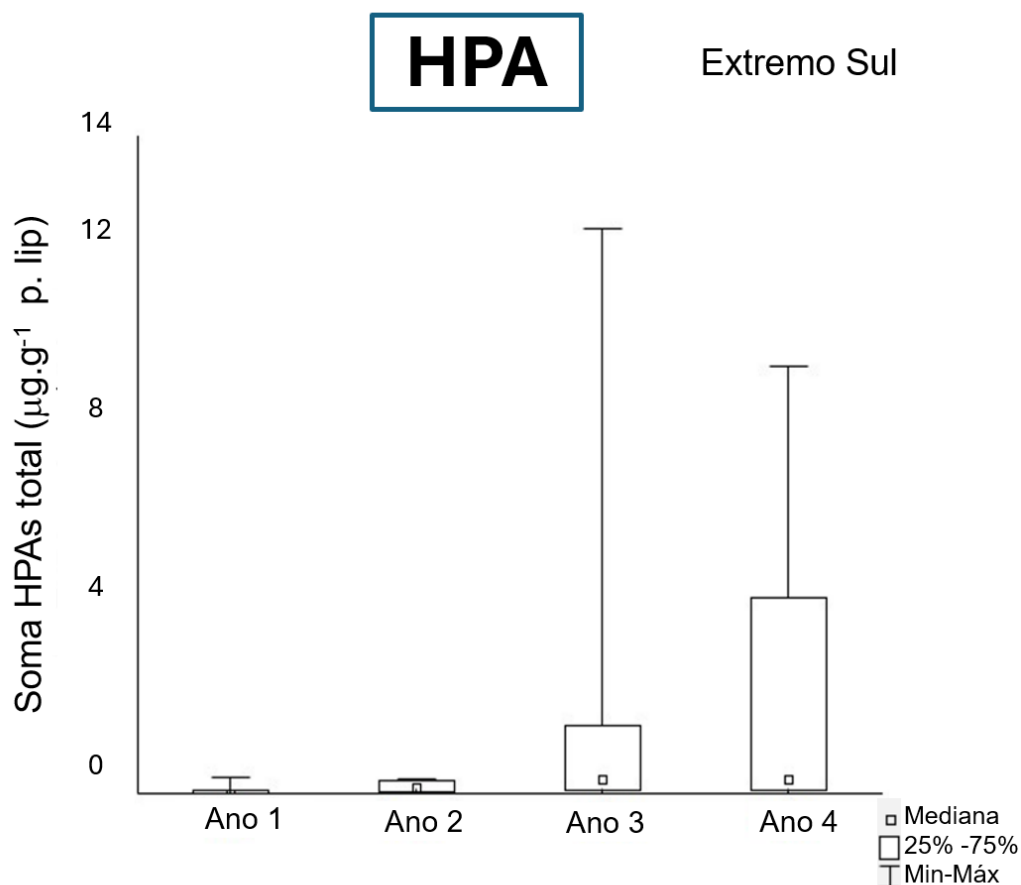
As concentrações de PBDEs aumentaram entre o período pré-PMBA/Fest e os Anos 3 e 4 de monitoramento em botos-cinza da Região 1 (São Mateus). Na Região 3/4 as concentrações também foram maiores no Ano 4 que nos Anos 1 e 2 de monitoramento dos botos-cinza. As concentrações de compostos antrópicos encontradas nessas regiões são semelhantes às observadas em locais altamente impactados na costa do Brasil, como a Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro (Vidal et al., 2023).

Quadro 17: Concentrações mediana, médias, desvio padrão, mínimas e máximas de $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{\text{USEPA}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$, expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico, em tecido hepático de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) , incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)

		$\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{\text{USEPA}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$
<i>Sotalia guianensis</i>					
São Mateus (N= 64)	Mediana	0,14	0,15	0,03	0,07
	Média \pm Desvio Padrão	3,32 \pm 8,06	3,31 \pm 8,03	0,63 \pm 3,16	1,98 \pm 5,01
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 37,27	<0,001 - 37,28	<0,001 - 25,15	<0,001 - 22,51
Rio Doce (N= 22)	Mediana	0,55	0,53	0,06	0,19
	Média \pm Desvio Padrão	4,93 \pm 16,26	4,76 \pm 15,60	0,44 \pm 0,67	3,82 \pm 13,09
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 76,66	<0,001 - 73,49	<0,001 - 2,05	<0,001 - 61,49
Barra do Riacho e Metropolitana (N= 62)	Mediana	0,09	0,10	0,04	0,05
	Média \pm Desvio Padrão	2,55 \pm 11,06	2,47 \pm 10,68	0,57 \pm 2,28	1,42 \pm 6,70
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 82,48	<0,001 - 79,61	<0,001 - 16,66	<0,001 - 50,87
Extremo Sul (N= 46)	Mediana	0,12	0,11	0,05	0,04
	Média \pm Desvio Padrão	1,14 \pm 2,55	1,14 \pm 2,54	0,18 \pm 0,34	0,44 \pm 1,31
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 12,03	<0,001 - 12,04	<0,001 - 1,71	<0,001 - 7,89

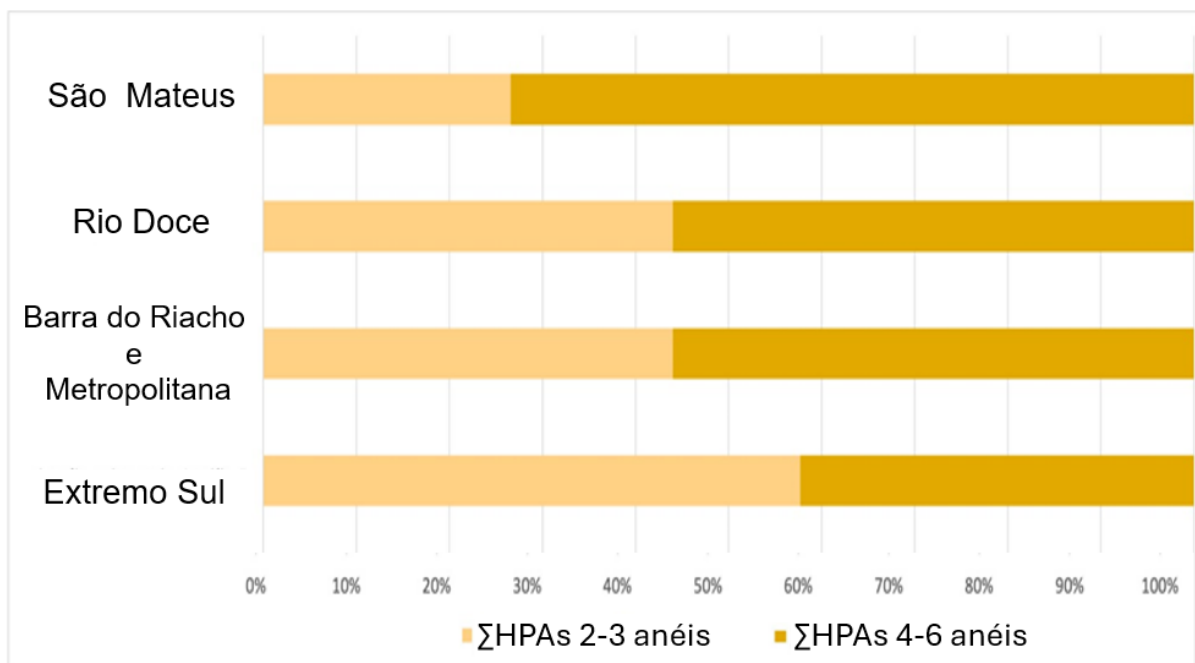
Quanto a variação espacial, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de HPAs em botos-cinza coletados na costa do ES. As concentrações de HPAs encontradas na área de estudo são maiores ou estão na mesma ordem de grandeza que as concentrações de HPAs em outras regiões que sofrem altos impactos ambiental, como a Baía de Guanabara, RJ (Barros et al., 2014).

Figura 39: Concentração de $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$ em tecido hepático de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados na região5 (Extremo Sul), na costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), naqueles anos em que se possuía n amostral suficiente para comparação.



A variação temporal das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, foram investigadas nas amostras de botos-cinza coletadas nas Regiões 1, 3/4 e 5, devido ao maior n amostral. Foi observado um aumento nas concentrações de $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$ na região 5 (Extremo Sul) entre o primeiro ano de monitoramento do PMBA-Fest e o Ano 4. Tal aumento pode estar relacionado à redistribuição de compostos por conta de perturbações ambientais, como no rompimento da barragem, no qual foram observadas maior aporte de HPAs na coluna d'água da bacia de drenagem devido a inundações (Longhini et al., 2022). Desta forma, a remobilização desses compostos no ambiente também pode resultar em maior disponibilidade para as teias tróficas dos botos-cinza.

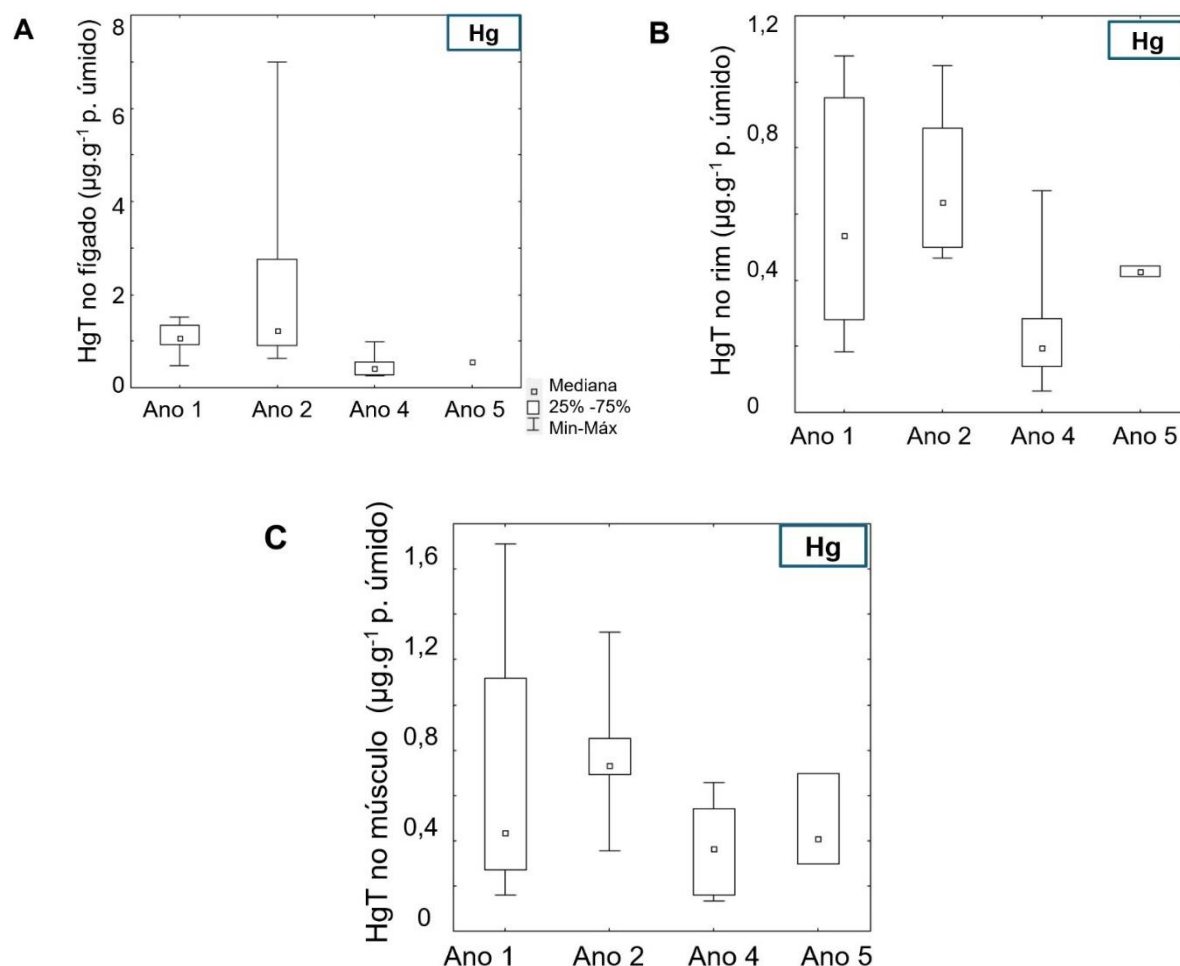
Figura 40: Perfil de HPAs de baixo (2-3 anéis) e alto (4-6 anéis) peso molecular em tecido hepático de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados nas regiões 1,2, 3/4 e 5 costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



O perfil de HPAs em botos-cinza foi majoritariamente de compostos de alto peso molecular (4-6 anéis), exceto para a Região 5 (Extremo Sul). Apesar das sutis discrepâncias no perfil, não foram encontradas diferenças significativas entre botos-cinza das Regiões do ES.

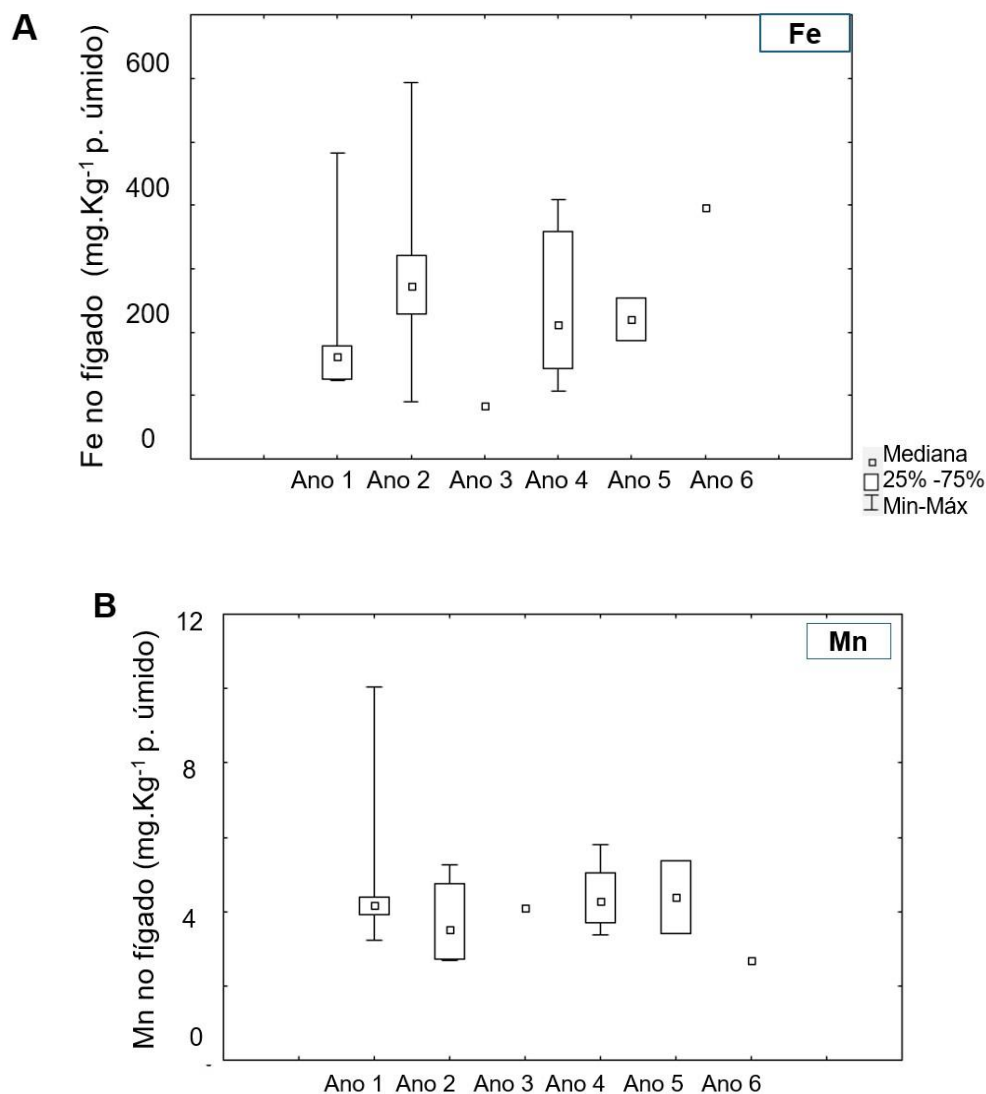
3.5.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Figura 41: Concentrações de HgT ($\mu\text{g.g}^{-1}$) no fígado (A), rim (B) e músculo (C) de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados nas diferentes regiões da costa do estado do Espírito Santo analisados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016., Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6). Os Anos 3 e 6 foram excluídos do gráfico por ter apenas um indivíduo.



Tendências temporais também foram encontradas para as toninhas analisadas ao longo do PMBA-Fest, com concentrações de HgT significativamente maiores no Ano 2 que no Ano 4 para o fígado, músculo e rim (Figura 41). Além disso, as concentrações no fígado também foram significativamente mais elevadas no Ano 1 que no Ano 4 (Figura 41). Em relação a comparação com dados prévios na costa do ES, as concentrações do presente RA 2023 encontram-se na mesma ordem de grandeza que os indivíduos coletados tanto anteriormente quanto após o rompimento da barragem (Manhães et al., 2022; Vannuci-Silva et al., 2022). Porém estes dados devem ser analisados com cautela, visto que, as consequências do rompimento da barragem ainda vêm sendo investigadas e têm apontado diferenças temporais, especialmente para o músculo e o fígado (Manhães et al., 2022). Além disso, vale ressaltar que as concentrações encontradas no presente RA2023 encontram-se na mesma ordem de grandeza que estudos prévios realizados na costa Sudeste do Brasil (Manhães et al., 2022; Seixas et al., 2007), incluindo regiões com alto impacto antrópico, como a costa do Rio de Janeiro e São Paulo (Lailson-Brito et al., 2002; Seixas et al., 2007).

Figura 42: Concentrações de Fe (A) e Mn (B) no fígado (mg.Kg^{-1} de peso úmido) de *Pontoporia blainvillei* por ano ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) do PMBA/Fest).



Para os outros elementos-traço analisados, destacam-se as elevadas concentrações de Fe e Mn, elementos-traço presentes em elevadas concentrações na lama de rejeitos (Hajte et al., 2021). Destacam-se as medianas das concentrações de Mn e Fe no fígado dos animais analisados ao longo do PMBA/Fest, que permanecem maiores que as dos animais Pré e Pós-rompimento da barragem de Fundão (período entre 2015 a 2019; Manhães et al., 2022; Figura 42).

Quadro 18: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn no fígado, músculo e rim de *Pontoporia blainvillei* na costa do Espírito Santo analisados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), expressos em mg.Kg⁻¹ de peso úmido

Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
Fígado	24	Média ± DP	0,09±0,13	5,0 ± 4,8	245±133	4,2±1,5	41±24	0,49±0,51
		Mediana	0,03	3,9	209	4,0	37	0,34
		Mín. - Máx.	0,01-0,48	1,8 -26,8	84-593	2,7-10,0	17-126	0,11-2,21
Músculo	34	Média ± DP	0,01±0,01	0,9±0,8	77 ±36	0,3±0,3	10,4±10,3 4	0,3±0,1
		Mediana	0,01	0,7	71	0,2	11,6	0,3
		Mín. - Máx.	0,001-0,02	0,2-4,5	20-172	0,03-1,1	0,1-30,6	0,1-0,4
Rim	22	Média	0,31±0,314	3,1±0,	125±51	0,8±0,3	22±5	0,35±0,31
		Mediana	0,22	3,1	116	0,8	22	0,31
		Mín. - Máx.	0,03-1,07	2,-4,4	50-252	0,5-1,9	11-29	0,16-1,38

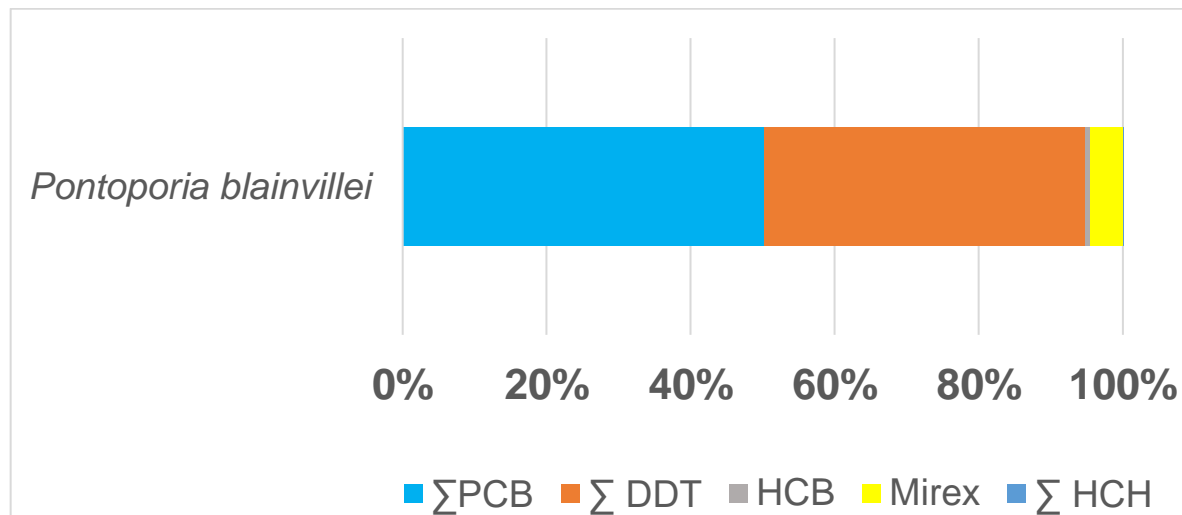
Para as toninhas, as medianas das concentrações de Fe no fígado dos animais analisados neste PMBA/Fest permanecem maiores que as dos animais pré e pós-rompimento da barragem de Fundão (2015-2019) (Manhães et al. 2022). As concentrações medianas de Mn no fígado dos animais analisados logo após o rompimento da barragem de Fundão (2015 a 2019, Manhães et al., 2022) estão na mesma faixa que as concentrações encontradas no PMBA/Fest. As concentrações medianas de Cd no rim das toninhas analisadas durante o PMBA/Fest continuam maiores do que os valores Pré e Pós-rompimento, reportados no trabalho de Manhães et al. (2022).

Quadro 19: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organoclorados ΣPCB, ΣDDT, HCB, mirex e ΣHCH, expressas em µg.g⁻¹ peso lipídico, em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1- obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016. Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).

		ΣPCB	ΣDDT	HCB	Mirex	ΣHCH
<i>Pontoporia blainvillei</i>						
	Mediana	2,4	2,1	0,04	0,2	0,03
N= 31	Média ± Desvio Padrão	4,1 ± 5,5	11,6 ± 20,8	0,2 ± 0,4	1,4 ± 3,0	0,03
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 25,1	0,2 - 80,6	<0,002 - 2,0	<0,001 - 14,9	<0,002 - 0,03

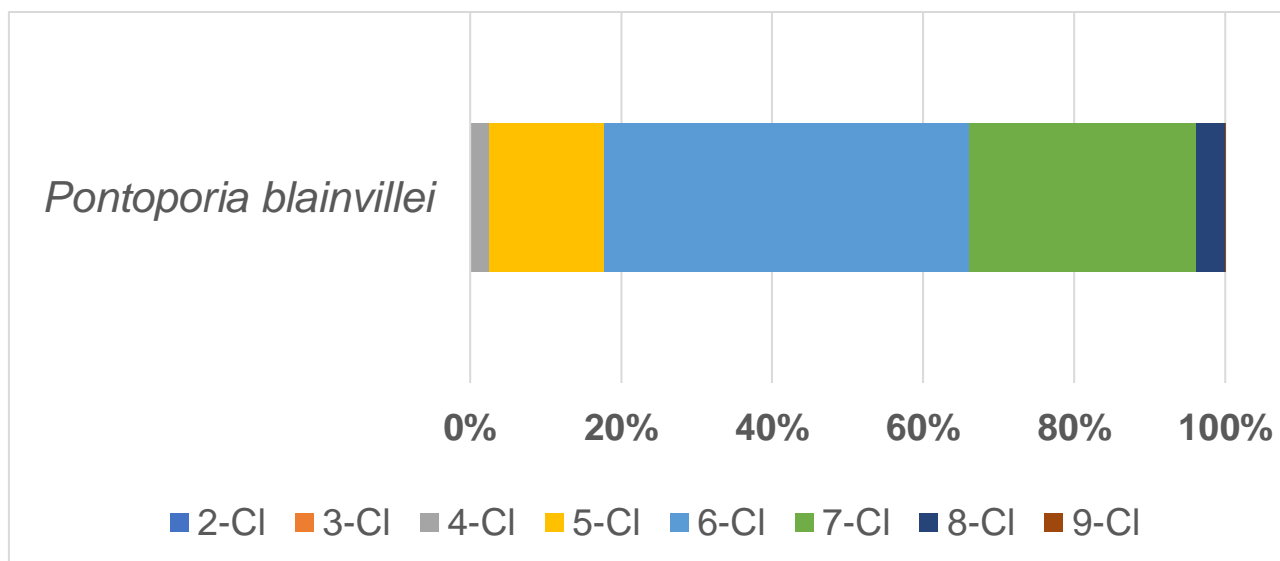
As concentrações de compostos organoclorados mais elevadas em toninhas foram de DDTs, seguido de PCBs, Mirex, HCH e HCHs. Com o aumento do número amostral de toninhas (n=31) foi possível observar uma elevação nas concentrações de DDT, corroborando os resultados prévios (Oliveira-Ferreira et al., 2022).

Figura 43: Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e coletadas na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG).



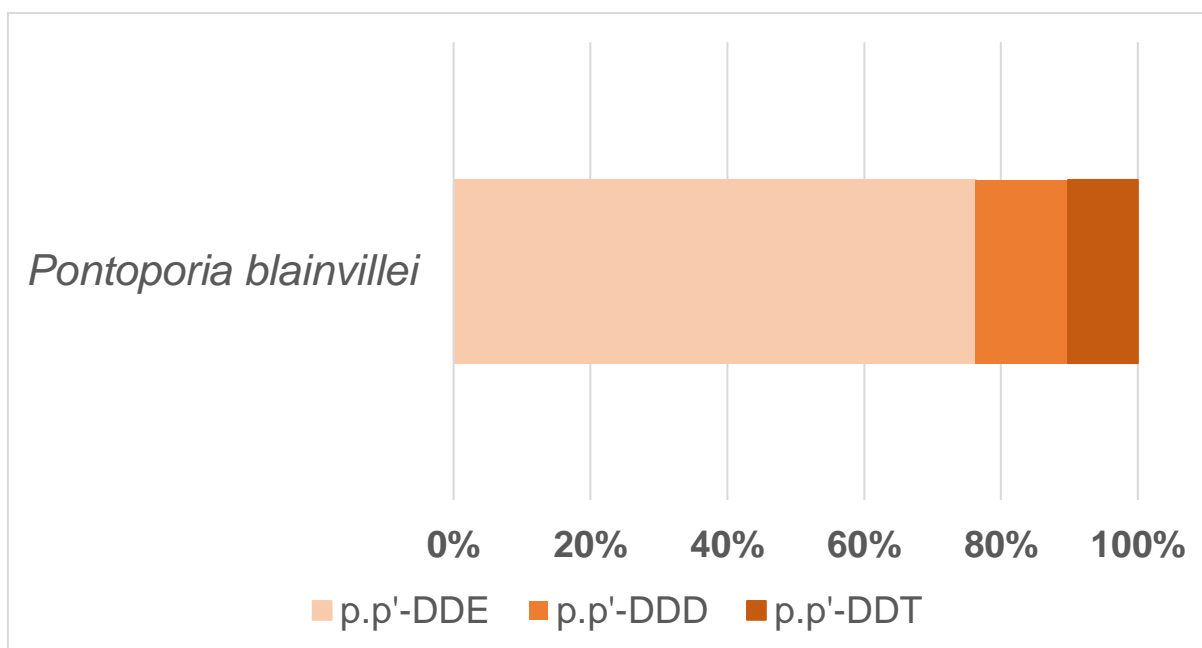
Nas toninhas analisadas durante todo o período do PMBA-Fest, o perfil de contaminação é dominado por DDTs, seguido de PCBs, mirex, HCB e HCHs, diferente do perfil observado em botos-cinza, o que pode refletir as mudanças após o rompimento da barragem de Fundão, já que anteriormente ao rompimento da barragem de Fundão, os PCBs representavam um percentual mais elevado de contribuição do que os DDTs (Figura 43) (Oliveira-Ferreira et al., 2022).

Figura 44: Perfil de contribuição de PCBs por grau de cloração em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletadas na costa do estado do Espírito Santo (ES) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG).



As toninhas apresentaram um perfil de PCBs com predomínio de congêneres contendo 5, 6 e 7 átomos de cloro, refletindo a maior disponibilidade e baixa taxa de degradação destes, assim como os botos-cinza. De modo geral, não são observadas diferenças no perfil de PCBs relacionados ao grau de cloração em botos-cinza ao longo da costa do ES, sendo este semelhante ao observado em outras espécies de cetáceos na costa do Brasil (Santos-Neto et al., 2014).

Figura 45: Perfil de contribuição de *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDT em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletadas na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG).



Observou-se um aumento nas concentrações de pesticidas organoclorados em toninhas do Espírito Santo após o rompimento da barragem de Fundão (Oliveira-Ferreira et al., 2022) (Figura 45; Adaptada de Oliveira-Ferreira et al., 2022). Quanto ao perfil do Σ DDT, independente do período analisado (Pré-rompimento e os Anos do PMBA-Fest), foi encontrando o predomínio do metabólito *p,p'*-DDE em toninhas, sugerindo uma contaminação histórica por DDTs nas teias tróficas destes cetáceos ao invés de utilização recente deste pesticida. Atualmente, as concentrações de DDTs em toninhas são maiores que as concentrações de PCBs, diferentemente do observado para botos-cinza da mesma região, e, ainda, em contraste com o que é observado em cetáceos costeiros do sudeste do Brasil, demonstrando as alterações nas concentrações desses compostos após o rompimento da barragem.

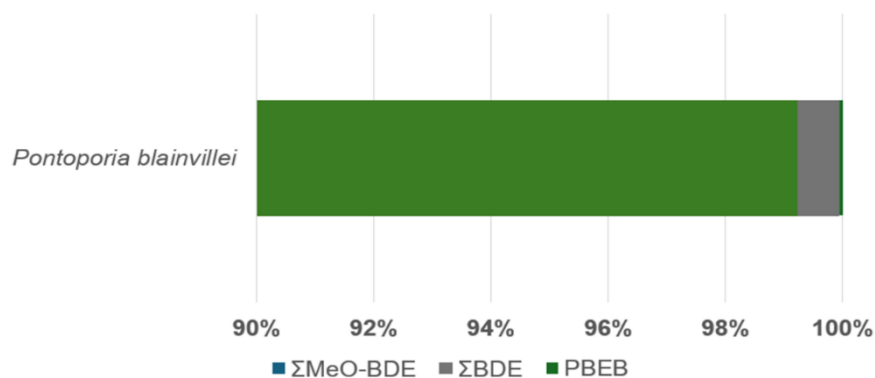
Quadro 20: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE, e de origem antrópica, Σ PBDE, PBEB e HBBZ, expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1- obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).

		Σ MeO-BDE	Σ PBDE	PBEB	HBBZ
<i>Pontoporia blainvillei</i>					
N= 33	Mediana	2,55	0,02	0,002	-
	Média \pm Desvio Padrão	3,88 \pm 3,70	0,04 \pm 0,06	0,002 \pm 0,001	-
	Mínimo - Máximo	0,57 – 16,80	0,005 - 0,27	<0,001-0,004	-

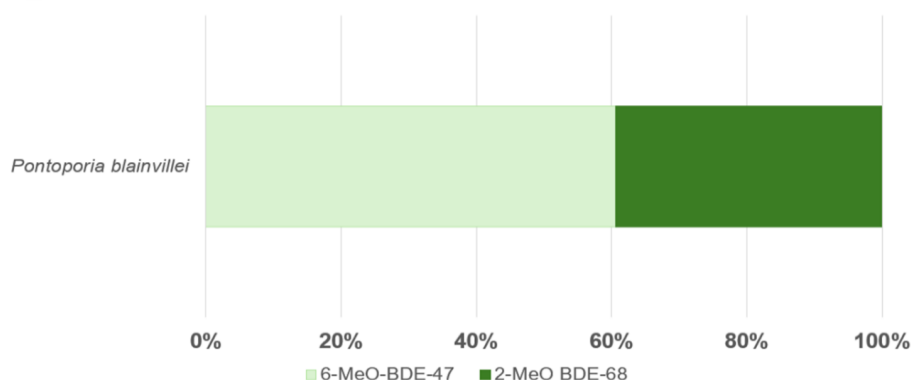
Destacam-se as elevadas concentrações de compostos metoxilados em todas as regiões, que podem refletir a influência do Banco de Abrolhos na costa do Espírito Santo. As concentrações de compostos organobromados de origem natural e antrópica se assemelham às do boto-cinza da mesma região.

Figura 46: A- Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE, e de origem antrópica, Σ PBDE e PBEB, em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) e B- Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE, toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1- obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016., Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).

A

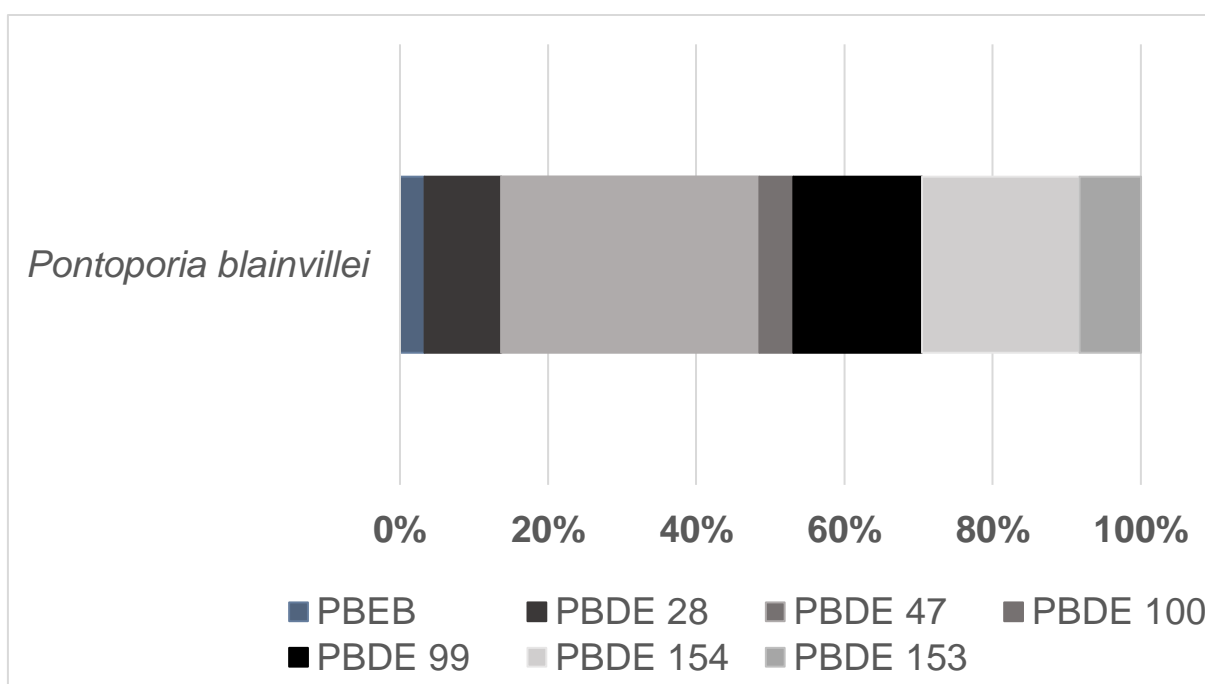


B



Os compostos metoxilados representaram mais de 90% do perfil para as toninhas, seguidos dos PBDEs e PBEB (Figura 46- A). Dentre os compostos metoxilados (origem natural), observa-se um predomínio de 6-MeO-BDE-47 e 2-MeO-BDE-68 as toninhas da costa do ES. Este perfil é similar ao encontrado no boto-cinza e reflete a influência do Banco de Abrolhos na região (Vidal et al., 2023), uma vez esses compostos são sintetizados por algas, esponjas e cianobactérias e organismos associados (Oliveira-Ferreira et al., 2022). As tendências temporais de diminuição nas concentrações de 2-MeO-BDE-68 e do Σ MeO-BDE (Oliveira-Ferreira et al., 2022) refletem as mudanças nas composições das comunidades, refletindo em uma perda da qualidade ambiental.

Figura 47: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem antrópica convencionais (por congêneres de PBDE) e emergente (PBEB) em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 - obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).



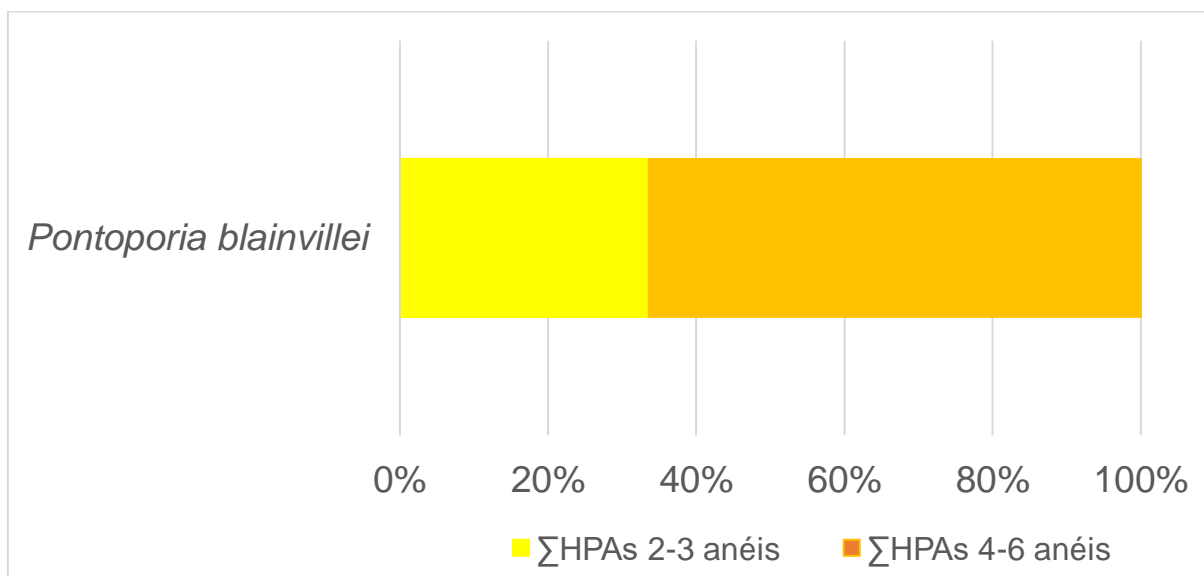
Observa-se um predomínio dos PBDEs em relação ao retardante de chama emergente (PBEB) para as toninhas da costa do ES, independente do período analisado (Pré-rompimento e os Anos do PMBA-Fest). Dentre os PBDEs, o PBDE-47 predominou no tecido adiposo subcutâneo das toninhas, corroborando estudos anteriores com a espécie realizados na costa brasileira (Oliveira-Ferreira et al., 2022; Vidal et al., 2023).

Quadro 21: Concentrações mediana, médias, desvio padrão, mínimas e máximas de $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{\text{USEPA}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$, $\Sigma\text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$, expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico, em tecido hepático em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do Espírito ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1- foram obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).

		$\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{\text{USEPA}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$	$\Sigma\text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$
<i>Pontoporia blainvillei</i>					
N= 17	Mediana	0,13	0,04	0,01	0,02
	Média \pm Desvio Padrão	0,54 \pm 0,85	0,42 \pm 0,77	0,13 \pm 0,36	0,30 \pm 0,66
	Mínimo - Máximo	<0,001 – 3,36	<0,001 – 3,23	<0,001 – 1,63	<0,001 – 3,22

As concentrações de HPAs em toninhas encontraram-se na uma ordem de grandeza mais elevadas para as concentrações de HPAs totais enquanto que, considerando as demais classificações adotadas (USEPA e número de anéis aromáticos), estas encontram-se uma ordem de grandeza menores

Figura 48: Perfil de HPAs de baixo (2-3 anéis) e alto (4-6 anéis) peso molecular em tecido hepático de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1- obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6).



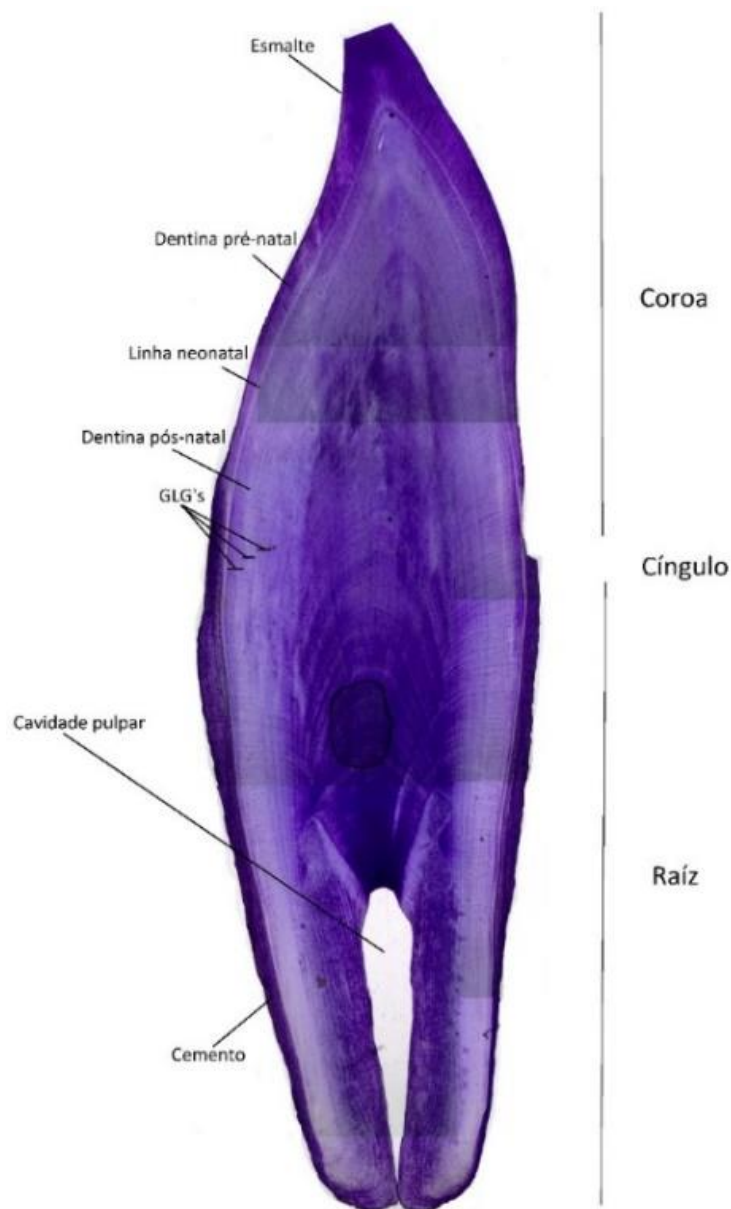
O perfil de HPAs de alto peso molecular (4-6 anéis) predominou nas toninhas, similar ao observado em botos-cinza das demais regiões do ES, exceto pela Região 5 (Extremo Sul). Este resultado pode refletir diferenças nas fontes de emissão, na alimentação e metabolização desses compostos, porém que necessitam de maiores investigações. Durante a elaboração do presente RA 2023, foi publicado o primeiro estudo que avaliou as concentrações de HPAs em golfinhos no Brasil e ainda, foi realizado com a toninha (Santos-Neto et al., 2024). As concentrações obtidas nas toninhas coletadas ao longo do PMBA-Fest encontram-se uma ordem de grandeza inferiores que as amostras analisadas no período Pré-rompimento e nos primeiros anos após o rompimento (até o Ano 1 do PMBA-Fest), relacionando-se a alterações no ambiente após o rompimento (Longhini et al., 2022). Porém, quando comparadas a

concentrações detectadas em toninhas de outras regiões, na costa Sudeste do Brasil, e que representam regiões de alto impacto antrópico, as concentrações do presente RA2023 são mais elevadas (Santos-Neto et al., 2024). Esses resultados são preocupantes, e, portanto, ressalta-se o risco desses compostos à saúde das toninhas devido a seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Martineau et al., 2002).

3.6 ESTRUTURA ETÁRIA E SEXUAL DAS POPULAÇÕES DE *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*

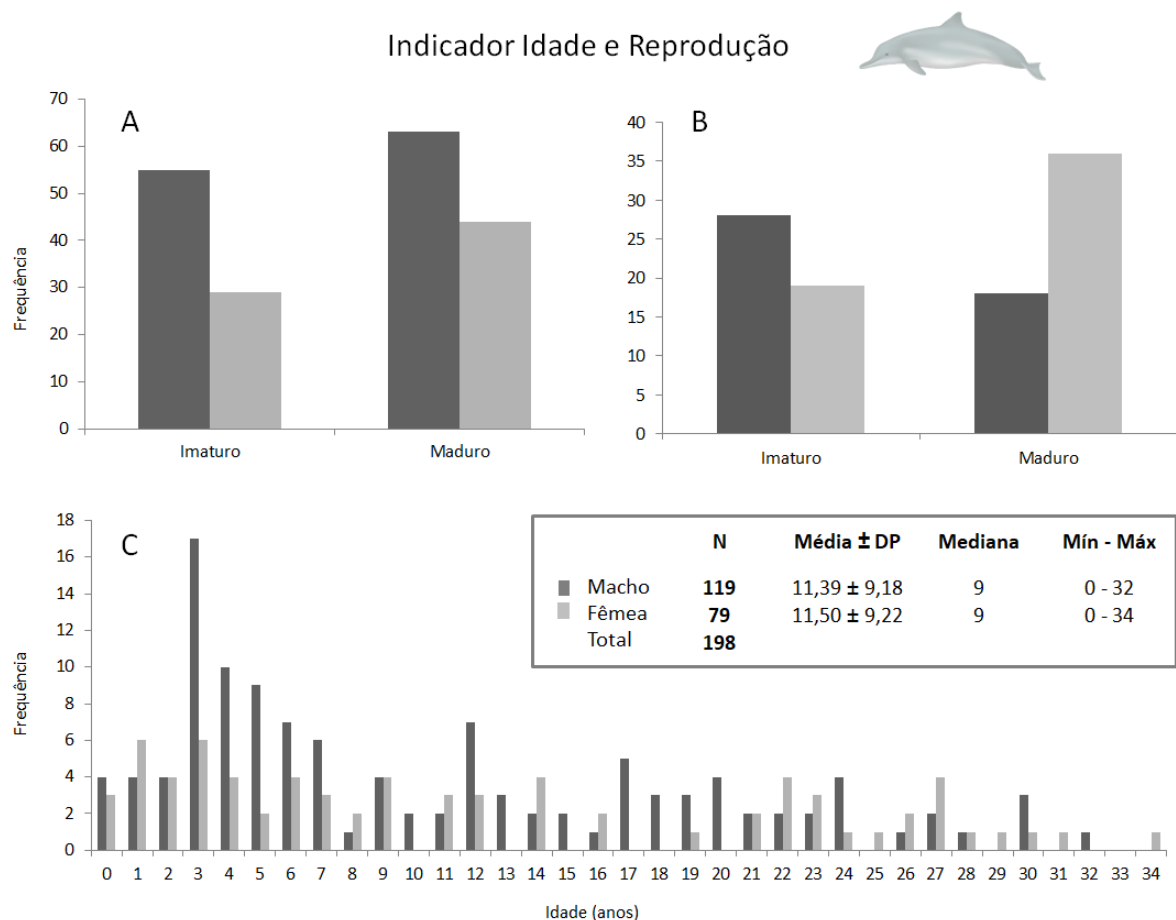
3.6.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Figura 49: Corte histológico bucal-lingual do dente de *Sotalia guianensis* (SOT 346 - 20 anos), identificando suas estruturas.



Fotografia obtida através de microscópio óptico (aumento de 40x). As linhas identificadas como *GLG's* se referem aos Grupos de Camadas de Crescimento e, portanto, aos três primeiros anos do indivíduo. Esta imagem pode ser utilizada como exemplo da fotografia obtida na análise de estimativa de idade a partir dentes de um indivíduo coletado durante o PMBA/Fest.

Figura 50: Distribuição dos indivíduos machos e fêmeas de boto-cinza (*S. guianensis*) coletados no Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) em relação às classes de maturidade reprodutiva, conforme determinado por A) idade (n=198) e B) maturidade gonadal (N=101). Observa-se maior frequência de indivíduos machos e de indivíduos maduros, com idade média de 11,50 anos para fêmeas e 11,39 anos para machos (em B a maior frequência de fêmeas maduras e de imaturos machos possivelmente se deve a um artefato de amostragem, pois o conjunto de dados obtidos de gônadas é cerca de 50% menor em relação ao de dentes). C) As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 6 anos (imaturos), mas a maioria dos machos e fêmeas coletados são maduros

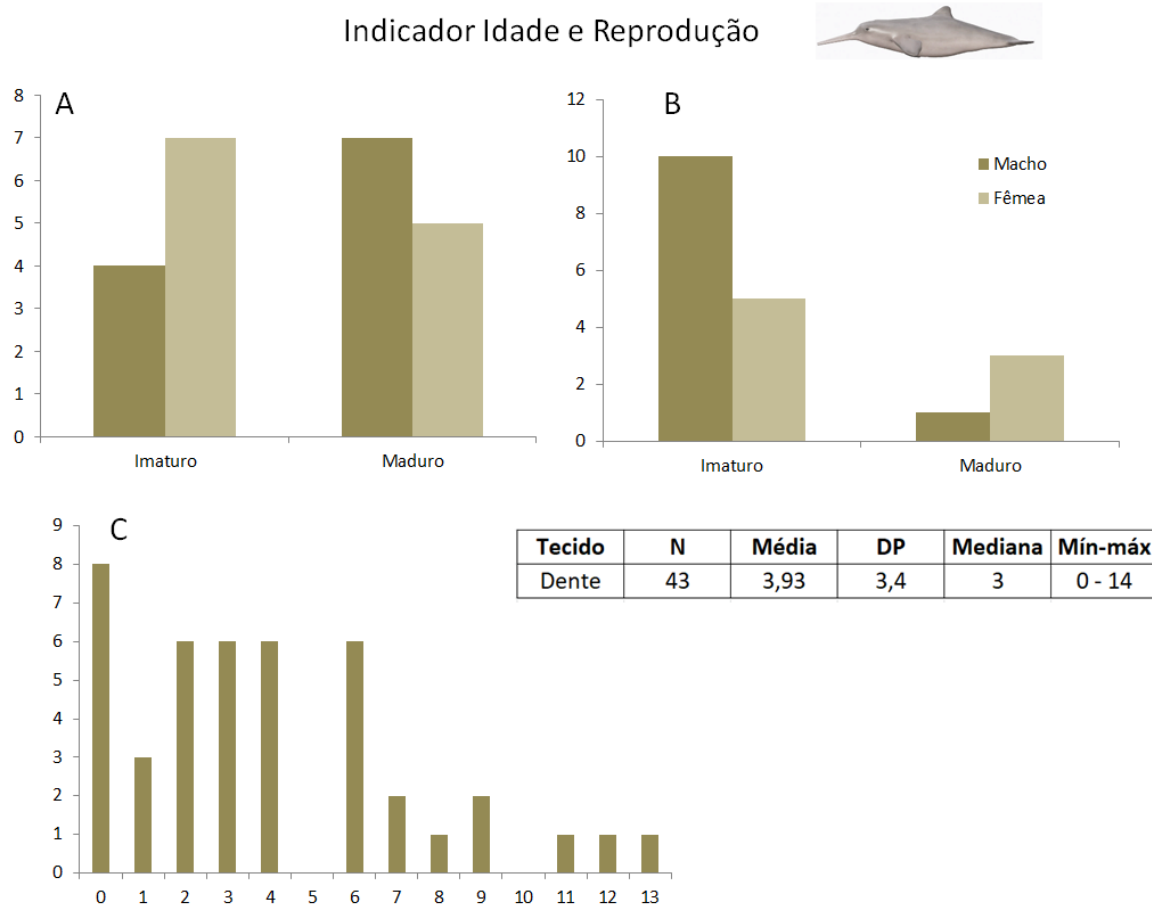


Os dados indicam um aumento da idade média dos indivíduos encalhados (11,50 e 11,39 para fêmeas e machos) em relação aos padrões Pré-rompimento relatados na literatura (Médias = 5,01 a 10,28; Azevedo et al., 2015; Carvalho et al., 2015, Lima et al., 2017). Esses resultados são preocupantes por indicarem que a população de botos-cinza da região está tendo maior mortalidade de indivíduos com alta capacidade reprodutiva, potencialmente afetando a persistência desta espécie na área. Estudos considerando a maturidade sexual e idade para botos-cinza são escassos e ainda não há dados publicados para os botos-cinza do ES. Considerando os animais do norte do Rio de Janeiro, os botos-cinza atingem a maturidade sexual aos 6 anos de idade (Ramos et al., 2000) e a expectativa de vida

da espécie é em torno de 30 anos (Jefferson et al., 2015). Considerando ainda que é gerado somente um indivíduo por gestação e há alto cuidado parental, a idade em que esses indivíduos são registrados é preocupante (Jefferson et al., 2015).

3.6.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Figura 51: Distribuição dos indivíduos de toninha (*P. blainvillei*) coletados no Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 – obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) em relação à maturidade reprodutiva a partir da idade (A, N=43), e da análise de gônadas (B, N=28). C) Distribuição dos indivíduos nas categorias de idade. A idade média é de 3,93 anos. No gráfico C os indivíduos não foram separados por sexo devido ao pequeno tamanho amostral

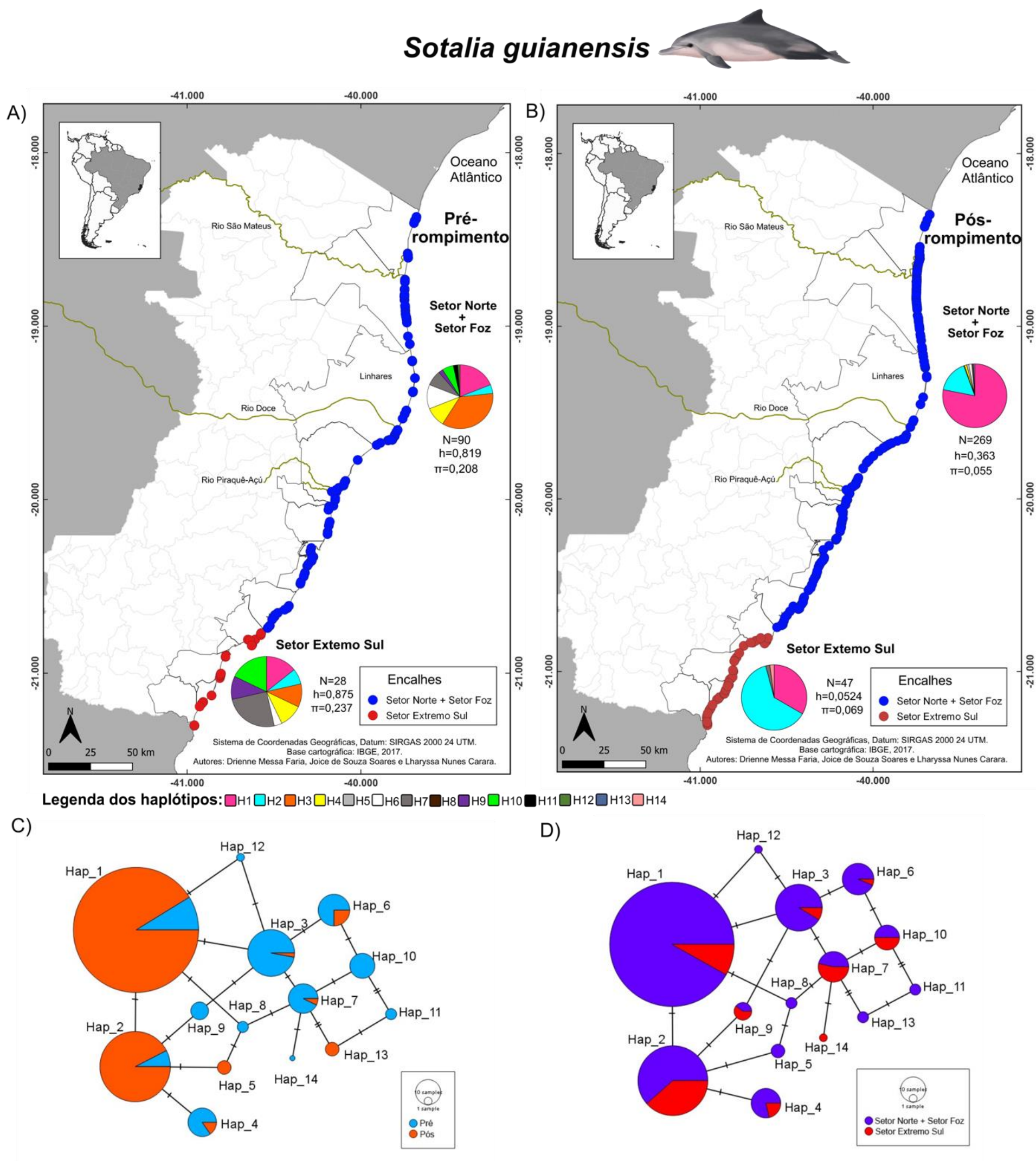


As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 4 anos (imaturos). Apesar do tamanho amostral pequeno ao longo do PMBA-Fest, a comparação com resultados obtidos em outro projeto já encerrado (projeto implementado pelo FUNBIO - Fundo Brasileiro para a Biodiversidade, Projeto da Conservação da Toninha (Contrato 81/2016), que analisou indivíduos encalhados antes do rompimento e até o primeiro ano do PMBA-Fest, mostra uma redução da média de idade da parcela removida da população (3,93 anos) em relação aos dez anos anteriores ao rompimento (Manhães et al., 2022; Oliveira-Ferreira et al., 2022).

3.7 ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS

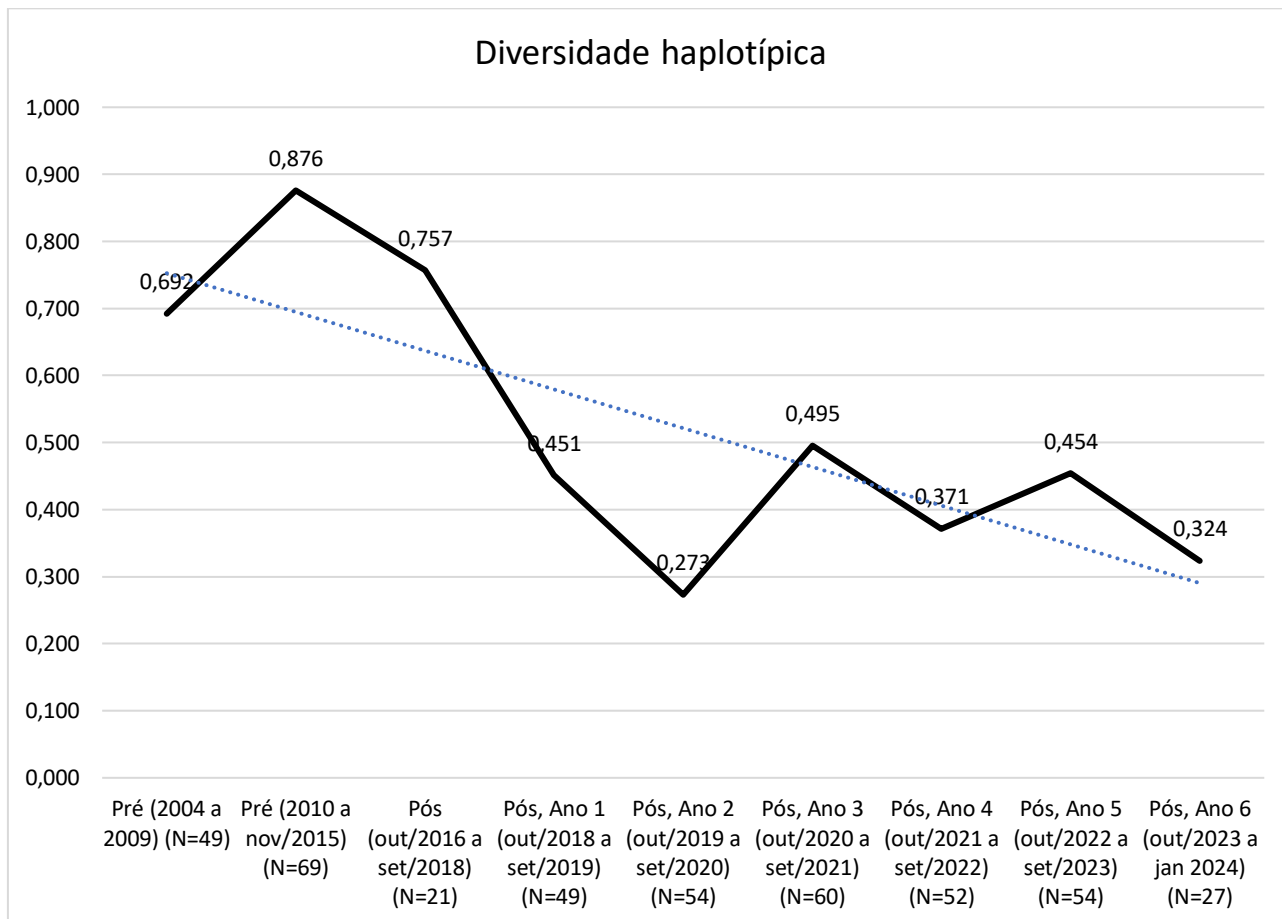
3.7.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

Figura 52: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo, de 2004 a janeiro de 2024. A) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pré-rompimento indicados por círculos coloridos de azul para o Setor Norte + Setor Foz e vermelho para o Setor Extremo Sul; gráficos de pizzas com as frequências dos haplótipos e índices de diversidade por população (N = número de indivíduos; h = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica). B) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) indicados por círculos coloridos de azul para o Setor Norte + Setor Foz e vermelho para o Setor Extremo Sul; gráficos de pizzas com as frequências dos haplótipos e índices de diversidade por população (N = número de indivíduos; h = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica). C) Rede de haplótipos do período Pré-rompimento baseada na análise de Median-Joining. D) Rede de haplótipos por região baseada na análise de Median-Joining. Cada círculo corresponde a um haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência na população. Traços entre os haplótipos significam o número de passos mutacionais, número de nucleotídeos (representados pelas bases nitrogenadas A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina) que diferem entre os haplótipos



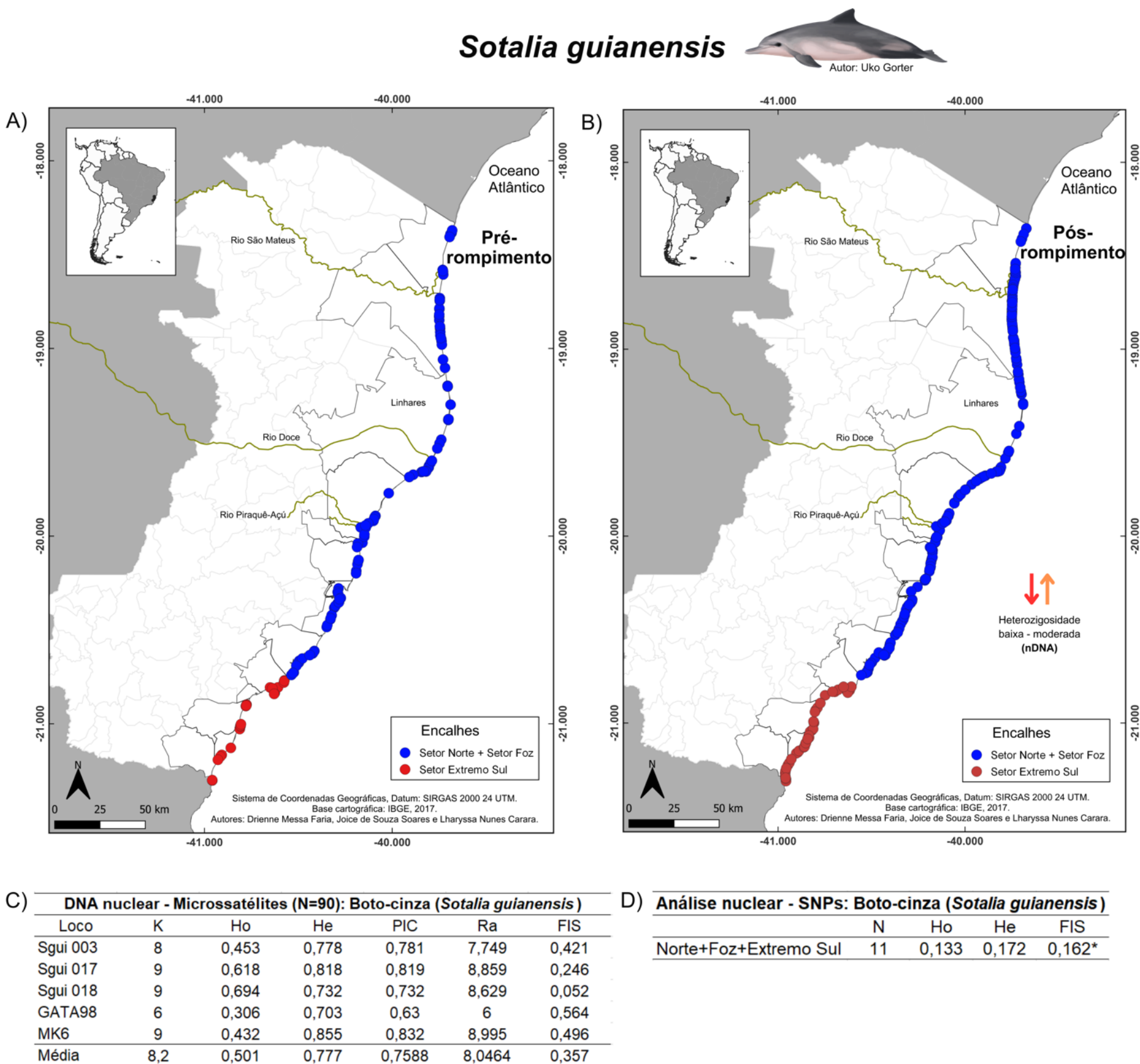
Para o marcador **D-loop do DNA mitocondrial**, no total foram avaliados 433 indivíduos de botos-cinza (*Sotalia guianensis*). Todos os animais avaliados foram encontrados mortos encalhados ao longo do litoral do Espírito Santo antes do rompimento da barragem de Fundão (Pré-rompimento, 2004 a novembro de 2015, N= 118) e após (Pós-rompimento, outubro de 2015 a janeiro de 2024, N=316), incluindo regiões criticamente impactadas, como a foz do Rio Doce (Setor Foz, N=249) e Norte do Espírito Santo (Setor Norte, N=108), e regiões do sul do estado (Setor Extremo Sul, N=76). Os valores dos índices de diferenciação populacional (Fst par-a par e AMOVA) encontrados indicam a presença de duas populações regionais (Setor Norte + Setor Foz, Setor Extremo Sul). Levando-se em consideração o espaço e o tempo, é possível observar diferenciação genética significativa entre o Setor Norte + Setor Foz – Pré-rompimento, Setor Norte + Setor Foz – Pós-rompimento, Setor Extremo Sul – Pré- rompimento, Setor Extremo Sul – Pós rompimento. É possível observar baixa diversidade genética haplotípica para a população Setor Norte + Setor Foz – Pós-rompimento ($h=0,363$) sendo o menor valor encontrado, apesar do alto número amostral avaliado, e destacando-se por ser estar localizada em uma das regiões criticamente impactadas. Os gráficos de pizza representam a proporção de haplótipos do DNA mitocondrial referente as populações levando-se em consideração o espaço e o tempo, cada cor refere-se a um haplótipo diferente. Para cada população detectada é apresentado um gráfico de pizzas sendo que a maior quantidade de haplótipos foi encontrada para as regiões avaliadas no período Pré-rompimento da barragem, com perda de haplótipos para o período Pós-rompimento, evidenciando tendência de homogeneização genética para as populações ao longo do tempo. Para a população Setor Norte +Setor Foz, criticamente afetada, é possível observar a perda de três haplótipos (H7, cinza; H9, roxo; H10, verde), diminuição da frequência de vários haplótipos (H3, laranja; H4, amarelo; H6, branco), aumento da frequência de dois haplótipos (H1, rosa e H2 azul claro) e novos haplótipos com baixa frequência (H8, marrom e H13, azul escuro). Para o Setor Extremo Sul, os resultados também chamam atenção, pois é verificada perda de cinco haplótipos (H10, verde; H9, roxo; H3, laranja; H4, amarelo; H6, branco), manutenção de um haplótipo com diminuição da sua frequência (H7, cinza) e de dois haplótipos (H1, rosa e H2 azul claro), com aumento da sua frequência e aparecimento de um haplótipo com baixa frequência (H14, rosa claro). As redes de haplótipos demonstram o número de haplótipos encontrados (14 no total), sendo possível observar compartilhamento de haplótipos, tanto entre os períodos avaliados quanto entre as regiões. Os haplótipos exclusivos (círculos de apenas uma cor) apareceram majoritariamente para o período Pré-rompimento e para o Setor Norte+Setor Foz. Pode-se observar maior número de haplótipos para o período Pré-rompimento. A perda de haplótipos e a diminuição da frequência de vários haplótipos comparando os períodos Pré e Pós-rompimento refletem a menor diversidade genética encontrada para as duas populações. Chamamos a atenção para a diminuição da diversidade genética do Setor Norte + Setor Foz – Pós-rompimento ($h=0,363$), indicando possível relação causal com a chegada do rejeito de minério no litoral do Espírito Santo, fato que pode causar homogeneização genética e aumento da vulnerabilidade dessa espécie já ameaçada de extinção.

Figura 53: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo, de 2004 a janeiro de 2024. Gráfico de valores de diversidade haplotípica (eixo Y) por ano de amostragem (eixo X), Pré-rompimento (Pré) e Pós-rompimento (Pós). A linha de tendência está representada pela linha tracejada



Para o marcador **D-loop do DNA mitocondrial**, o gráfico de diversidade genética haplotípica ao longo dos anos demonstra a tendência de diminuição de 53,17% da diversidade genética, do período Pré (2004 a 2009) ao período Pós, Ano 6 (out/2023 a jan 2024). O decréscimo teve início antes do rompimento da barragem. No entanto, entre os períodos Pré (2010 a nov/2015) e Pós (out/2016 a set/2018) a queda foi de 15,65%. Após o rompimento da barragem de Fundão essa queda de diversidade haplotípica foi intensificada indo para 63,9% do período Pós (out/2016 a set/2018) ao período Pós, Ano 2 (out/2019 a set/2020). Do período Pós, Ano 2 (out/2019 a set/2020) ao Pós, Ano 3 (out/2020 a set/2021) podemos observar um aumento da diversidade haplotípica, porém um novo declínio, seguindo essa tendência de diminuição. Os valores de diversidade genética haplotípica do período Pós-Ano 6 (de outubro de 2023 a janeiro de 2024) devem ser interpretados com cautela uma vez que a amostragem ainda não foi finalizada para esse ano. Essa oscilação, de um aumento da diversidade haplotípica no Ano 3 e nova diminuição nos anos seguintes, indica a necessidade de monitoramento da diversidade genética dos botos-cinza a longo prazo. Esses resultados reforçam a vulnerabilidade dessa espécie a bruscas alterações ambientais.

Figura 54: Índices de diversidade genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) de cinco locos microsatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). A) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pré-rompimento indicados por círculos coloridos de azul para o Setor Norte + Setor Foz e vermelho para o Setor Extremo Sul. B) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) indicados por círculos coloridos de azul para o Setor Norte + Setor Foz e vermelho para o Setor Extremo Sul. C) Tabela com os resultados dos cinco locos microsatélites avaliados (Sgui 003, Sgui 017, Sgui 018, GATA98, MK6). Número de alelos (K), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS). *Valores estatisticamente significativos do coeficiente de endogamia (FIS), com correção de Bonferroni, ($P < 0,002$). D) Tabela com os resultados dos SNPs avaliados. Número amostral (N); heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de endogamia (FIS)

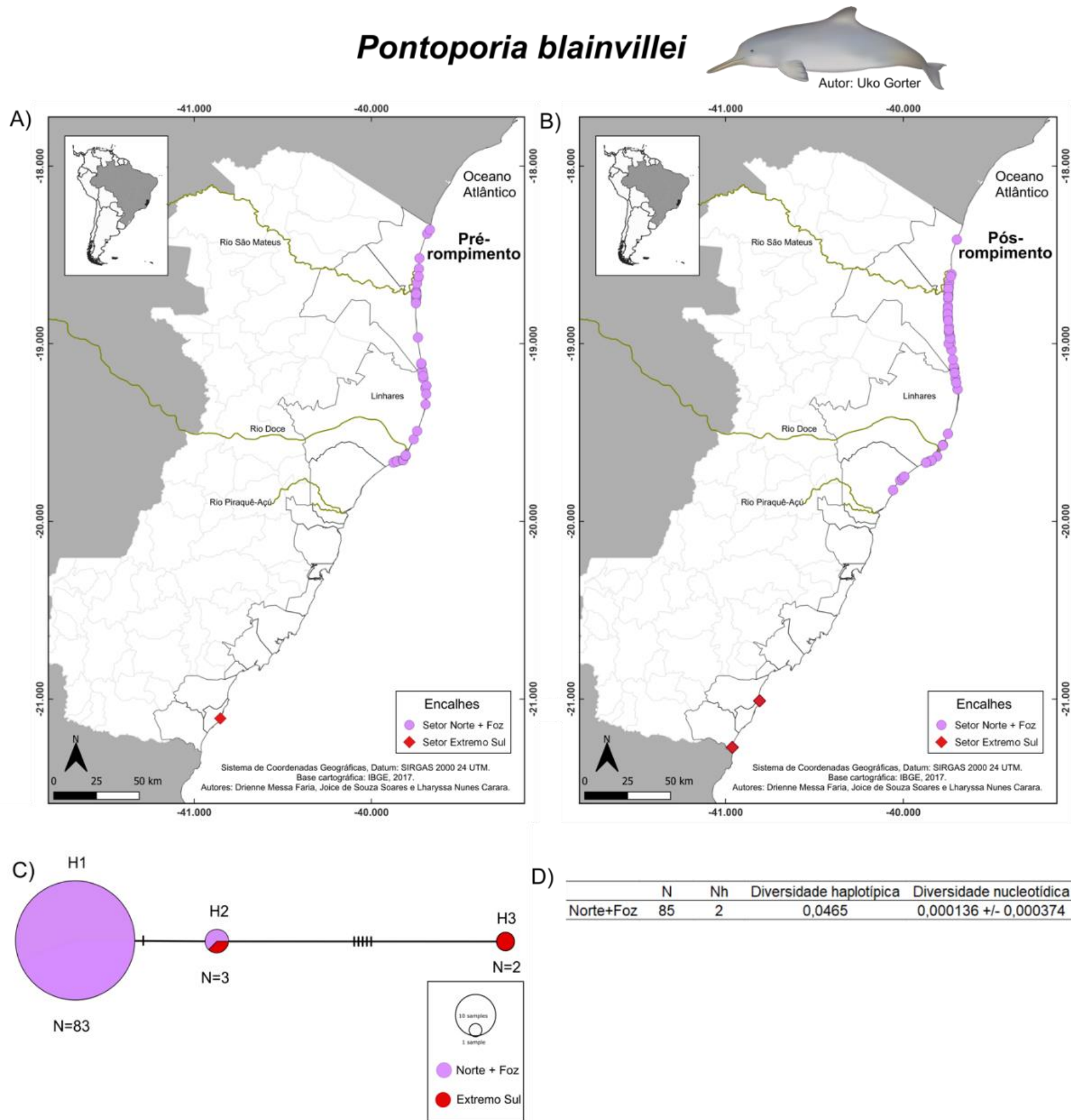


Para os **marcadores microsatélites do DNA nuclear**, dos 10 locos avaliados foram considerados os indivíduos que apresentaram alelos para no mínimo cinco locos microsatélites sendo analisados N=90 indivíduos do período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024). Foram excluídos cinco locos (Sgui 006, Sgui 011, Sgui 002, Sgui 003 e PPHO142), que se apresentaram ligados com outros locos. Para os cinco locos avaliados (Sgui 016, Sgui 017, Sgui 018, GATA98, MK6) não foi possível observar estruturação espacial entre o Setor Norte (N=28), Setor Foz (N=50) e Setor Extremo Sul (N=12), sendo considerada uma população. Os valores de diversidade genética encontrados foram baixos a moderados (número de alelos médio=8,2; heterozigosidade observada média= 0,501; heterozigosidade esperada média= 0,777, Riqueza alélica média=8,046). Valores do teste de Wilcoxon para eventos passados de gargalo populacional baseado em frequências alélicas revelaram que a população de botos-cinza do litoral do Espírito Santo passou por evento de gargalo (redução recente) com base no modelo mutacional TPM ($P = 0,031$), $P < 0,05$.

Para os **SNPs do DNA nuclear**, foram analisadas 11 amostras por meio da biblioteca 2bRAD e o número de *reads* brutos variaram de 362.606 a 531.912 por amostra. Após as filtrações, o número total de *reads* mantidos foi de 105.011 a 141.923 por amostra e todos os *reads* foram padronizados para 27pb. Após a prospecção de SNPs, o conjunto de dados final resultou em 2.509 SNPs com porcentagem de *missing data* de 9,91%. Não foi detectada diferenciação populacional significativa temporal Pré-rompimento (N=4) e Pós-rompimento (N=7); e espacial entre o Setor Norte (N=3), Setor Foz (N=2) e Setor Extremo Sul (N=6), sendo considerada uma única população. Níveis baixos a moderados de heterozigosidade genômica foram encontrados para esta população (Ho=0,133; He=0,172), considerando o número de SNPs avaliados. Recomenda-se a continuidade do monitoramento dos índices de diversidade genética nuclear para incremento do número de locos e indivíduos analisados.

3.7.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

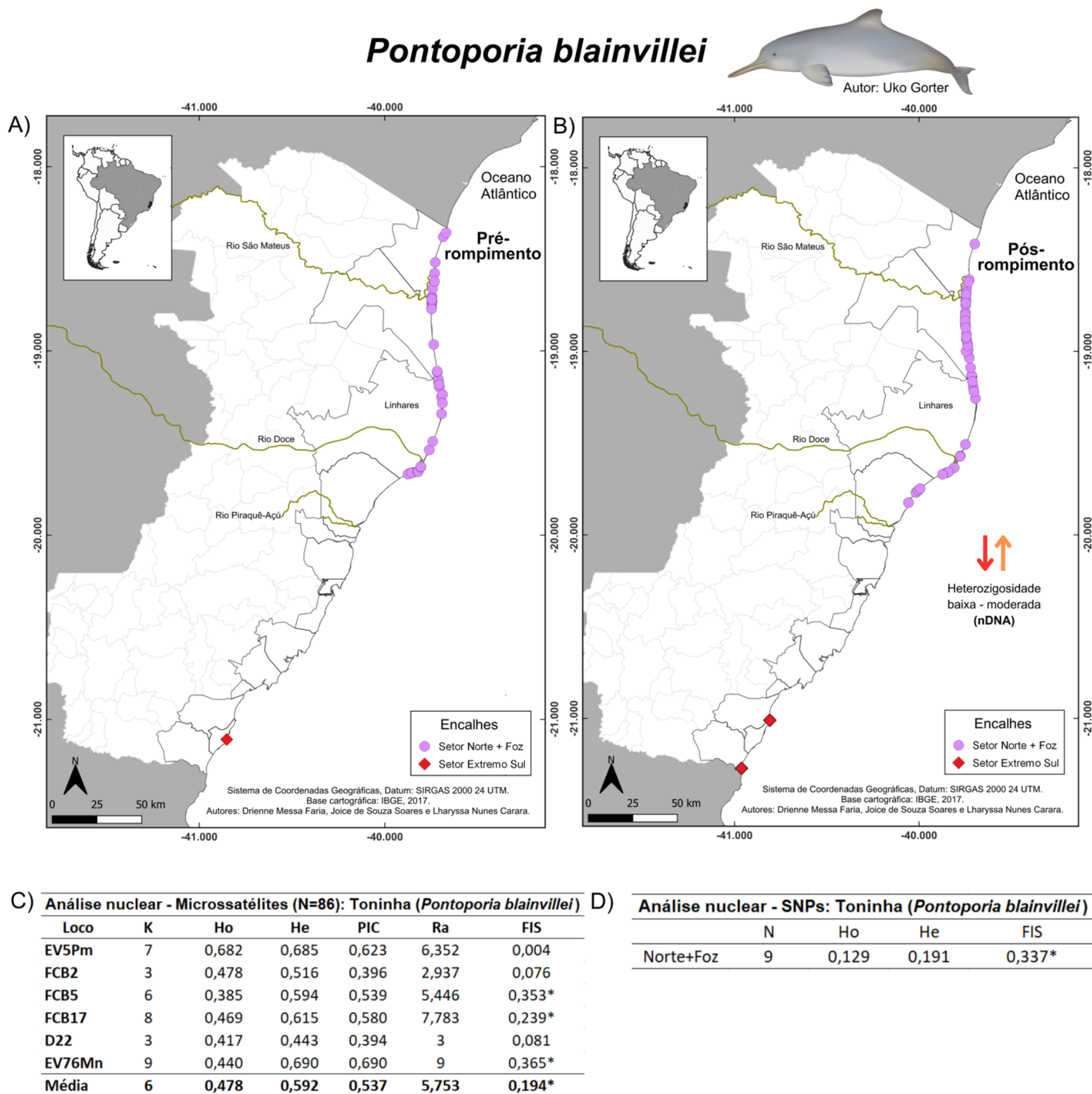
Figura 55: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de toninhas (*Pontoporia blainvillei*). A) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pré-rompimento indicados por círculos rosas para os Setores Norte e Foz e losango vermelho para o Setor Extremo Sul. B) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) indicados por círculos rosas para os Setores Norte e Foz e losango vermelho para o Setor Extremo Sul. Nas figuras A e B os losangos representam três amostras que foram excluídas das análises. C) Rede de haplótipos baseada na análise de Median-Joining. Cada círculo corresponde a um haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência na população. Traços entre os haplótipos significam o número de passos mutacionais, número de nucleotídeos (representados pelas bases nitrogenadas A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina) que diferem entre os haplótipos. D) Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de toninhas (*as três amostras da região sul foram excluídas dessa análise). N = número de indivíduos; h = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica. Os indivíduos do Ano 1 foram obtidos e inicialmente analisados no projeto Funbio contrato nº 81/2016.



Para o marcador **D-loop do DNA mitocondrial**, três amostras da região do Extremo Sul foram excluídas das análises visto que essa região não é conhecida como uma região de ocorrência das toninhas (Secchi et al., 1998; Siciliano et al., 2002; do Amaral et al., 2018). Os indivíduos do Ano 1 foram obtidos e inicialmente analisados no projeto Funbio contrato nº 81/2016. Para o total de 85 indivíduos incluindo amostras do período Pré-rompimento (N=28) e Pós-rompimento (N=57, Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) não foi possível evidenciar diferenciação populacional tanto na análise espacial quanto na análise temporal, reforçando a presença de uma população. É possível observar baixa diversidade genética na população analisada (N=85; Nh=2; h=0,0465; π =0,0001). Os testes de neutralidade, que podem indicar expansão populacional após efeito gargalo não foram significativos. Foi detectada a presença de somente três haplótipos para as toninhas do Espírito Santo, sendo um haplótipo mais representativo, o H1, encontrado em 94,32% dos indivíduos. É possível observar a presença de um haplótipo exclusivo para a Região Extremo Sul, o haplótipo H3. No entanto, sabe-se que a região Extremo Sul não é uma área de ocorrência conhecida para as toninhas. As amostras provenientes de encalhes de indivíduos desta região foram mantidas aqui, mas os encalhes de toninhas registrados para este local serão investigados cautelosamente. Sabe-se que essa espécie está criticamente ameaçada de extinção e esses dados nos mostram que há uma população vulnerável que vive nas áreas que estão criticamente impactadas, como Foz do Rio Doce e Região Norte.

Figura 56: Índices de diversidade genética nuclear de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) de seis locos microssatélites e SNPS (*Single Nucleotide Polymorphism*). A) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pré-rompimento indicados por círculos rosas para os Setores Norte e Foz e losango vermelho para o Setor Extremo Sul. B) Localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento indicados por círculos rosas para os Setores Norte e Foz e losango vermelho para o Setor Extremo Sul. Nas figuras A e B os losangos representam três amostras que foram excluídas das análises. C) Tabela com os resultados dos seis locos microssatélites avaliados. Número de alelos (K), heterozigiosidade observada (Ho), heterozigiosidade esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS). *Valores estatisticamente significativos do coeficiente de endogamia (FIS), com correção de Bonferroni, ($P < 0,006$). D) Tabela com os resultados dos SNPs avaliados. Número amostral (N); heterozigiosidade observada (Ho), heterozigiosidade esperada (He), índice de endogamia (FIS).

Os indivíduos do Ano 1 foram obtidos e inicialmente analisados no projeto Funbio contrato nº 81/2016



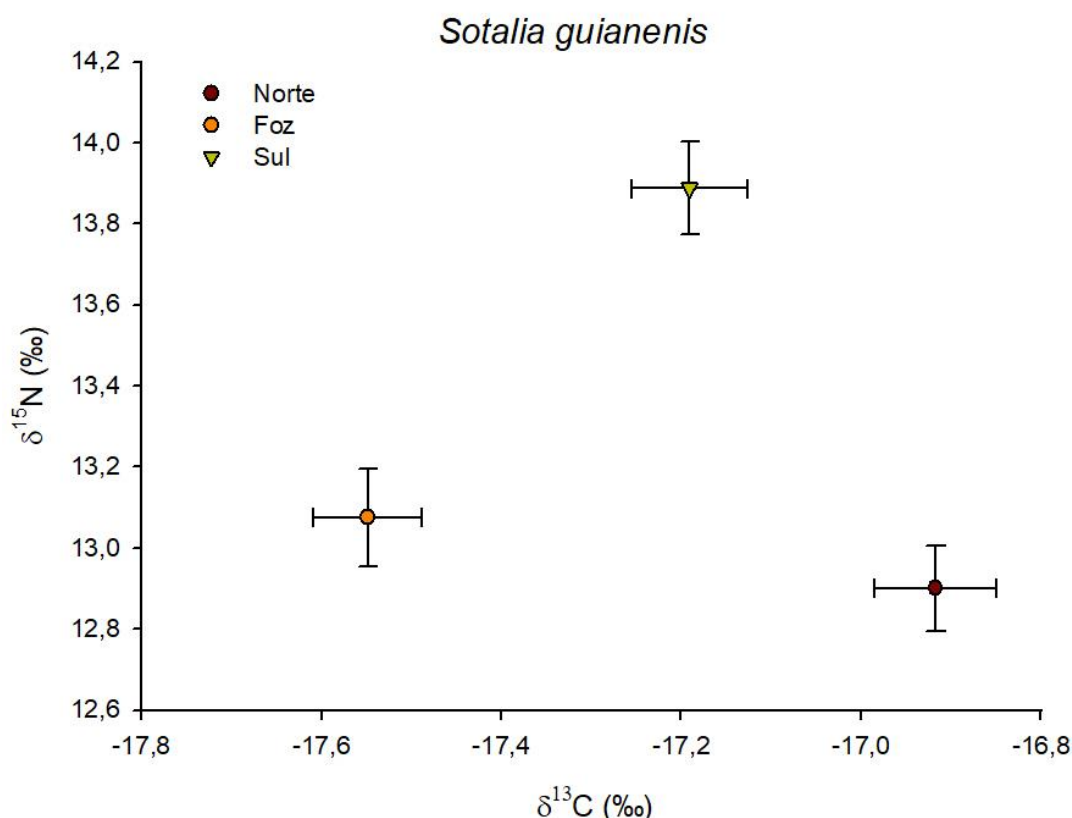
Para os **marcadores microssatélites do DNA nuclear**, foram considerados os indivíduos que apresentaram alelos para no mínimo quatro locos microssatélites (N=86) dos períodos Pré-rompimento e Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024). Três amostras da região do Extremo Sul foram excluídas das análises, visto que essa região não é conhecida como uma região de ocorrência das toninhas. Os indivíduos do Ano 1 foram obtidos e inicialmente analisados no projeto Funbio contrato nº 81/2016. Para o total de 86 indivíduos (Pré-rompimento, N=29; Pós-rompimento, N=57) com oito locos avaliados, foram excluídos dois locos (Pb 01 e Pb03), que se apresentaram monomórficos. Foi possível confirmar a presença de uma população no litoral do Espírito Santo, como evidenciado com o uso de marcadores mitocondriais, não sendo identificada diferenciação espacial e nem temporal. Para as análises de diversidade, os índices foram baixos (heterozigiosidade observada média= 0,478; heterozigiosidade esperada média= 0,592; Riqueza alélica média=5,753; Número de alelos médio=6,0). Valores do teste de Wilcoxon para eventos passados de gargalo populacional baseado em frequências alélicas revelaram que a população de toninhas do litoral do estado do Espírito Santo passou por evento de gargalo (redução recente) com base no modelo mutacional SMM ($P = 0,0396$), $P < 0,05$.

Para os **SNPs do DNA nuclear**, foram analisadas nove amostras com a biblioteca 2bRAD. O número de *reads* brutos variaram de 368.836 para 531.352 por amostra. Após as filtrações, os *reads* foram padronizados para 27pb e o número total de *reads* mantidos variou de 101.274 para 141.473 por amostra. O conjunto de dados final, após a prospecção de SNPs, resultou em 1.556 SNPs com porcentagem de *missing data* estimada em 6,67%. Nas análises de F_{ST} par-a-par e AMOVA, não foi verificada diferenciação populacional significativa espacial entre Setor Norte (N=6) e Setor Foz (N=3) e temporal entre Pré-rompimento (N=3) e Pós-rompimento (N=6). Portanto, também foi considerada uma única população. Foram encontrados níveis baixos a moderados de heterozigiosidade genômica (Ho=0,129; He=0,191). O acréscimo de novos indivíduos nas análises poderá refinar os valores encontrados.

3.8 RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI*

3.8.1 Boto-cinza (*Sotalia guianensis*)

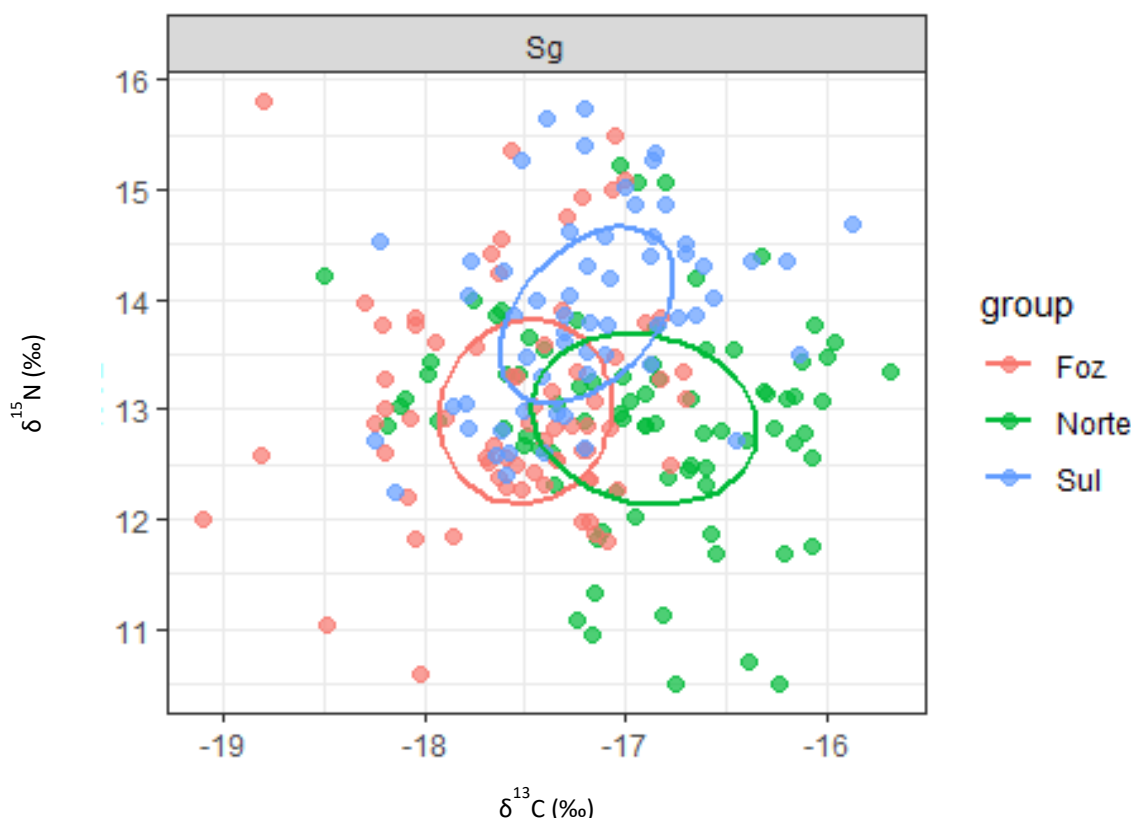
Figura 57: Média e erro padrão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em botos-cinza (*Sotalia guianensis*- Sg) coletados ao longo da costa do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), agrupados em três regiões amostrais (Norte, Foz e Sul). *Norte se refere a antiga região 1 (São Mateus), Foz referem-se as regiões 2, 3 e 4 (Rio Doce, Barra do Riacho e Metropolitana) e Sul refere-se a região 5 (Extremo Sul)



Foram usados nas análises dos dados apenas os resultados dos indivíduos adultos e juvenis, com base na maturação sexual e idade dentária, excluindo-se os filhotes, resultando em 229 espécimes de boto-cinza (18 indivíduos foram coletados no período Pré-rompimento). Os resultados apresentados no gráfico mostram a separação em possíveis grupos ecológicos distintos do boto-cinza coletados entre os anos um e seis de monitoramento. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ no boto-cinza foram distintos entre as três regiões (ANOVA, $p < 0,05$). O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ foi menor na região da Foz (2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana) e maior na região Norte (1=São Mateus) (teste HSD para n desiguais, $p < 0,02$). Já o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ foi maior na região sul (5=Extremo Sul) em relação as demais regiões ($p < 0,00003$). Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das presas nas regiões Norte e da Foz também apontam que os botos-cinza dessas duas regiões tem área de forrageio distinta. Os botos-cinza da região Norte (1=São Mateus) apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ associados as presas coletadas na região do Rio São Mateus e Rio Ipiranga, enquanto que os indivíduos da região da Foz

(2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana) se alimentam na área sob influência do Rio Doce. Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ apontam para ecologia alimentar e/ou área de forrageamento distintos para o boto-cinza na costa do Espírito Santo, e é possível que essa separação esteja associada, pelo menos em parte da distribuição, a desembocadura e/ou entorno dos rios, com certa fidelidade de sítio dos indivíduos.

Figura 58: Área da elipse isotópica padrão corrigida para amostras pequenas (SEAc) dos botos-cinza coletados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) em cada região amostral da costa do Espírito Santo (Norte, Foz e Sul). Norte se refere a antiga região 1 (São Mateus), Foz referem-se as regiões 2, 3 e 4 (Rio Doce, Barra do Riacho e Metropolitana) e Sul refere-se a região 5 (Extremo Sul)



O nicho isotópico dos animais de cada região, estimado pela SEAc (área da elipse padrão corrigida, utilizando-se 40% dos dados) foi de $1,8 \text{ ‰}^2$ para a Região Norte (1=São Mateus); $1,6 \text{ ‰}^2$ para a região Foz (2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana) e $1,3 \text{ ‰}^2$ para a Região Sul (5=Extremo Sul). Com o acréscimo de novos indivíduos ao n amostral total, observou-se que os indivíduos da região amostral Norte ocupam o maior nicho ecológico dentre todos os grupos analisados. Houve sobreposição de nicho isotópico entre todas as regiões sendo a maior encontrada entre os animais das Foz (2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana) e Sul (5=Extremo Sul) (23% de sobreposição), seguindo entre os espécimes das regiões Norte e Foz (18%). Os animais da região Sul (5=Extremo Sul) apresentaram menor sobreposição de nicho isotópico em relação aos animais da região Norte (1=São Mateus) (15%) apontando distinção no uso do habitat da espécie entre essas regiões. Os resultados evidenciam possíveis grupos ecológicos distintos na área de estudo, mas com compartilhamento parcial na área de forrageio e/ou das espécies de presas que se alimentam. O

monitoramento contínuo e o aumento do número de amostras têm possibilitado o entendimento cada vez mais preciso acerca de como esses animais utilizam a costa do estado do Espírito Santo para forrageio, e a continuidade do estudo é necessário para conhecer o grau de conectividade, isolamento e fidelidade de sítio em cada região.

Quadro 22: Valores médio \pm desvio padrão de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ nos botos-cinza coletados ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6) em cada região amostral ao longo da costa do Espírito Santo (Norte, Foz e Sul) e também para os animais coletados antes do rompimento da barragem. *Norte se refere a antiga região 1 (São Mateus), Foz referem-se as regiões 2, 3 e 4 (Rio Doce, Barra do Riacho e Metropolitana) e Sul refere-se a região 5 (Extremo Sul)

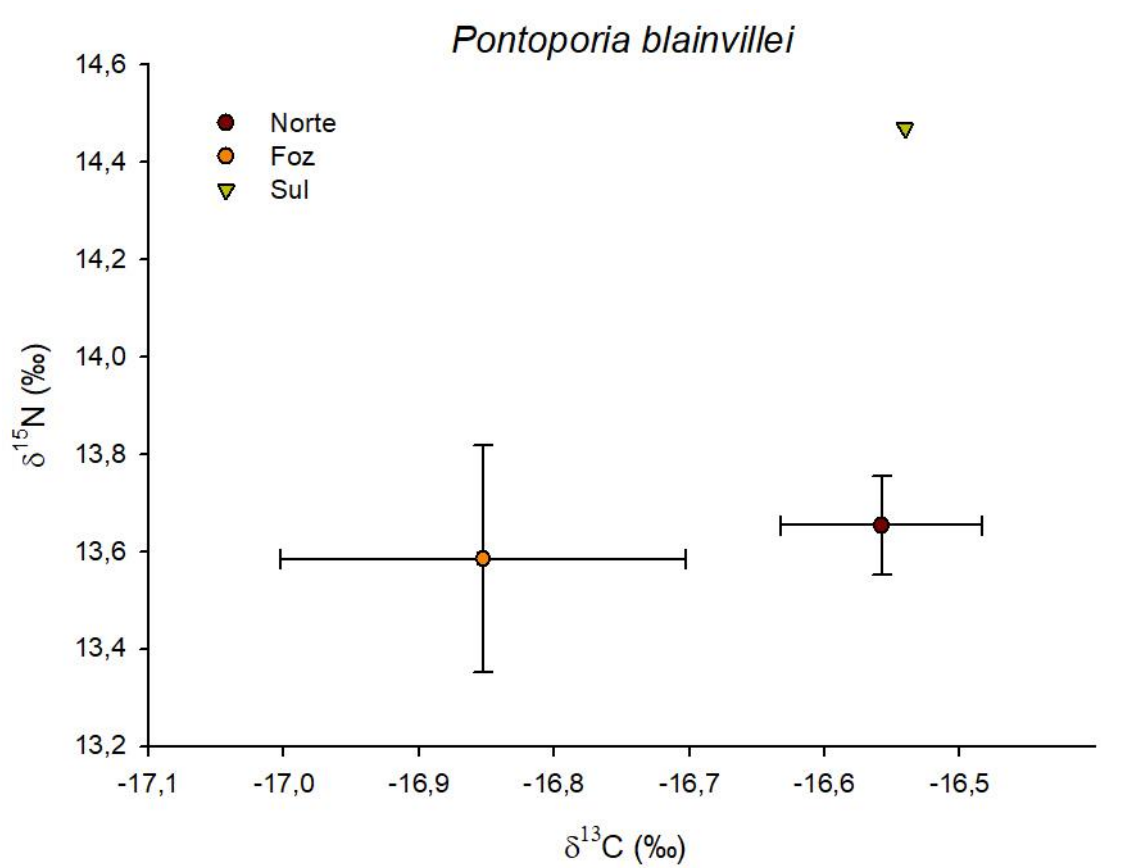
	Pré-Rompimento			ANO 1			ANO 2			ANO 3			ANO 4			ANO 5			ANO 6		
	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Região Norte	1	-17,2	12,5	23	-17,1 \pm 0,7	12,6 \pm 1,1	11	-16,6 \pm 0,6	13,1 \pm 0,7	19	-16,8 \pm 0,6	13,0 \pm 1,1	14	-17,1 \pm 0,5	13,1 \pm 0,6	6	-17,1 \pm 0,4	13,5 \pm 1	8	-16,8 \pm 0,4	12,7 \pm 0,8
Região Foz	8	-17,1 \pm 0,3	13,2 \pm 1,0	10	-17,7 \pm 0,7	12,7 \pm 0,9	18	-17,4 \pm 0,5	13,1 \pm 1,1	15	-17,2 \pm 0,3	13,0 \pm 1,0	15	-17,6 \pm 0,4	13,1 \pm 1,0	8	-17,9 \pm 0,5	13,5 \pm 1,0	5	-18 \pm 0,2	13,1 \pm 1,1
Região Sul	9	-17,0 \pm 0,3	13,8 \pm 0,7	7	-17,1 \pm 0,4	13,8 \pm 0,7	8	-17,1 \pm 0,4	14,1 \pm 1,0	8	-16,4 \pm 0,3	14,3 \pm 1,0	11	-17,2 \pm 0,3	13,8 \pm 1,0	17	-17,5 \pm 0,4	13,7 \pm 1,0	8	-17,5 \pm 0,4	13,8 \pm 0,5
Total	18	-17,1 \pm 0,3	13,4 \pm 1,0	40	-17,3 \pm 0,7	12,8 \pm 1,1	37	-17 \pm 0,6	13,3 \pm 1,0	42	-16,8 \pm 0,6	13,2 \pm 1,1	40	-17,3 \pm 0,5	13,3 \pm 0,9	31	-17,5 \pm 0,5	13,7 \pm 1,0	21	-17,4 \pm 0,6	13,2 \pm 0,9

Na análise temporal, considerando todas as regiões juntas, foi observada variação significativa no valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ entre os anos. Os espécimes coletados no Ano 3 apresentaram valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ menor em relação a Ano 1 (teste HSD para n desiguais, $p=0,008$), Ano 4 ($p=0,001$), Ano 5 ($p=0,00004$) e Ano 6 ($p=0,038$). Essa diferença entre os anos de coleta pode estar associada a variação encontrada nos resultados dos indivíduos coletados na região Sul (5= Extremo Sul), conforme detalhado a seguir. Para $\delta^{15}\text{N}$ foi encontrada variação apenas entre o Ano 1 ($12,8 \pm 1,1\%$) e Ano 5 ($13,6 \pm 1\%$; $p=0,02$). Considerando a análise temporal por região, não foi encontrada variação nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ entre os seis anos de monitoramento na região Norte (1= São Mateus)

(ANOVA, $p > 0,05$). Já a região Foz (2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana) apresentou menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ no Ano 3 ($-17,2 \pm 0,3\text{‰}$) em relação ao Ano 5 ($-17,9 \pm 0,5\text{‰}$; Teste HSD para n desiguais, $p = 0,02$) e a região Sul (5= Extremo Sul) apresentou um menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ no Ano 3 ($-16,4 \pm 0,3\text{‰}$) em relação aos demais anos de monitoramento e ao Pré-monitoramento ($p < 0,01$). Para a toninha não foi possível a comparação entre os anos devido ao baixo n amostral.

3.8.2 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

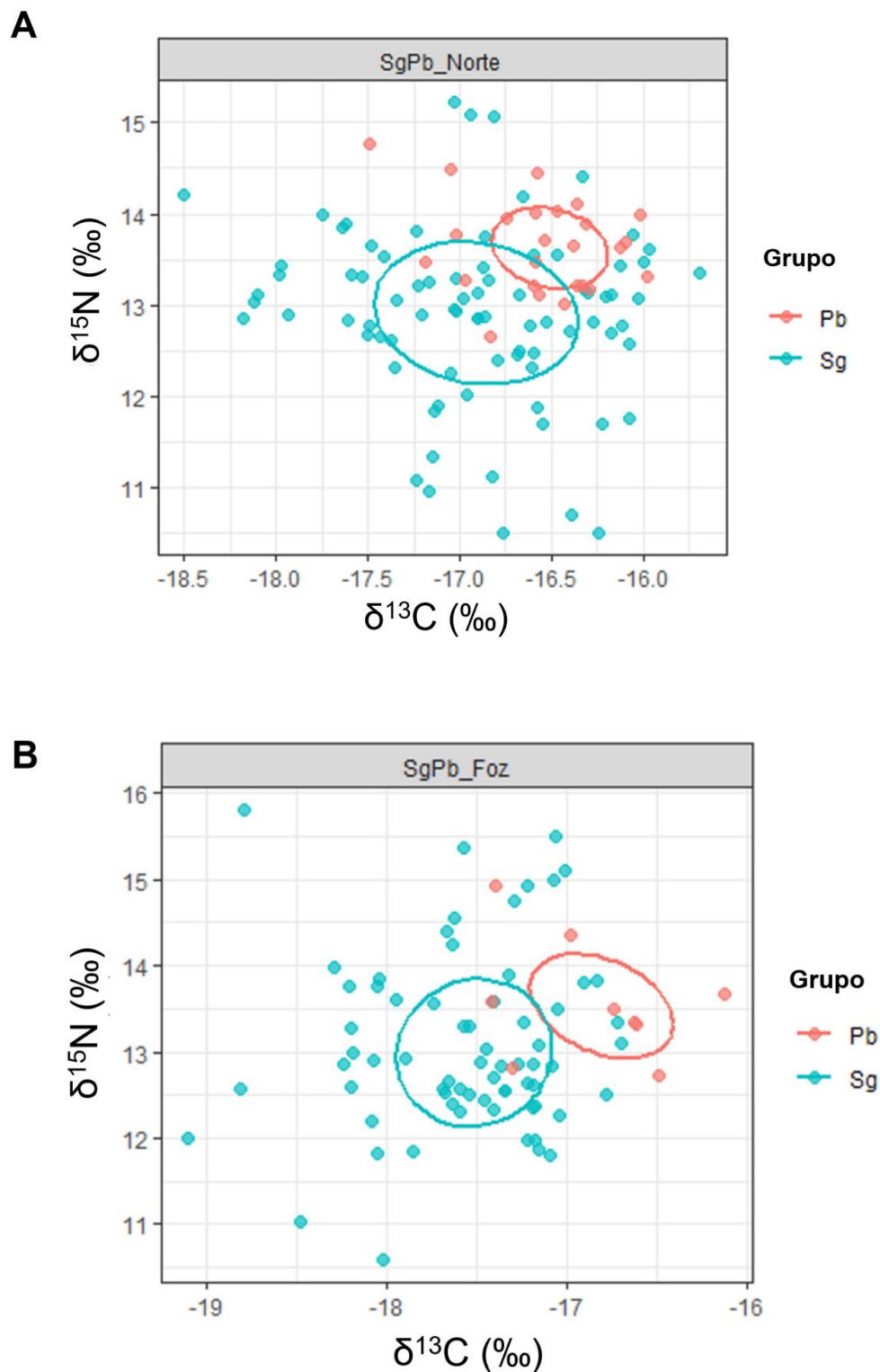
Figura 59: Média e erro padrão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em toninhas (*Pontoporia blainvillei*- Pb) coletados ao longo da costa do Espírito Santo ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 – obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6), agrupados em três regiões amostrais (Norte, Foz e Sul). *Norte se refere a antiga região 1 (São Mateus), Foz referem-se as regiões 2, 3 e 4 (Rio Doce, Barra do Riacho e Metropolitana) e Sul refere-se a região 5 (Extremo Sul).



Foram usados nas análises dos dados apenas os resultados dos indivíduos adultos e juvenis, com base na maturação sexual e idade dentária, excluindo-se os filhotes, resultando em 35 de toninhas. Porém, foram analisados nove indivíduos (apenas três indivíduos entre os Anos 2 e 6) na região Foz (2=Rio Doce e 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana), e apenas um na região Sul (5=Extremo Sul), o que limita a análise para a espécie.

3.8.3 Comparação da razão isotópica de C e N em amostras de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*

Figura 60: Área da elipse isotópica padrão corrigida para amostras pequenas (SEAc) dos botos-cinza (Sg) e das toninhas (Pb) coletados na Região 1 (Norte) (A) e na região 2, 3 e 4 (Foz) (B) ao longo de todo PMBA/Fest (Ano 1 – obtidos no projeto Funbio contrato nº 81/2016, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6)



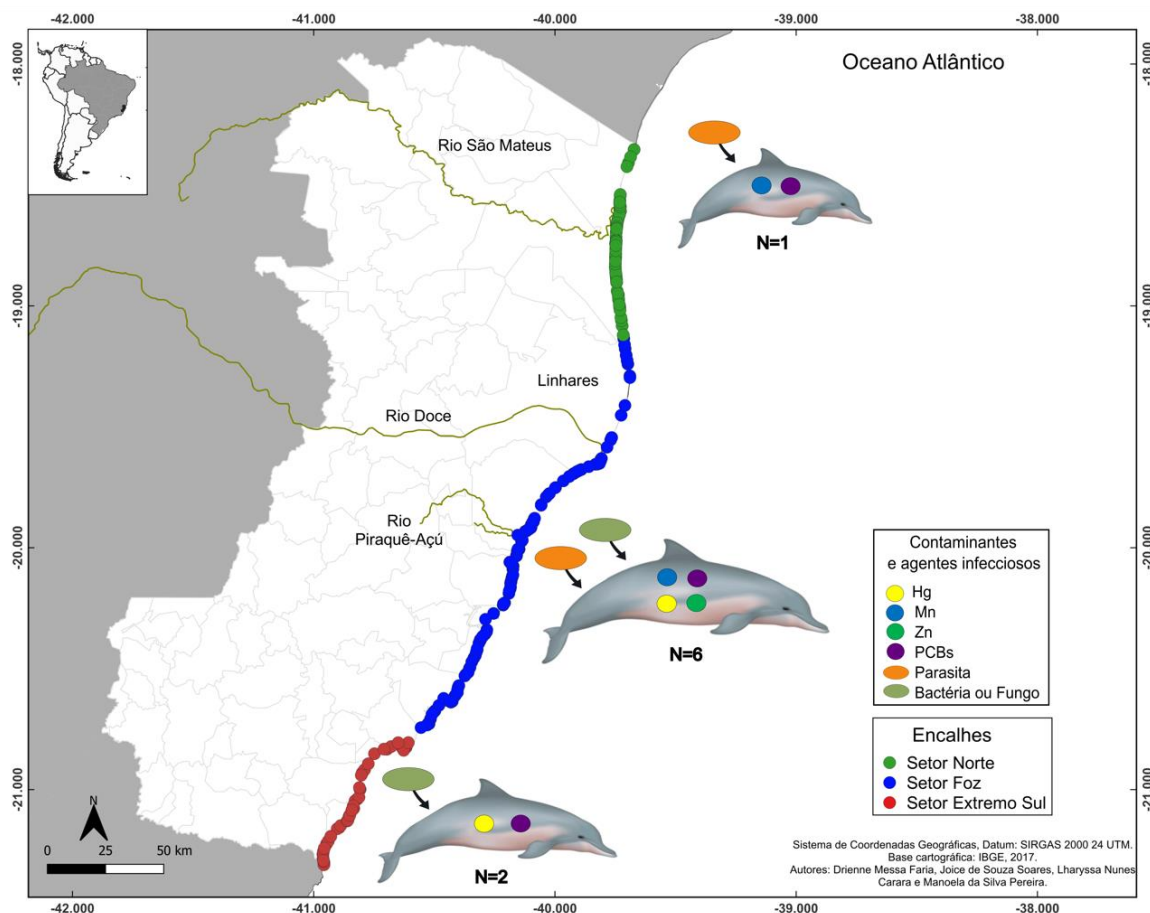
A comparação do nicho isotópico entre o boto-cinza (Sg) e a toninha (Pb) foi feita para as regiões Norte e Foz, devido ao baixo n amostral das toninhas na região Sul (n=1). As espécies apresentaram nicho isotópico distinto, com baixa sobreposição, sendo 9% na região Norte e 6% na região da Foz. Esse resultado evidencia segregação trófica entre o boto-cinza e a toninha em ambas as regiões. O boto-cinza apresentou uma maior amplitude e largura de nicho isotópico ($SEAc = 1,79\text{‰}^2$ na região Norte e $1,67\text{‰}^2$ na Foz), enquanto a toninha teve área de nicho isotópico reduzido ($SEAc = 0,66\text{‰}^2$ na região Norte e $1,06\text{‰}^2$ na Foz), sugerindo uma ecologia alimentar mais especialista para a toninha.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO

Ao longo dos cinco anos do PMBA-Fest e incluindo a amostragem do Ano 6 (até janeiro de 2024) e todas as regiões da costa do ES (Norte, Foz e Sul) observou-se impactos a nível individual e populacional para os botos-cinza (*Sotalia guianensis*) e as toninhas (*Pontoporia blainvillei*). Estes impactos incluem alterações nas concentrações de contaminantes nos tecidos de indivíduos acima de limites estabelecidos na literatura, consequentemente, comprometimento no sistema imunológico causando morte dos animais devido processos infecciosos.

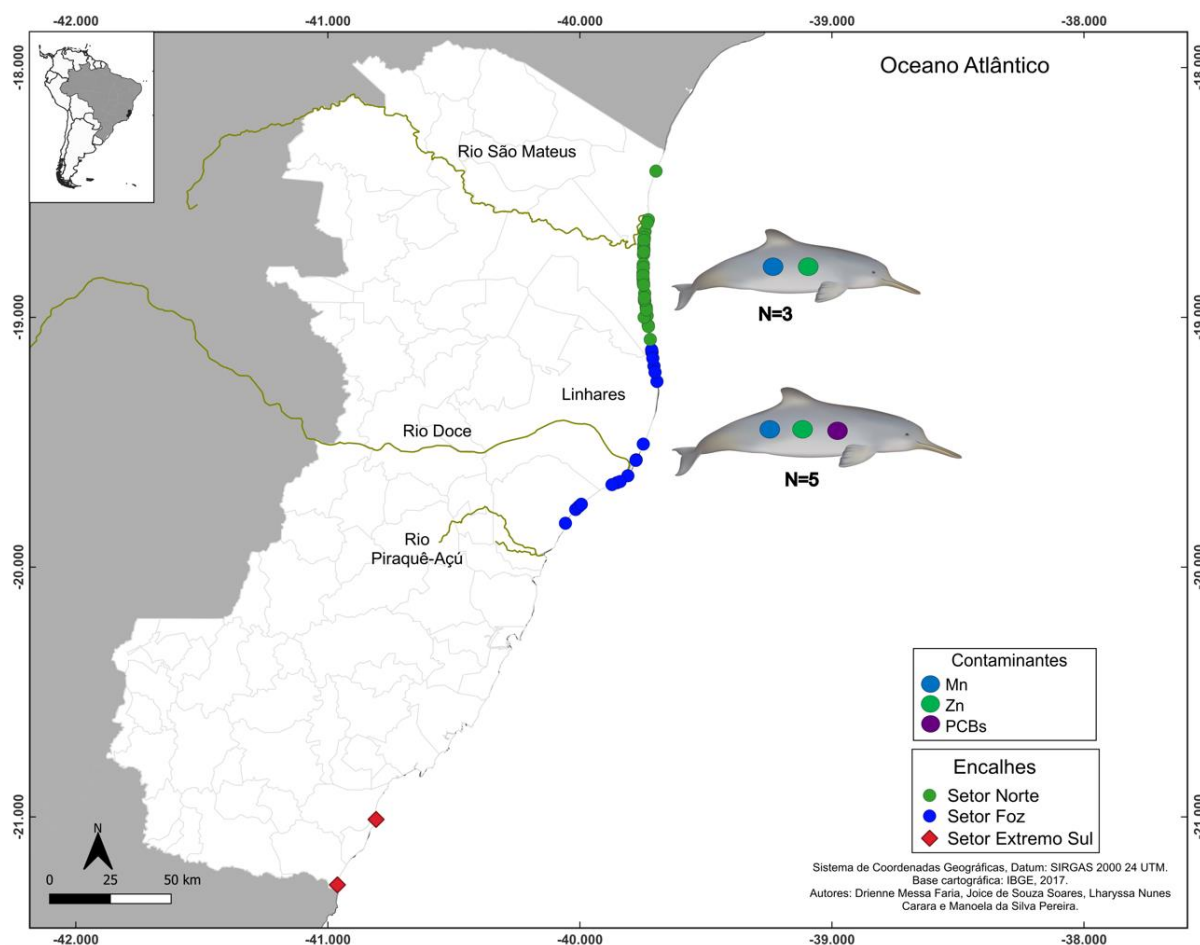
Para os botos-cinza, 28 indivíduos se destacaram apresentando concentrações elevadas de contaminantes imunotóxicos (ex: Hg e PCBs) e causa da morte por processos infecciosos e embasamento através de resultados dos exames histopatológicos. Na Figura 62 demonstramos nove indivíduos para os quais esses aspectos foram integrados.

Figura 61: Exemplos de nove indivíduos de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) que apresentaram concentrações elevadas de contaminantes nos tecidos avaliados e tiveram a causa da morte diagnosticada devido a processos infecciosos, além da identificação de parasitas. Mapa com a localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) indicados por círculos coloridos de verde para o Setor Norte, azul para o Setor Foz e vermelho para o Setor Extremo Sul. O tamanho da imagem do golfinho é proporcional ao número de indivíduos avaliados (n). Autor das imagens do golfinho: Uko Gorter



Para as toninhas, destacam-se oito indivíduos com elevadas concentrações de contaminantes (Zn, Mn e PCBs) para as regiões de São Mateus e Rio Doce, criticamente impactadas, conforme exemplificado na Figura 62.

Figura 62: Exemplos de oito indivíduos de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) que apresentaram concentrações elevadas de contaminantes nos tecidos avaliados. Mapa com a localização geográfica dos indivíduos coletados no período Pós-rompimento (Ano 1, Ano 2, Ano 3, Ano 4, Ano 5 e Ano 6 até janeiro de 2024) indicados por círculos coloridos de verde para o Setor Norte, azul para o Setor Foz e losangos coloridos de vermelho para o Setor Extremo Su. Três amostras da região do Extremo Sul foram excluídas das análises, visto que essa região não é conhecida como uma região de ocorrência das toninhas. Os indivíduos do Ano 1 foram obtidos e inicialmente analisados no projeto Funbio contrato nº 81/2016. O tamanho da imagem do golfinho é proporcional ao número de indivíduos avaliados (n). Autor das imagens do golfinho: Uko Gorter



Desta forma, relacionando as concentrações de contaminantes observadas nos cetáceos da costa do ES com os indicadores de encalhe e de saúde, podemos observar que indivíduos com altas concentrações de contaminantes apresentam muitas vezes lesões macroscópicas e histológicas, com processos infecciosos que evidenciam mal funcionamento dos órgãos e, consequentemente dos sistemas. Tais disfunções podem causar debilidade, baixa na imunidade, aumentar a chance de infecção por microrganismos oportunistas e também tornar os animais mais lentos no forrageio, alimentação e desvio de aparatos de pesca ou embarcações.

Os impactos a nível populacional incluem diminuição da diversidade genética mitocondrial para os botos-cinza ao longo dos anos, com intensificação após a chegada do rejeito de minério, sugerindo uma relação causal com a chegada do rejeito no ambiente marinho. Esta relação é corroborada com dados de menor diversidade nas regiões mais impactadas pelo rejeito de mineração, que são os Setores Foz e Norte, principalmente no período Pós-rompimento da barragem. Para as toninhas foram encontrados baixos valores de diversidade mitocondrial e nuclear, alto índice de endogamia (indivíduos aparentados) que levam a homogeneização populacional, e evidências de que a população passou por um evento de gargalo (diminuição demográfica recente). A baixa diversidade genética desses cetáceos, espécies já consideradas ameaçadas de extinção, aumenta sua vulnerabilidade e pode resultar em dificuldades na manutenção de suas populações na região. Por serem espécies de vida longa, há necessidade dessa avaliação genética por períodos maiores, a fim de se acompanhar a tendência dos índices encontrados até o momento.

5 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todos os itens previstos foram cumpridos para o Tema.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADES, R.; GUABIROBA, H.C.; HORA, M.S.C.; MARTINS, R.F.; RODRIGUES V.L.A.; VILAR, C.C.; GIARRIZZO, T.; JOYEUX, J.C. Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the world's largest mining dam disasters. **Mar. Pollut. Bull.** 154, 111073. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111073>, 2020.

ANDREWS, K.R.; KARCZMARSKI, L.; AU, W.W.L.; RICKARDS, S.H.; VANDERLIP, C.A.; TOONEN, R.J. Patterns of genetic diversity of the Hawaiian spinner dolphin (*Stenella longirostris*). **Atoll Res Bull.** 543: 65–73, 2006.

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.; OLIVEIRA, A. M.; VIANA, S.C.; VAN SLUYS, M. 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, 2007.

AZEVEDO-SILVA, C.E; AZEREDO, A.; DIAS, A.C.L.; COSTA, P.; LAILSON-BRITO, J.; MALM, O.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 294–298, 1 fev, 2009.

BANDELT, H.J.; FOSTER, P.; ROHL, A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p 37-48, 1999.

BARROS, I.P. 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, 2014.

BASTOS, W.R; MALM, O; PLEIFFER, W.C; CLEARY, D. 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.

BEZAMAT, C.; WEDEKIN, L.L.; & SIMÕES-LOPES, P.C. Potential ship strikes and density of humpback whales in the Abrolhos Bank breeding ground, Brazil. Aquatic Conservation: **Marine and Freshwater Ecosystems**, 25(5), 712-725. <https://doi.org/10.1002/aqc.2523>, 2015.

BOWLES, D. An overview of the concentrations and effects of metals in cetacean species. **J. Cetacean Res. Manage.**, 125-148, 1999.

BUCHANAN, F.C.; FRIESEN, M.K.; LITTLEJOHN, R.P.; AND CLAYTON, J.W. Microsatellites from the beluga whale *Delphinapterus leucas*. **Mol. Ecol.** 5, 571–575. doi: 10.1046/j.1365-294x.1996.00109, 1996.

BUCKLAND, S.T.; ANDERSON, D.R.; BURNHAM, K.P.; LAAKE, J.L.; BORCHERS, D.L. & THOMAS, L. Introduction to distance sampling. **Oxford university. Press, oxford**, 2001.

CATCHEN, J.M; AMORES, A.; HOHENLOHE, P.; CRESKO, W.; POSTLETHWAIT, J.H. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes| genomes| genetics**, v. 1, n. 3, p. 171-182, 2011.

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 yearsold women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations amongPCBs, 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. 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, 2012.

DAURA-JORGE, F.G.; WEDEKIN L.L.; PIACENTINI, V.Q.; SIMÕES-LOPES, P.C. Seasonal and Daily Patterns Of Group Size, Cohesion And Activity Of The Estuarine Dolphin, *Sotalia guianensis* (P.J. Van Béneden) (Cetacea, Delphinidae), In Southern Brazil. **Revista Brasileira De Zoologia** 22:1014-1021, 2005.

DESFORGES, J.P.; HALL, A.; MCCONNELL, B.; ROSING-ASVID, A.; BARBER, J.L.; BROWNLOW, A.; DE GUISE, S.; EULAERS, I.; JEPSON, P.D.; LETCHER, R.J.; LEVIN, M.; ROSS, P.S.; SAMARRA, F.; VÍKINGSON, G.; SONNE, C.; DIETZ, R. Predicting Global Killer Whale Population Collapse from PCB Pollution. **Science**, 361, 1373–1376, 2018.

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

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

DI BENEDITTO, A.P.M.; RAMOS, R.M.A. Biology and conservation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the north of Rio de Janeiro State. Brazil. **J. Cetacean Res. Manage.** 3, 185–192, 2001.

DO AMARAL, K.B.; DANILEWICZ, D.; ZERBINI, A.; DI BENEDITTO, A.P.; ANDRIOLO, A.; ALVARES, D.J.; SECCHI, E.; FERREIRA, E.; SUCUNZA, F.; BORGES-MARTINS, M.; SANTOS, M.C.O.; CREMER, M.; DENUNCIO, P.; OTT, P.H.; MORENO, I. B. Reassessment of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) distribution and niche characteristics in Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 508, 1–12, 2018.

DORNELES, P.R.; BRITO, J.L.; SECCHI, E.R.; BASSOI, M.; LOZINSKY, C.P.C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. 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. Bayesian inference in ecology. **Ecology Letter** 7:509–520. Environmental Protection Agency (EPA), 2004.

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 acidental de golfinhos no extremo norte do litoral do Espírito Santo. 54 p. **Dissertação de monografia em Ciências Biológicas Bacharel, Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES**. 2011.

FETTUCCIA, D. C.; DA SILVA, V. M. F.; SIMÕES-LOPES, P. C. Osteological alterations in the tucuxi *Sotalia fluviatilis* (cetacea, delphinidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 103, n. 3, p. 255-259, 2013.

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

GERACI, J.R.; LOUNSBURY, V.J. Marine mammals ashore: a field guide for strandings. **National Aquarium in Baltimore**, 2005.

GHISOLFI, R.D.; DA SILVA, M.P.; DOS SANTOS, F.T.; SERVINO, R.N.; CIRANO, M.; THOMPSON, F.L. Physical forcing mechanisms controlling the variability of chlorophyll-a over the Royal-Charlotte and Abrolhos Banks—Eastern Brazilian Shelf. **PloS one**, 10(2), e0117082. <https://doi.org/10.1371/journal.p.2015>, 2015.

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

GOMES, L.E. DE O.; CORREA, L.B.; SÁ, F.; NETO, R.R.; BERNARDINO, A.F. The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** 120, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>, 2017.

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.

GULLAND, F.M.D.; LOWENSTINE, L.J.; Y SPRAKER, T.R. Noninfectious Diseases. In Referencias 709 CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Gutierrez, J., Issacson, R.S., y Koppel, B.S. 2010. Subacute sclerosing panencephalitis: an update. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 52, 10: 901-7, 2001.

HALL, A.J.; KALANTZI, O.I.; THOMAS, G.O. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in grey seals during their first year of life - are they thyroid hormone endocrine disrupters? **Environ. Pollut.** (Amsterdam, Neth.) 126, 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00149-0), 2003.

HALL, A.J.; MCCONNELL, B.J.; ROWLES, T.K.; AGUILAR, A.; BORRELL, A.; SCHWACKE, L.; REIJNDERS, P.J.H.; WELLS, R.S. Individual-Based Model Framework to Assess Population Consequences of Polychlorinated Biphenyl Exposure in Bottlenose Dolphins. **Environ. Health Perspect.** V. 114, p. 60–64, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Stadistic software package for education and analysis. **Paleontologia Electronica**, 4(1), 9 pp, 2001.

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

293, 1985.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos: Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste. **Brasília: MMA/IBAMA**. 298 p. one.0117082, 2005.

INMET, 2024. <https://tempo.inmet.gov.br/PrecAcumulada>. Acessado em 30 de março de 2024.

JABER, J.R.; PEREZ, J.; ARBELO, M.; ANDRADA, M.; HIDALGO, M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; VAN DEN INGH, T.; FERNANDEZ, A. Hepatic lesions in cetaceans stranded in the Canary Islands. **Veterinary Pathology**, 41, 2: 147-53, 2004.

JEFFERSON, T.A; WEBBER, M.A.; PITMAN, R.L. Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. **Elsevier**, 2011.

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.

KANNAN, K.; BLANKENSHIP, A.L.; JONES, P.D.; GIESY, J.P. Toxicity Reference Values for the Toxic Effects of Polychlorinated Biphenyls to Aquatic Mammals. **Hum. Ecol. Risk Assess.** V. 6, p.181–201, 2000.

KERSHAW, J.L.; HALL, A.J. Mercury in cetaceans: exposure, bioaccumulation and toxicity. **Sci. Total Environ.** 694 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133683>, 2019.

KUIKEN, T.; GARCÍA-HARTMANN, M. Dissection techniques and tissues sampling. In **1st European Cetacean Society Workshop on Cetacean Pathology** (Vol. 17). Leiden., 1991.

KUNITO, T.; NAKAMURA, S.; IKEMOTO, T.; ANAN, Y.; KUBOTA, R.; TANABE, S.; ROSAS, F.C.W.; FILLMANN, G.; READMAN, J.W. Concentration and subcellular distribution of trace elements in liver of small cetaceans incidentally caught along the brazilian coast. **Mar. Pollut. Bull.** 49, 574–587. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.03.009>, 2004.

LAETA, M.; SOUZA, S.M.F.M.; SICILIANO, S. Anomalias ósseas congênitas em *Sotalia guianensis* (Van Bénédén, 1864) (Mammalia, Cetacea, Delphinidae) da costa centro-norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(6): 484-490, 2010.

LAILSON-BRITO, J.; DORNELES, P.R.; AZEVEDO-SILVA, C.E.; AZEVEDO, A.F.; VIDAL, L.G.; ZANELATTO, R.C.; LOZINSKI, C.P.C.; AZEREDO, A.; FRAGOSO, A.B.L.; CUNHA, H.A.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. High Organochlorine Accumulation in Blubber of Guiana Dolphin, *Sotalia guianensis*, from Brazilian Coast and Its Use to Establish Geographical Differences among Populations. **Environ. Pollut.** V., 158, p. 1800– 1808, 2010.

LAILSON-BRITO, J.L; CRUZ, R.; DORNELES, P.R; ANDRADE, L.; AZEVEDO, A.F.; FRAGOSO, A.B.;

VIDAL, L.G.; COSTA, M.B.; BISI, T.L.; ALMEIDA, R.; CARVALHO, D.P.; BASTOS, W.R.; MALM, O. 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.

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.

LONGHINI, C.M.; RODRIGUES, S.K.; COSTA, E.S.; DA SILVA, C.A.; CAGNIN, R.C.; GRIPP, M.; LEHRBACK, B.D.C.; MILL, G.N.; DE OLIVEIRA, E.M.C.; HERMOGENES, C.DEC.M.; RODRIGUES, D. G.F.; DAVID, A.M.; GRAMLICH, K.C.; BISI JÚNIOR, R.DAC.; GOMES, A.A.P.; DA SILVA FILHO, J.P.; ALMEIDA, J.F.; DE SOUZA, K.F.; LUZ JUNIOR, W.A.R.; SÁ, F. Environmental quality assessment in a marine coastal area impacted by mining tailing using a geochemical multi-index and physical approach. **Science of the Total Environment**, 803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149883>, 2022.

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.

MANHÃES, B.M.R.; VANNUCI-SILVA, M.; BRÍAO, J.; GUARI, E.B.; BOTTA, S.; COLOSIO, A.; RAMOS, H.G.C.; BARBOSA, L.A.; BISI, T.L.; AZEVEDO, A.F.; CUNHA, H.A.; LAILSON-BRITO, J. Temporal-trends of elements bioaccumulation by a threatened of extinction cetacean (*Pontoporia blainvillei*) before and after one of the largest mining disasters worldwide. **Sci. Total Environ.** 804, 150196 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150196>, 2022.

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

MARTINEAU, D.; LEMBERGER, K.; DALLAIRE, P.A.; LIPSCOMB, T.P.; MICHEL, P.; MIKAELIAN, I. Cancer in Wildlife, a case study: Beluga in St Lawrence Estuary, Québec, Canada. **Environmental Health Perspectives**, 110(3), 285–295, 2002.

MAYORGA, L.F.S.P.; VANSTREELS, R.E.T.; BHERING, R.C.C.; MAMEDE, N.; COSTA, L. M. B.; PINHEIRO, F.C.F.; REIS, L.W.D.; TRAZZI, A.; MEIRELLES, W.L.C.M.; RIBEIRO, A.M.; SICILIANO, S. Strandings of cetacean son the Espírito Santo coast, southeast Brazil, 1975–2015. **ZooKeys** 948: 129–152, 2020.

MCLELLAN, W.A.; ROMMEL, S.; MOORE, M.; PABST, D.A. Right whale necropsy protocol. **Final Report to NOAA Fisheries for contract**, (40AANF112525), 51., 2004.

MONTEIRO-NETO, C.; ITAVO, R.V.; MORAES, L.E.S. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceará, northeast Brazil. **Environmental Pollution**, v. 123, p.319–324, 2003.

OLIVEIRA-FERREIRA, N.; CARVALHO, R.R.; SANTOS-NETO, E.B.; MANHÃES, B.M.; GUARI, E.B.; DOMIT, C.; LAILSON-BRITO, J. Long-term consequences of high polychlorinated biphenyl exposure: projected decline of delphinid populations in a hotspot for chemical pollution. **Environmental Science & Technology**, 55(22), 15149-15161, 2021.

OLIVEIRA-FERREIRA, N.; MANHÃES, B.M.; SANTOS-NETO, E.B.; ROCHA, Y.; GUARI, E.B.; BOTTA, S.; LAILSON-BRITO, J. Franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, as environmental sentinels of the world's largest mining disaster: temporal trends for organohalogen compounds and their consequences for an endangered population. **Environmental Pollution**, 306, 119370, 2022.

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. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. **PLoS ONE** 5:e9672, 2010.

PERRIN, W.F.; DONOVAN, G. P. 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>.

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.

PICHLER, F.B.; ROBINEAU, D.; GOODALL, R.N.P.; MEYER, M.A.; OLIVARRIA, C.; BAKER, C.S. Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). **Mol Ecol.**; 10: 2215–2223. [https:// doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01360.x](https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01360.x) PMID: 11555263, 2001.

POST, D.M.; LAYMAN, C.A.; ARRINGTON, D.A.; TAKIMOTO, G.; QUATTROCHI, J.; MONTANA, C.G. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. **Oecologia** 152:179-189, 2007.

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

QGIS Development Team. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>, 2020.

QUEIROZ, H.M.; NÓBREGA, G.N.; FERREIRA, T.O.; ALMEIDA, L.S.; ROMERO, T.B.; SANTAELLA, S.T.; BERNARDINO, A.F.; OTERO, X.L. The Samarco mine tailing disaster: a possible time-bomb for heavy metals contamination? **Sci. Total Environ.** 637–638, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>, 2018.

RAMOS, R.M.A.; DI BENEDITTO, A.P.M.; LIMA, N.R.W. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. **Aquatic Mammals**, 26(1), 65-75, 2020.

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.

RAWSON, A.J.; PATTON, G.W.; HOFMANN, S.; PIETRA, G.G.; JOHNS, L. Liver abnormalities associated with chronic mercury accumulation in stranded atlantic bottlenosed dolphins. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 25 (1), 41-47, 1993.

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 reimplement of the Genepop software for indows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008.

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL: <http://www.rstudio.com/>, 2019.

SANTOS-NETO, E. B.; SILVA, C.E.A; BISI, T.L; SANTOS, J.; MEIRELLES, A.C.A; CARVALHO, V.L.; AZEVEDO, A.F.; GUIMARÃES, J.E; BRITO, J.L. 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.

Santos-Neto, E. B., et al. PAHs in franciscana dolphins from the Southwestern Atlantic Ocean: Concentration and maternal transfer assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 203 (2024): 116455.

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

SECCHI, E.R.; WANG, J.Y.; MURRAY, B.; ROCHA-CAMPOS, C.C.; WHITE, B.N. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. **Can. j. zool.**, v. 76, p. 1622-1627, 1998.

SEIXAS, T.G.; KEHRIG, H.DOA.; FILLMANN, G.; DI BENEDITTO, A.P.M.; SOUZA, C.M.M.; SECCHI, E.R.; MOREIRA, I.; MALM, O. Ecological and biological determinants of trace elements accumulation in liver and kidney of *Pontoporia blainvillei*. **Sci. Total Environ.** 385, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.045>, 2007.

SEIXAS, T.G.; KEHRIG, H.A.; DI BENEDITTO, A.P.M.; SOUZA, C.M.M.; MALM, O.; MOREIRA, I. Trace elements in different species of cetacean from Rio de Janeiro coast. **J. Braz. Chem. Soc.** 20, 243–251. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000200008>, 2009.

SHINOHARA, M.; DOMINGO-ROURA, X.; TAKENAKA, O. Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. **Mol. Ecol.** 6, 695–696. doi: 10.1046/j.1365-294x.1997.00231, 1997.

SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A.P.M.; RAMOS, R.M.A. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea. Pontoporiidae), nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. **Bol. Mus. Nac., Zool.**, v. 476, p. 1-15, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol.** Dec;30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24132122; PMCID: PMC3840312, 2013.

VANNUCI-SILVA, M.; MANHÃES, B.M.R.; GUARI, E.B.; BOTTA, S.; COLOSIO, A.C.; BARBOSA, L. A.; LAILSON-BRITO, J. Spatial trends of trace elements bioaccumulation in the most endangered dolphin from the Southwestern Atlantic Ocean: The franciscana (*Pontoporia blainvillei*). **Environmental Pollution**, 308, 119655, 2022.

VAN OOSTERHOUT, C.; WILLS, D.P.; HUTCHINSON, W.F.D.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VALSECCHI, E.; AMOS, W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. **Mol. Ecol.** 5, 151–156. doi: 10.1111/j.1365-294x.1996.tb0 0301, 1996.

VIDAL, L. G.; OLIVEIRA-FERREIRA, N.; TORRES, J.P.M.; AZEVEDO, A.F.; MEIRELLES, A.C.O.; FLACH, L.; ELJARRAT, E. Brominated flame retardants and natural organobrominated compounds in a vulnerable delphinid species along the Brazilian coast. **Science of The Total Environment**, 905, 167704, 2023.

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.

WAGEMANN, R.; MUIR, D.C.G. Concentrations of heavy metals and organochlorines in marine mammals of northern waters: overview and evaluation. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.** 1279, 1-91, 1984.

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

ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read mergeR. **Bioinformatics**. 2014 Mar 1;30(5):614-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593. PMID: 24142950; PMCID: PMC3933873, 2014.