

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

Material Suplementar Ambiente Marinho

Tema: Tartarugas

RT- 46/ JUN 24

RA2023 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2024

EQUIPE TÉCNICA

Sarah Maria Vargas
Marcelo Renan Santos

Camila Miguel

Sandra Ludwig

Sarah de Souza Alves Teodoro

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	2
2	METODOLOGIA	2
2.1	COLETA	2
2.2	ANÁLISES	6
2.2.1	Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas.....	6
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	8
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	11
3.1	DIVERSIDADE GENÉTICA.....	12
3.2	PARÂMETROS DE SAÚDE.....	18
3.3	METAIS PESADOS.....	20
3.4	DADOS REPRODUTIVOS.....	22
4	INTEGRAÇÃO COM OS RESULTADOS DA FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT).....	24
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	24
6	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	25
7	REFERÊNCIAS	26

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

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

Foram tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Os animais capturados foram identificados nas nadadeiras anteriores com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

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

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

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *C. mydas*: Foram realizadas 2 campanhas de captura de *Chelonia mydas* juvenis na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 2 campanhas no Recife de Coroa Vermelha – BA. Por ano foram capturados 90 indivíduos em cada área de alimentação, portanto foram 180 amostras de sangue para

as análises de saúde e para as análises genéticas. A captura de *C. mydas* juvenis foi por busca ativa ou com uso de rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento (SANTOS, 2005). A rede foi lançada a partir de um barco motorizado e fixada ao fundo com âncora a uma distância de 30 a 200 metros da praia. Após armada, a rede foi monitorada continuamente para evitar lesões nos animais que forem capturados. O tempo de esforço foi de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

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

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

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

O número total de amostras obtidas de cada matriz biológica pode variar de acordo com as condições meteorológicas, populacionais e biológicas que influenciam no sucesso de captura e no número de desovas no período reprodutivo, não sendo possível garantir o número máximo previsto no plano de trabalho. No entanto, através de análises estatísticas é possível estimar qual o número amostral satisfatório, baseando-se na premissa de que a amostra deve ter precisão/poder suficiente para fazermos inferências válidas nas análises que estamos realizando e para detectar diferenças ou efeitos quando estes estiverem presentes. Para calcular o número amostral apropriado de *Chelonia mydas*, utilizou-se dados prévios coletados em Coroa Vermelha. No qual a média e o desvio padrão para a contagem de eritrócitos foi de: 3,6 e 0,6 milhão/mm³, respectivamente, sendo o $d = 0,18$, ou seja 5% do valor médio e $1 - \alpha = 95\%$.

$$\eta_0 = \frac{(0,6)^2}{(0,18)^2} \times (1,96)^2 = 43$$

Então $gl = 42$, $\tau_{1-\alpha/2, gl} = \tau_{0,975;42} = 2,021$ e

$$\eta_1 = \frac{(0,6)^2}{(0,18)^2} \times (2,021)^2 = 45$$

Ou seja, é necessário no mínimo 45 animais para estimar, com 95% de confiança, a média da saúde da população.

Para calcular o número amostral apropriado de *Caretta caretta*, utilizou-se dados prévios coletados em Povoação. No qual a média e o desvio padrão para a contagem de eritrócitos foi de: 4,0 e 0,55 milhão/mm³, respectivamente, sendo o $d = 0,2$, ou seja 5% do valor médio e $1 - \alpha = 95\%$.

$$\eta_0 = \frac{(0,55)^2}{(0,2)^2} \times (1,96)^2 = 29$$

Então $gl = 28$, $\tau_{1-\alpha/2, gl} = \tau_{0,975;30} = 2,048$ e

$$\eta_1 = \frac{(0,55)^2}{(0,2)^2} \times (2,048)^2 = 31$$

Ou seja, é necessário no mínimo 31 animais para estimar, com 95% de confiança, a média da saúde da população.

Para os dados genéticos, entre 25-30 indivíduos por população são suficientes para estimar a frequência dos alelos e as estimativas de diversidade derivadas dela (HALE et al. 2012).

2.2 ANÁLISES

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

Análises laboratoriais: Os processos laboratoriais e análises foram realizados no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade e no Laboratório de Genética e Evolução Molecular, do CCHN (Vitória), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Foram avaliados os indivíduos e dados encontrados durante o período do estudo, bem como, de períodos anteriores para comparações (NARO-MACIEL et al., 2012, REIS et al., 2010, VARGAS et al., 2008, VARGAS et al., 2019 e SHAMBLIN et al., 2014).

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

Foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares para avaliar o padrão de diversidade e estrutura genético-populacional das tartarugas marinhas em nosso estudo: a região controle do DNA mitocondrial e os microsatélites do DNA nuclear. O DNA extraído das amostras de cada indivíduo coletado foram amplificados por PCRs (Reação de Polimerase em Cadeia) para posterior sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (DNAMt) e genotipagem dos microsatélites.

Para amplificação das sequências foram utilizados os primers LCM e H950 (ABREU-GROBOIS et al., 2006) para as três espécies de tartarugas marinhas: *C. caretta*, *C. mydas* e *D. coriacea*. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose de 1% por eletroforese, posteriormente seguidos de três etapas: 1) purificação através da enzima ExoSAP-IT, 2) reação de sequenciamento e 3) precipitação das amostras, onde foram executadas as etapas de limpeza e remoção de excesso de reagentes que pudessem inibir a leitura da sequência. O sequenciamento ocorreu para ambas as direções (forward e reverse) em sequenciador ABI Prism 3700, tendo as sequências da região controle do DNA mitocondrial geradas e alinhadas com o algoritmo MUSCLE por meio do programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018).

A amplificação dos loci microsatélites foi realizada de acordo com os dados da literatura e foram específicos para cada espécie (SHAMBLIN et al., 2009, FITZSIMMONS, 1995, KICHLER et al., 1999, SHAMBLIN et al., 2007, MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008, DUTTON & FREY, 2009, RODEN & DUTTON, 2011, ALSTAD, 2011). Os loci microsatélites gerados foram visualizados e identificados com o software Geneious Prime (KEARSE et al. 2012).

Análises de bioinformática e estatísticas: As sequências da região controle do DNA mitocondrial foram alinhadas no programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018). A identificação do haplótipo de cada indivíduo sequenciado foi feita no programa DNAsp v6 (ROZAS et al., 2003) comparando as sequências geradas com os haplótipos já publicados para cada uma das espécies analisadas.

Foram estimados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin 3.5.2. (EXCOFFIER & LISCHER, 2015), baseada no F_{ST} com 1000 permutações. Para os marcadores microsatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética foram calculados através do programa GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) sendo, número de alelos por loco (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e). A estimativa de riqueza alélica (A_r) foi calculada usando o pacote PopGenReport para R (ADAMACK e GRUBER, 2014). A identidade individual foi estimada pelo programa COLONY 2.0 (JONES & WANG, 2010), através do método de máxima verossimilhança e o cálculo de probabilidade de identidade (PI) no programa GenAEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número populacional efetivo (N_e) foi calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição e variação genética bem como avaliar os níveis de estrutura populacional, foram realizadas comparações par-a-par entre as amostras pré e pós rompimento da barragem e entre as áreas impactadas e não-impactadas, para ambos marcadores moleculares (DNAmT e loci microsatélites). Adicionalmente, utilizando somente os dados de microsatélites, foi realizado um método de agrupamento por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) disponível no pacote adegenet 2.1 para R (JOMBART 2008), que inferem o número de padrões genéticos (K) utilizando um Critério de Inferência Bayesiana (BIC), bem como estimam proporções de mistura entre as populações/origem geográfica (JOMBART et al. 2010) traçando uma probabilidade de agrupamento (0-100%), comparando as áreas e períodos.

Avaliação da saúde das tartarugas marinhas

Hemograma: Os hemogramas foram realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) foi realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm na centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos (Tr) foi realizada na câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 μ L de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias foi realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (THRALL et al., 2004). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Foram contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

Análises bioquímicas: Foi analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio,

aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises foram realizadas no sistema automatizado BeckmanCoulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

Análises de elementos traço: A dosagem de elementos traço será realizada por GF-AAS ou equipamento disponível no laboratório contratado pela FEST, após a validação pela equipe da compatibilidade com os resultados anteriores. As amostras de ovos (3 por ninho), foram separadas em pool de casca, gema e clara, já os ovos não eclodidos (3 por ninho) foram separados em pool de conteúdo e casca. Os natimortos foram analisados em pool de 3 filhotes por ninho. É necessário a realização das análises em duplicata para confirmação dos resultados a partir da repetição da análise. Através dela validamos e avaliamos a precisão dos resultados. Desse modo, é possível a verificação instantânea de que o resultado está dentro dos padrões. As duplicatas são importantes principalmente para amostras que são mais difíceis de serem homogeneizadas, como os natimortos e os ovos. As amostras foram preparadas por digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente (CAMACHO et al., 2013c). Os metais analisados foram: As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn.

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

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

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

Meta 1: As análises de bioinformática e estatísticas propostas para o indicador Diversidade Genética sofreram pequenas modificações pois novos algoritmos matemáticos têm sofrido atualizações, produzindo maior grau de confiança e robustez estatística, e outros parâmetros foram incluídos para subsidiar as avaliações. Dessa forma, as sequências da região controle do DNA mitocondrial assim

como os loci de microssatélites passaram a ser visualizadas, alinhadas e mensuradas utilizando o software Geneious (KEARSE et al., 2012). Foi incluído o índice de heterozigosidade individual (Hi) para os marcadores de microssatélites que subsidiam o entendimento sobre perda de alelos e heterozigosidade nas populações, o qual é estimado utilizando o software GenAlEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). Foram incluídas duas análises de demografia populacional as quais avaliam se as populações de tartarugas sofreram gargalo populacional recente e histórico, sendo a primeira realizada através do software BOTTLENECK (PIRY et al., 1999) e a segunda realizada através o pacote de dados Vareff (NIKOLIC & CHEVALET, 2014), e possibilitam subsidiar os parâmetros demográficos e entender a história de vida das populações de tartarugas. Por outro lado, foram excluídas as análises de redes de haplótipos, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, e Análise de Componentes Principais pois se mostraram pouco informativas para avaliação do indicador.

Foi sugerido que no primeiro ano do novo ciclo fosse testada uma nova metodologia para obtenção de dados genômicos com o intuito de reduzir os custos e aumentar o poder e cobertura das análises genéticas, em substituição à genotipagem dos 15 marcadores nucleares microssatélites para as três espécies de tartarugas marinhas estudadas. No entanto, não foi possível encontrar profissional habilitado para trabalhar com essa nova metodologia, por isso ela não foi testada e continuamos usando os 15 marcadores microssatélites.

Ao longo do monitoramento genético realizado no período do PMBA, foi observado que algumas fêmeas de *C. caretta* e *D. coriacea* e juvenis de *C. mydas*, previamente registrados em coletas anteriores, foram identificados novamente em campanhas subsequentes. Esses animais foram denominados "recapturas" para os juvenis e "remigrantes" no caso das fêmeas. Com isso, para as análises genéticas (utilizando D-loop e microssatélites), esses animais foram contabilizados em todos os anos em que eles foram encontrados, mas as repetições foram excluídas para as análises de Pós global, onde o N se refere ao total de animais coletados da população em questão.

No PMBA/Fest, a análise dos dados genéticos gerados durante cinco anos de monitoramento contínuo, abrangendo também o início do período chuvoso do sexto ano, revelou uma situação preocupante quanto à diversidade genética das populações de tartarugas marinhas *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* e *Dermochelys coriacea* nas áreas afetadas do Espírito Santo. Buscando apresentar essa situação em um contexto mais amplo, foi desenvolvido o Índice Genético de Ameaças às Tartarugas (IGAT), o qual foi inserido como um parâmetro interno para o indicador de diversidade genética a partir do presente relatório. O IGAT foi construído utilizando os dados genéticos gerados de Setembro de 2018 a Janeiro de 2024, e reflete a média dos valores absolutos encontrados para cada parâmetro genético em cada período e área avaliada. O cálculo foi realizado através da seguinte fórmula: $IGAT = (H + Ho + Hi + AR + Ne) / 5$, sendo que H é a diversidade haplotípica do marcador mitocondrial D-loop; para os marcadores microssatélites, Ho é a heterozigosidade observada, Hi é a heterozigosidade individual, AR é a riqueza alélica, e Ne o tamanho populacional efetivo. O IGAT foi dividido em quatro níveis de ameaça: severo ($\leq 9,99$), moderado (entre 10 a 24,99), baixo (entre 25 a 49,99) ou mínimo (≥ 50). Quanto menor o valor do índice, pior a condição genética da população e maior o nível de ameaça. Para *C. caretta* e *C. mydas*, foram calculados os valores de IGAT comparando a área atingida (ES-Pós) e a área controle

(BA-Pós). Não há dados disponíveis de outra área de desova para *D. coriacea* que poderia ser utilizada como área controle, pois o Espírito Santo é a única área no Brasil com monitoramento regular de desova. Assim, para fins de comparação e cálculo do IGAT, dados de *D. coriacea* referentes ao período pré-rompimento da barragem foram compilados da literatura, quando disponíveis ou provenientes de amostras previamente coletadas e doadas para a nossa equipe.

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

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

-Todas as análises de contaminantes orgânicos foram retiradas

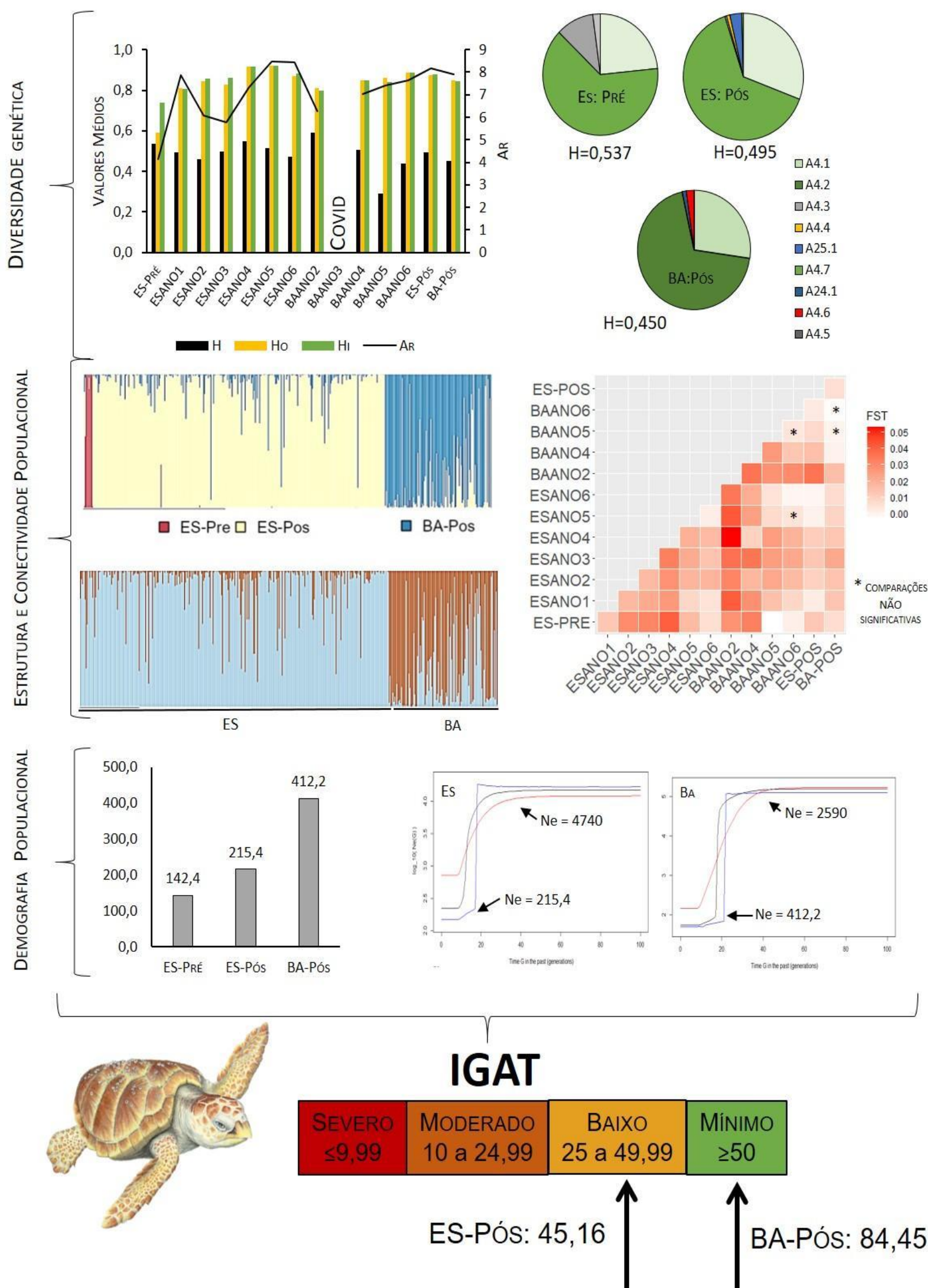
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo de todo monitoramento na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte 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:

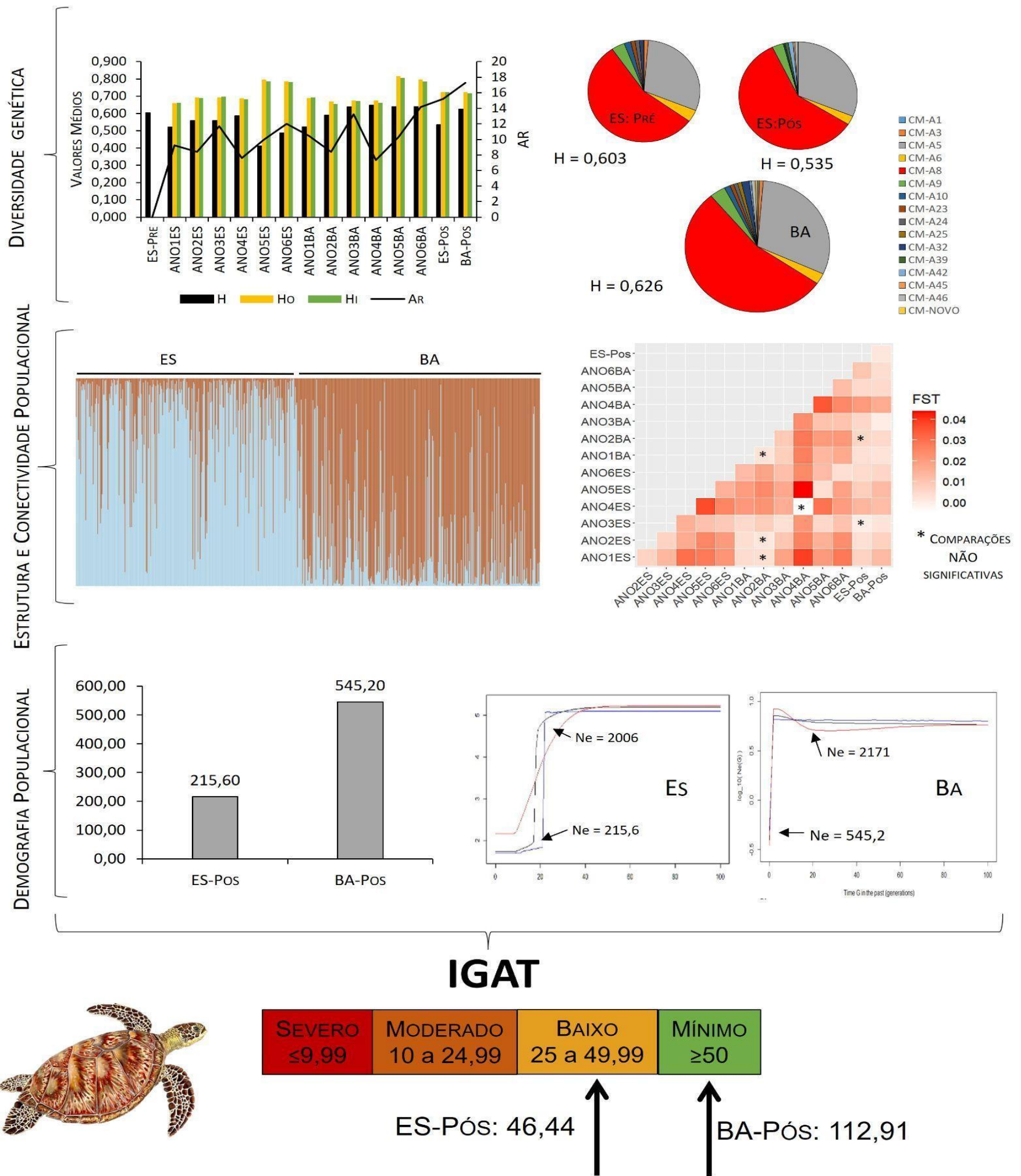
3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Figura 1: Indicadores de diversidade genética. Distribuição dos índices de diversidade genética, estrutura genético-populacional e tamanho efetivo populacional monitorados ao longo dos 6 anos do PMBA/Fest, utilizando dados mitocondriais (D-loop) e os nucleares (microssatélites) para as populações de *Caretta caretta* do Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). H: diversidade haplotípica baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigiosidade observada, Hi: heterozigiosidade individual, Ar: Riqueza alélica e Ne: tamanho populacional efetivo baseados nas análises dos microssatélites (DNA nuclear). ES: área afetada do Espírito Santo. BA: área controle da Bahia. Pré: dados Pré-rompimento da barragem de Fundão e/ou provenientes da literatura. Pós: dados Pós-rompimento da barragem de Fundão. F_{ST} : teste pareado de estrutura genético-populacional. Covid: amostragem não realizada no período de paralisação das atividades devido à pandemia Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.



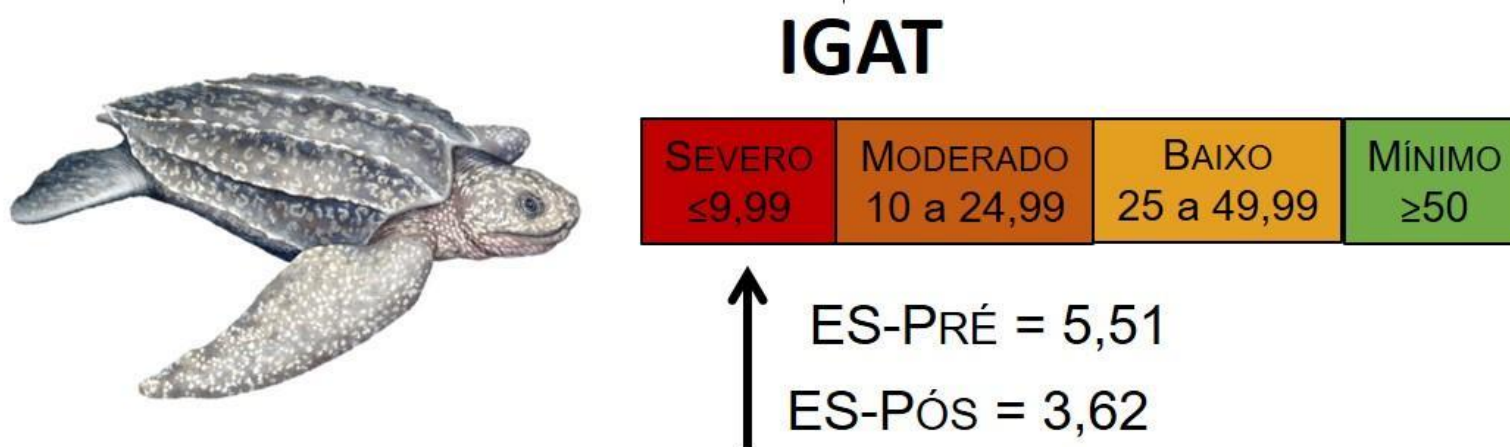
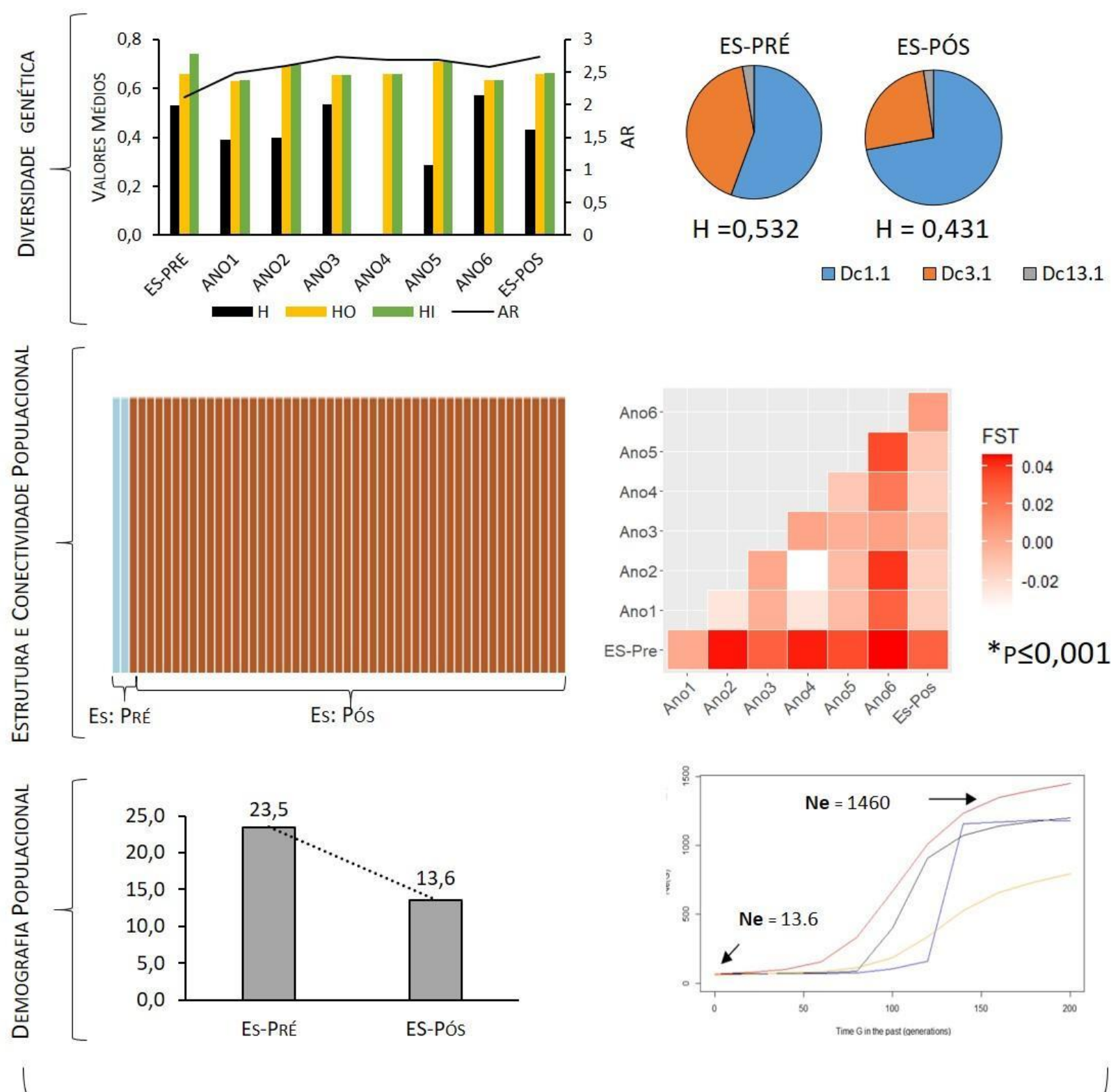
A população de *C. caretta* do período ES-Pós manteve a tendência de redução (7,82%) da diversidade haplotípica. O valor para o período ES-Pós foi maior ($H=0,495$) quando comparado à população controle BA-Pós ($H=0,450$), porém isso possivelmente está relacionado a fatores ecológicos exclusivos da população em questão, como um maior grau de filopatria das fêmeas da BA, e/ou a fatores evolutivos como a deriva genética. Em espécies ameaçadas, o comportamento filopátrico pode reduzir o fluxo gênico entre as populações (BALTAZAR-SOARES et al. 2020), reduzindo assim a diversidade haplotípica. A deriva genética também pode influenciar a diversidade haplotípica ao longo do tempo, especialmente em populações pequenas, assim como já reportado para *D. coriacea* (VARGAS et al., 2022). Para os marcadores microssatélites, foi detectada baixa ($\leq 5\%$), mas significativa ($p \leq 0,001$) estrutura populacional temporal (entre ES-Pré e ES-Pós) e espacial (entre ES-Pós e BA-Pós), evidenciadas tanto pelo DAPC quanto pelos valores de FST pareados. Esses resultados indicam algum nível de conectividade e fluxo gênico entre as áreas, mas suas composições genéticas são significativamente diferentes, provavelmente devido ao comportamento filopátrico das fêmeas. Ainda, foi observado um aumento de 51,5% do N_e (tamanho populacional efetivo) no período ES-Pós em comparação ao período ES-Pré, mas o valor de ES-Pré pode estar subestimado devido ao baixo número de amostras analisadas do ES-Pré ($N=9$) em comparação a ES-Pós ($N=371$). Dessa forma, para um melhor entendimento do impacto do rompimento da barragem deste parâmetro, a comparação entre o ES-Pós e a área controle BA-Pós é mais relevante, pois as populações possuem amostragens semelhantes. Nessa comparação, é possível identificar que o N_e no ES-Pós é 47,75% menor do que BA-Pós. A análise de demografia populacional histórica continuou evidenciando gargalo populacional, com redução de 95,46% para ES e 84,08% para BA nas últimas 20 gerações. O IGAT revelou 46,53% de piora na saúde genética da área atingida ES-Pós ($IGAT=45,16$), com índice de ameaça classificado como “baixo”, enquanto que a área controle BA-Pós apresentou risco de ameaça “mínimo” ($IGAT=84,45$). Logo, o indicador de diversidade genética para *C. caretta* demonstra que a população da área afetada do ES ainda apresenta sinais de vulnerabilidade genética.

Figura 2: Indicadores de Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética, estrutura genético-populacional e tamanho efetivo populacional monitorados ao longo dos 6 anos do PMBA/Fest, utilizando dados mitocondriais (D-loop) e nucleares (microssatélites) para as juvenis de *Chelonia mydas* do Espírito Santo (ES) e da Bahia (BA). H: diversidade haplotípica baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigosidade observada, Hi: heterozigosidade individual, Ar: Riqueza alélica e Ne: tamanho populacional efetivo baseados nas análises dos microssatélites (DNA nuclear). ES: área afetada do Espírito Santo. BA: área controle da Bahia. Pré: dados Pré-rompimento da barragem de Fundão e/ou provenientes da literatura. Pós: dados Pós-rompimento da barragem de Fundão. F_{ST} : teste pareado de estrutura genético-populacional. Covid: amostragem não realizada no período de paralisação das atividades devido à pandemia Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.



A população de *C. mydas* do período ES-Pós manteve a tendência de redução (11,28%) da diversidade haplotípica e perda de linhagens quando comparada com o período ES-Pré. A diversidade haplotípica foi 14,54% menor quando comparada à área controle BA-Pós. Para os marcadores nucleares microssatélites, foram detectadas estrutura populacional temporal (entre quase todos os pares de anos) e espacial (entre ES e BA) baixas, evidenciada tanto pelo DAPC quando pelo F_{ST} pareado significativo ($p \leq 0,001$). A análise DAPC detectou alto grau de mistura entre as áreas afetadas do ES e controle da BA, indicando possível compartilhamento de área de nascimento desses juvenis. A análise da demografia populacional histórica detectou para ES um N_e 60,45% menor do que para BA, além de um gargalo populacional abrupto há aproximadamente 20 gerações, com redução do N_e de 89,25% para ES e há 10 gerações, com redução de 74,88% para BA. Para as *C. mydas* da área atingida (ES-Pós) o IGAT foi 58,86% menor (IGAT=46,44 - classificado como risco de ameaça “baixo”) do que para a área controle BA-Pós (IGAT=112,91 - risco de ameaça “mínimo”). Logo, o indicador de diversidade genética para *C. mydas* demonstra que a população da área afetada do ES ainda apresenta sinais de vulnerabilidade genética.

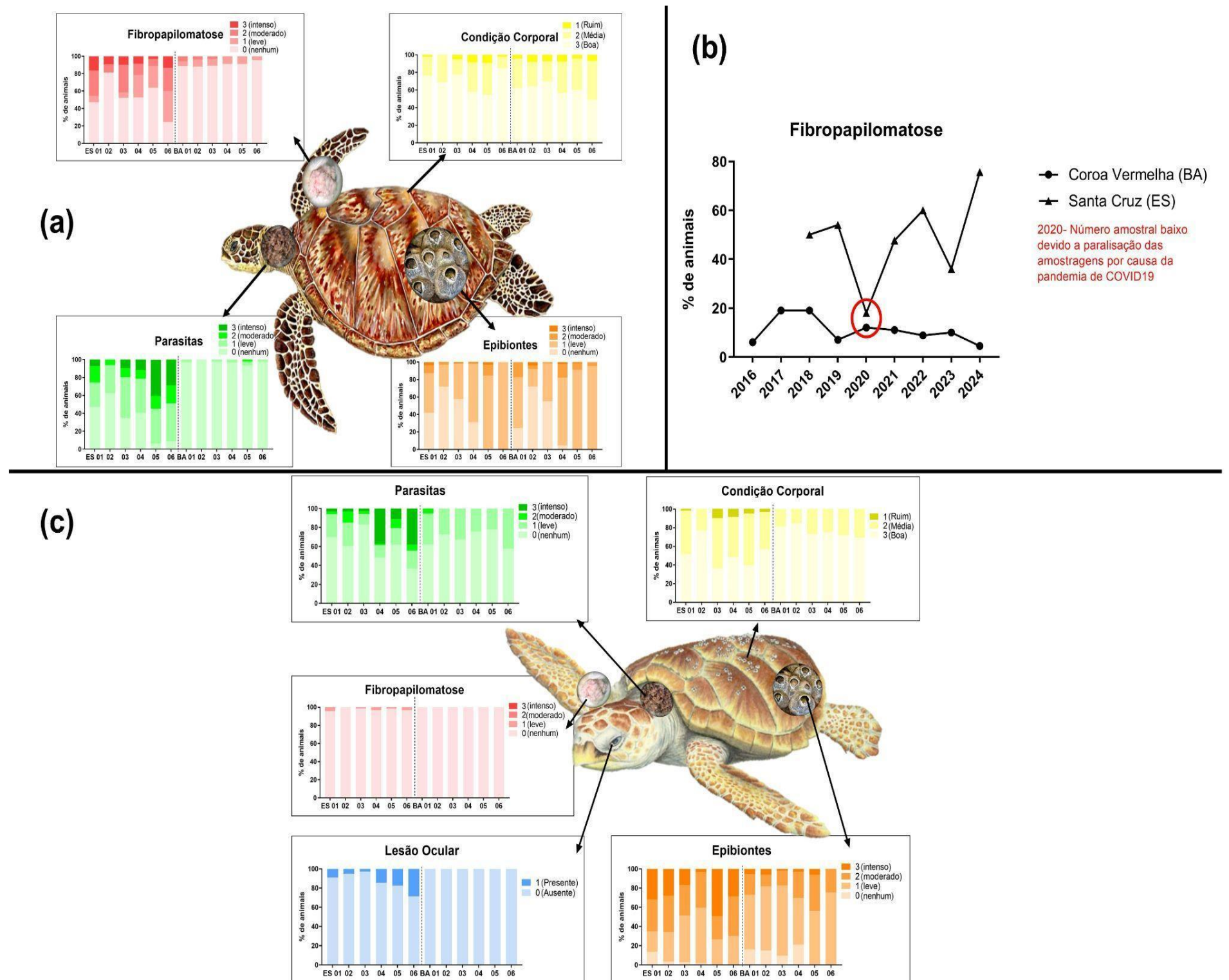
Figura 3: Indicadores de Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética, estrutura genético-populacional e tamanho efetivo populacional monitorados ao longo dos 6 anos do PMBA/Fest, utilizando dados mitocondriais (D-loop) e nucleares (microsatélites) para as populações de *Dermochelys coriacea* do Espírito Santo (ES). H: diversidade haplotípica baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigosidade observada, Hi: heterozigosidade individual, Ar: Riqueza alélica e Ne: tamanho populacional efetivo baseados nas análises dos microsatélites (DNA nuclear). ES: área afetada do Espírito Santo. BA: área controle da Bahia. Pré: dados Pré-rompimento da barragem de Fundão e/ou provenientes da literatura. Pós: dados Pós-rompimento da barragem de Fundão. F_{ST} : teste pareado de estrutura genético-populacional. Covid: amostragem não realizada no período de paralisação das atividades devido à pandemia Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.



A população reprodutiva de *D. coriacea* manteve a tendência de redução da diversidade haplotípica (18,98%) ao compararmos os períodos ES-Pré e ES-Pós. Para os marcadores microssatélites, quando comparamos os dois períodos, houve perda de 10,5% na heterozigosidade individual (Hi). Essa redução pode ser atribuída à diminuição de 42,13% do N_e e à influência da deriva genética. Em nível populacional, embora tenha sido observado um leve aumento de 0,25% na heterozigosidade observada (H_o), este incremento não foi suficiente para alavancar a diversidade genética da população. Não foi verificado sinal de diferenciação genética entre os dois períodos analisados, como ficou evidenciado pelo F_{ST} pareado (valores não significativos). A análise da demografia populacional histórica revelou um padrão de redução populacional (evento de gargalo) e ao longo das últimas 150 gerações houve diminuição expressiva de 99,07% do seu N_e . O IGAT exibiu valores extremamente baixos tanto no período ES-Pré (IGAT= 5,51) quanto no ES-Pós (IGAT=3,62), sendo categorizados como “severo” e indicam uma piora de 34,3% na saúde genética da população durante o intervalo de tempo analisado. Logo, o indicador de diversidade genética para *D. coriacea* demonstra que a população da área afetada do ES ainda apresenta sinais muito altos de vulnerabilidade genética.

3.2 PARÂMETROS DE SAÚDE

Figura 4: Indicador Parâmetros de saúde. (a) Indicadores externos de saúde obtidos no exame físico de *Chelonia mydas*, na APA Costa das Algas em Santa Cruz, ES (SC) e em Coroa Vermelha, BA (CV) entre o Ano 1 e o Ano 6 (outubro de 2018 a setembro de 2019: Ano 1; outubro de 2019 a setembro de 2020: Ano 2; outubro de 2020 a setembro de 2021: Ano 3; outubro de 2021 a setembro de 2022: Ano 4; outubro de 2022 a setembro de 2023: Ano 5; outubro de 2023 a março de 2024: Ano 6). (b) Prevalência (%) de fibropapilomatose em *Chelonia mydas* juvenis na área controle (Coroa Vermelha, BA) e na área afetada pela pluma primária de rejeitos de mineração (APA Costa das Algas, Santa Cruz, ES) de 2016 a 2024. (c) Indicadores externos de saúde avaliados no exame físico em *Caretta caretta*, em Povoação ou Regência (ES), Praia do Forte ou Arembépe (BA), do Ano 1 ao Ano 6 (outubro de 2018 a setembro de 2019: Ano 1; outubro de 2019 a setembro de 2020: Ano 2; outubro de 2020 a setembro de 2021: Ano 3; outubro de 2021 a setembro de 2022: Ano 4; outubro de 2022 a setembro de 2023: Ano 5; outubro de 2023 a março de 2024: Ano 6).

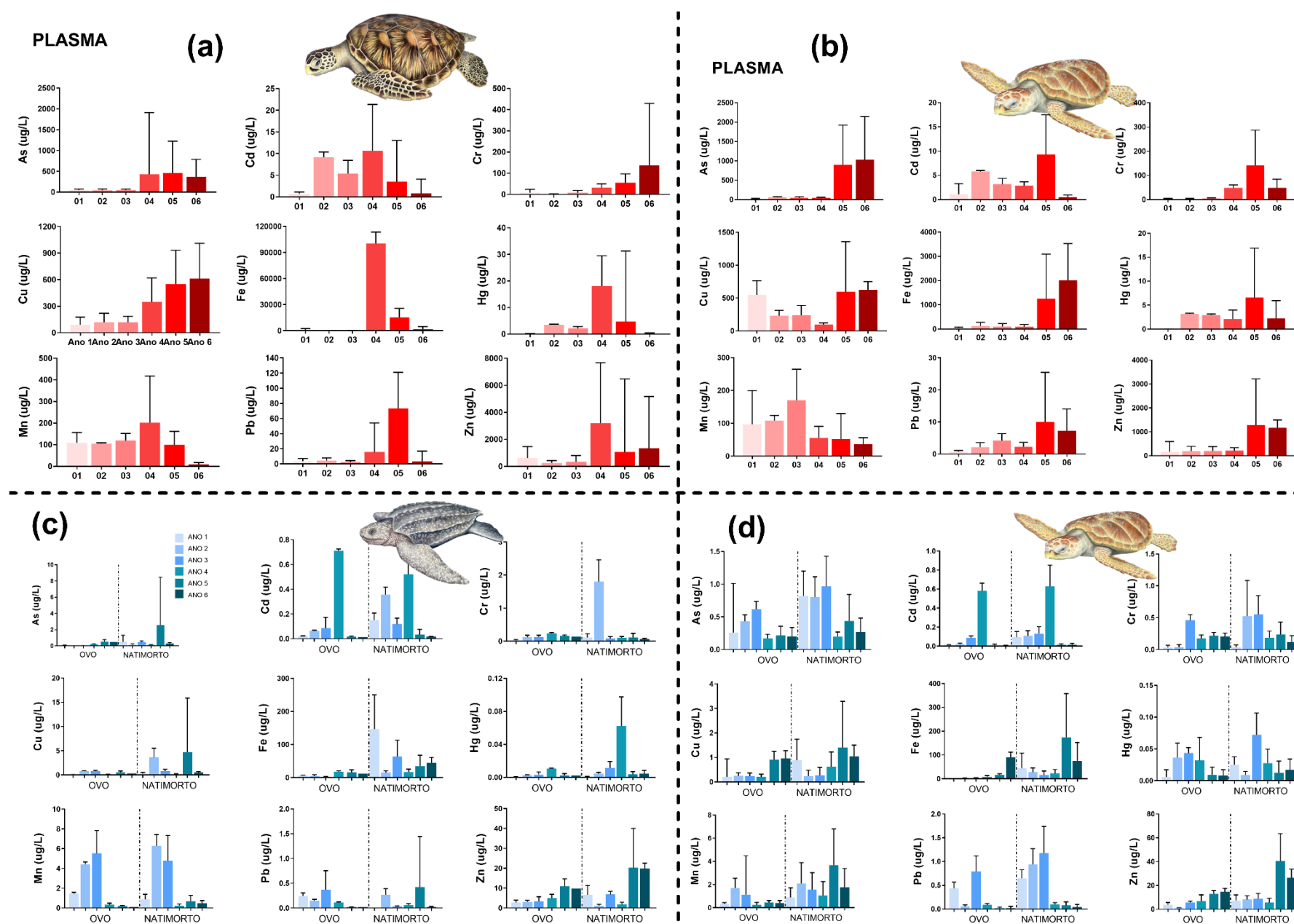


Ao longo dos 6 anos de monitoramento do PMBA/Fest, observa-se que as tartarugas-verdes juvenis se (*Chelonia mydas*) que alimentam na APA Costa das Algas em Santa Cruz (SC), ES, apresentam alterações nos parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos, indicando que elas estão menos saudáveis que os animais da área controle na BA (Coroa Vermelha - CV). No Ano 6, 76% dos animais da APA Costa das Algas apresentaram fibropapilomatose, sendo a percentagem mais alta já encontrada ao longo dos 6 anos de monitoramento do PMBA/Fest. Comparado com o Ano 5, observa-se um aumento de 110% da prevalência da doença na população. Enquanto em Coroa Vermelha somente 4% dos animais apresentaram fibropapilomas, sendo a menor percentagem encontrada desde 2016. Além disso, nenhum animal em Coroa Vermelha apresentou escore moderado ou severo da doença, já em Santa Cruz, 27% dos animais tiveram escore moderado e 13% escore severo. Dos 13 animais recapturados no Ano 6, em Santa Cruz, somente 2 não apresentaram a doença, 7 desenvolveram tumores entre a primeira captura e a recaptura e 4 já estavam com a doença desde a primeira amostragem. Além disso, de todas as tartarugas capturadas em Santa Cruz, somente 2 animais não apresentaram ectoparasitas e os escores variaram de leve a severo. Enquanto em Coroa Vermelha, somente 1 animal foi encontrado com escore leve de ectoparasitas. A prevalência crescente da fibropapilomatose e sua presença constante entre os animais recapturados, juntamente com a prevalência de ectoparasitas na população indicam que há problemas ambientais que estão afetando a saúde das tartarugas-verdes na região monitorada. A fibropapilomatose está associada a fatores ambientais, como poluição, contaminação por substâncias químicas, alterações na qualidade da água e estresse. O aumento do parasitismo pode ser um indicativo de desequilíbrios ambientais, como alterações na qualidade da água, contaminação por poluentes ou mudanças climáticas (FOLEY et al. 2005, SANTOS et al. 2010).

No Ano 6, as tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) que utilizam as praias da Foz do Rio Doce para desovar, continuam a apresentar uma pior condição corporal e maior prevalência de epibiontes e ectoparasitas, se comparadas com as tartarugas da área controle. No Ano 6, 63% das tartarugas da área impactada apresentaram ectoparasitas, destas 19% apresentaram escore leve, 6% escore moderado e 38% escore severo. Esta é a maior percentagem de animais com a presença de parasitas registrada ao longo dos 6 anos de monitoramento do PMBA/Fest e também a maior percentagem encontrada de animais com escore severo. Observa-se um aumento, ao longo dos anos, de animais com lesão ocular, na área impactada. Do Ano 5 ao Ano 6 este aumento foi de 63%, sendo o Ano 6, o que mais apresentou animais com essa condição. Os animais da área impactada também continuam a apresentar fibropapilomas, enquanto na área controle não foram encontrados animais com lesão ocular e nem com fibropapilomas nos 6 anos de monitoramento. Este cenário (maior prevalência de lesões oculares e parasitas, pior condição corporal e a presença de animais com fibropapilomas) indica que a qualidade do ambiente na área impactada está comprometida e a contaminação pode estar afetando a saúde das tartarugas-cabeçudas, tornando-as mais suscetíveis a infecções, problemas oculares e a doenças como a fibropapilomatose.

3.3 METAIS PESADOS

Figura 5: Indicador Metais Pesados. (a) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas *Chelonia mydas* capturadas na APA Costa das Algas, ES durante o período de outubro de 2018 a setembro de 2019 (Ano 1), outubro de 2019 a setembro de 2020 (Ano 2), outubro de 2020 a setembro de 2021 (Ano 3), outubro de 2021 a setembro de 2022 (Ano 4), outubro de 2022 a setembro de 2023 (Ano 5) e outubro de 2023 a março de 2024 (Ano 6). (b) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES durante o período de outubro de 2018 a setembro de 2019 (Ano 1), outubro de 2019 a setembro de 2020 (Ano 2), outubro de 2020 a setembro de 2021 (Ano 3), outubro de 2021 a setembro de 2022 (Ano 4), outubro de 2022 a setembro de 2023 (Ano 5) e outubro de 2023 a março de 2024 (Ano 6). (c) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Dermochelys coriacea* capturadas em Povoação e Regência, ES, durante o período de outubro de 2018 a setembro de 2019 (Ano 1), outubro de 2019 a setembro de 2020 (Ano 2), outubro de 2020 a setembro de 2021 (Ano 3), outubro de 2021 a setembro de 2022 (Ano 4), outubro de 2022 a setembro de 2023 (Ano 5) e outubro de 2023 a março de 2024 (Ano 6). (d) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES, durante o período de outubro de 2018 a setembro de 2019 (Ano 1), outubro de 2019 a setembro de 2020 (Ano 2), outubro de 2020 a setembro de 2021 (Ano 3), outubro de 2021 a setembro de 2022 (Ano 4), outubro de 2022 a setembro de 2023 (Ano 5) e outubro de 2023 a março de 2024 (Ano 6).



As tartarugas-verdes juvenis que se alimentam na área impactada, apresentam variações nas concentrações de metais no plasma, ao longo dos 6 anos de monitoramento do PMBA/Fest. O As aumentou suas concentrações do Ano 1 ao Ano 4 e se manteve elevado nos Anos 5 e 6. O Cd, Hg, Fe e Mn apresentaram diminuição dos níveis do Ano 4 ao Ano 6. Já o Cu e o Cr apresentaram aumentos significativos ao longo dos anos de monitoramento, sendo os maiores níveis observados no Ano 6. O Pb diminuiu suas concentrações no Ano 6 comparado com o Ano 5, e o Zn se manteve constante nos últimos dois anos (Ano 5 e 6).

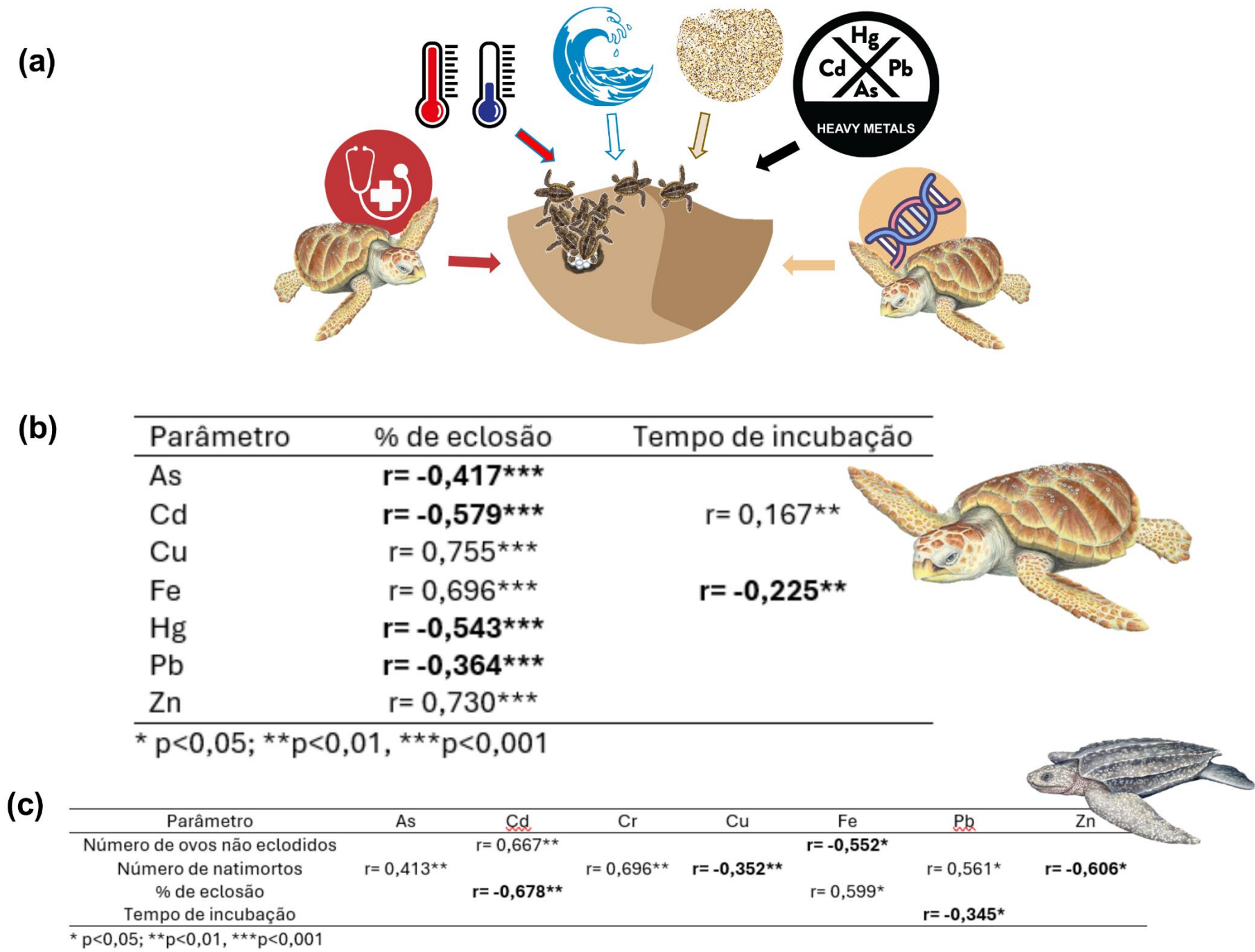
Ao observarmos a série histórica, não se encontra um padrão nas concentrações dos metais no plasma, ovos recém colocados e natimortos. Suas concentrações variam ao longo do tempo. Nos anos 5 e 6 de monitoramento do PMBA/Fest observa-se que as concentrações de As, Cr, Fe, Pb e Zn no plasma das tartarugas-cabeçudas da área impactada estão significativamente mais elevadas do que nos demais anos.

Os ovos recém colocados de tartarugas-cabeçudas e de couro apresentaram concentrações detectáveis de todos os metais analisados, indicando que há transferência materna dos contaminantes das fêmeas para os ovos, uma vez que foram coletados direto da cloaca, sem contato com o meio externo. Os natimortos de ambas as espécies possuem concentrações mais elevadas de alguns metais do que os ovos recém colocados, indicando que há uma transferência de contaminantes do sedimento do ninho para os ovos durante o período de incubação. Ambientes contaminados podem aumentar a toxicidade e os níveis dos metais nos ovos, tendo como consequências efeitos disruptivos sobre os embriões, afetando o sucesso reprodutivo. No indicador Dados Reprodutivos, pode-se observar que há uma influência negativa da contaminação no sucesso de eclosão na área impactada

A intensa descarga fluvial, típica dos meses de verão, e a alta energia das ondas costeiras observada durante o inverno (OLIVEIRA E QUARESMA 2017), provocam a ressuspensão dos sedimentos e o consequente aumento nos níveis de metais e sua disponibilidade na região costeira do rio Doce (HAJTE et al. 2017). Essa variação temporal expõe continuamente as tartarugas marinhas aos metais pesados presentes nos rejeitos e a outros contaminantes mobilizados ao longo do ano (ROCHA et al. 2022). Dessa forma, as tartarugas-verdes juvenis estudadas estão mais vulneráveis aos efeitos nocivos dos contaminantes, pois podem permanecer nas áreas de alimentação por décadas. Já as tartarugas-cabeçudas ficam, em média, 3 meses por ano nas áreas de desova, e seus ovos estão expostos aos contaminantes ambientais do ninho por 60 dias. Essa exposição pode prejudicar o desenvolvimento embrionário, um dos estágios mais sensíveis e vulneráveis aos poluentes ambientais, com efeitos disruptivos que podem se manifestar ao longo do desenvolvimento do indivíduo, mesmo após a eclosão (IKONOMOPOULOUS et al. 2009, KOMOROSKE et al. 2011, PERRAULT et al. 2011).

3.4 DADOS REPRODUTIVOS

Figura 6: Indicador Dados Reprodutivos. (a) Fatores que influenciam o sucesso reprodutivo das tartarugas marinhas (b) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos de *Caretta caretta* de Povoação e Regência, ES, Brasil, ao longo dos 6 anos (out/2018 a mar/2024) do PMBA/Fest. (c) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos de *Dermochelys coriacea* de Povoação e Regência, ES, Brasil, ao longo dos 6 anos (out/2018 a mar/2024) do PMBA/Fest.



(b)

Parâmetro	% de eclosão	Tempo de incubação
As	$r = -0,417^{***}$	
Cd	$r = -0,579^{***}$	$r = 0,167^{**}$
Cu	$r = 0,755^{***}$	
Fe	$r = 0,696^{***}$	$r = -0,225^{**}$
Hg	$r = -0,543^{***}$	
Pb	$r = -0,364^{***}$	
Zn	$r = 0,730^{***}$	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

(c)

Parâmetro	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn
Número de ovos não eclodidos		$r = 0,667^{**}$			$r = -0,552^{*}$		
Número de natimortos	$r = 0,413^{**}$		$r = 0,696^{**}$	$r = -0,352^{**}$		$r = 0,561^{*}$	$r = -0,606^{*}$
% de eclosão		$r = -0,678^{**}$			$r = 0,599^{*}$		
Tempo de incubação						$r = -0,345^{*}$	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ao longo dos 6 anos de monitoramento do PMBA/Fest observa-se que os dados reprodutivos variam entre as áreas avaliadas, sem apresentar um padrão ao longo dos anos. Sabe-se que diversos fatores contribuem para o sucesso reprodutivo das tartarugas marinhas, como por exemplo a temperatura, umidade, granulometria, inundação pela maré, saúde materna e genótipo das fêmeas. Porém, ao observarmos os dados reprodutivos e as correlações com as concentrações de metais, fica evidente que há uma influência negativa da contaminação no sucesso de eclosão na área impactada.

Nas tartarugas-cabeçudas e de couro, a porcentagem de eclosão correlacionou-se negativamente com os metais não essenciais (As, Cd, Hg e Pb) e positivamente com os metais essenciais (Cu, Fe, Zn), indicando que níveis mais elevados de metais não essenciais nos ovos e natimortos está contribuindo para a diminuição do sucesso de eclosão dessas espécies. Além disso, o tempo de incubação correlacionou-se positivamente com o cádmio (tartaruga-cabeçuda) e o chumbo (tartaruga-de-couro) e negativamente com o ferro (tartaruga-cabeçuda), indicando que níveis mais altos de metais essenciais nos ovos diminuem o tempo de incubação, pois são pré-requisitos para o crescimento, metabolismo e desenvolvimento embrionário. No entanto, os metais não essenciais podem ser particularmente tóxicos neste período chave do desenvolvimento e podem atrasar e/ou prejudicar a formação dos embriões, aumentando o período de incubação.

Nas tartarugas-de-couro também foram encontradas correlações positivas entre os metais não essenciais e o número de ovos não eclodidos e natimortos, além de correlações negativas entre os metais essenciais e o número de natimortos e ovos não eclodidos. Assim, quanto maior a concentração dos metais não essenciais nos ovos e natimortos, maior o número de natimortos e ovos não eclodidos no ninho.

A contaminação exerce um efeito negativo e silencioso sobre as populações, que não é evidente quando se avalia os dados reprodutivos sozinhos, uma vez que há uma variação natural entre as temporadas reprodutivas. Porém, a longo prazo, esse fator pode comprometer a sobrevivência das espécies. Isso reforça a importância de se avaliar conjuntamente os demais fatores que influenciam no sucesso reprodutivo considerando a contaminação por metais pesados entre eles.

4 INTEGRAÇÃO COM OS RESULTADOS DA FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT)

Descoberta de mais uma fêmea remigrante de *D. coriacea* com os dados genéticos

Assim como no Ano 4 (2021/22), no Ano 6 (2023/24) foi possível identificar, com as análises genéticas, que uma fêmea coletada sem marcas em Povoação (em parceria com a FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR) era o mesmo animal de uma coleta anterior do Ano 1 (2018/19) do PMBA. A continuidade do monitoramento está esclarecendo que o encontro de fêmeas de *D. coriacea* sem marcas, mas já amostradas, não trata-se de um episódio isolado e que pode ser comum que as tartarugas-de-couro do ES estejam perdendo suas marcas, e esse fato pode estar enviesando as estimativas populacionais (RRDM-RT39D, 2022). Esse episódio, mais o fato ocorrido no Ano 5 (2022/23), onde foi possível identificar e incluir os dados genéticos de um filhote natimorto não aparentado das fêmeas já flagradas, melhoram as estimativas de diversidade genética para população que possui baixo número de indivíduos e mostram a importância da utilização de metodologia complementares (coleta e análise genética de natimortos de ninhos sem registro de flagrantes das fêmeas, captura, marcação e recaptura, análises genéticas de todas as fêmeas flagradas e pit tags) para solucionar questões biológicas e de conservação extremamente importantes como o tamanho populacional, principalmente para uma espécie criticamente ameaçada de extinção.

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

Ao longo do PMBA/Fest, foi realizada a avaliação genética e de saúde das populações de tartarugas marinhas *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* e *Dermochelys coriacea*, comparando as áreas afetadas do Espírito Santo e não afetadas (áreas controle) da Bahia. O período monitorado foi realizado durante o PMBA (FEST-RT44-RE2023), de Setembro de 2018 a Janeiro de 2024.

Em última análise, durante o PMBA/Fest, observamos que as populações das tartarugas marinhas das áreas afetadas do ES são historicamente fragilizadas devido aos gargalos populacionais (antigos e/ou recentes) e à perda de diversidade genética. Os impactos detectados aumentaram a vulnerabilidade genética e comprometeram a saúde dessas populações, que por sua vez diminuem a capacidade adaptativa diante das perturbações ambientais antrópicas. Com isso, o cenário atual em que as populações das tartarugas marinhas monitoradas se encontra revela tendências preocupantes. O rompimento da barragem do Fundão introduziu novos desafios ambientais, e o monitoramento permitiu a identificação e compreensão desses impactos a curto e médio prazo na biota, incluindo as tartarugas (FRANCO et al. 2024). Tartarugas marinhas são espécies longevas, e o impacto de eventos ambientais na genética da população pode levar anos, ou até décadas, para se manifestar plenamente, o que reforça a importância de um monitoramento contínuo. Uma população pode crescer em número (tamanho censo) e se recuperar aparentemente de um impacto ambiental, mas somente com um monitoramento genético é possível detectar se há baixa diversidade e fragilidade genética. A estimativa do N_e , por exemplo, pode ser várias vezes menor do que o tamanho censo estimado para uma espécie,

indicando que o aumento do número de indivíduos de uma população não necessariamente é acompanhado por um aumento da diversidade genética (DIERICKX et al., 2015). Frente ao aumento das ações antrópicas nas áreas afetadas do ES, as populações das tartarugas marinhas já têm apresentado piora sobre os indicadores de genética e saúde com maior prevalência de ectoparasitas, fibropapilomatose e lesões oculares quando comparadas com as áreas controle da BA. No Ano 6 (outubro de 2023 a janeiro de 2024) de monitoramento do PMBA/Fest, foram registradas as maiores porcentagens já observadas de animais juvenis com fibropapilomatose e de animais adultos com parasitas e lesões oculares. Como as populações de fêmeas (*C. caretta* e *D. coriacea*) retornam para as áreas afetadas do ES para desovar e as populações de juvenis (*C. mydas*) permanecem por décadas nas áreas de alimentação, elas estão continuamente expostas aos contaminantes e metais pesados característicos do rejeito, que são mobilizados pelo seu fluxo ao longo do ano (ROCHA et al. 2022) devido à intensa descarga fluvial na foz do Rio Doce que ocorre tipicamente nos meses de verão e à alta energia das ondas na costa observada durante o inverno (OLIVEIRA E QUARESMA, 2017). Essa piora nos indicadores também pode estar relacionada com as transformações da paisagem, poluição, pesca e predação das áreas de desova e alimentação nos últimos anos (ALMEIDA et al. 2011; COLMAN et al. 2019; TIWARI et al. 2013). Ainda, reforçamos que as populações de tartarugas marinhas das áreas afetadas do ES possuem menor capacidade em responder positivamente às transformações ambientais e, com base nos dados compilados até o momento, pode-se afirmar que elas foram impactadas em diferentes níveis (individual e populacional) e estágios de vida (ovos, recém-nascidos, juvenis e adultos) (MIGUEL et al. 2022a; 2022b; VARGAS et al. 2022; LUDWIG et al. 2023; MIGUEL et al. 2023; FRANCO et al. 2024). Logo, o cenário detectado indica que a qualidade do ambiente na área impactada está comprometida e a contaminação pode estar afetando tanto a saúde quanto a genética das tartarugas, tornando-as ainda mais suscetíveis e diminuindo a capacidade adaptativa diante dos recentes impactos ambientais.

6 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todas as metas foram integralmente cumpridas.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU-GROBOIS, F. A.; HORROCKS, J. A.; FORMIA, A.; DUTTON, P.; LEROUX, R.; VÉLEZ-ZUAZO, X.; SOARES, L.; MEYLAN, P. New mtDNA loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis. Frick, M.; Panagopoulou, A.; Rees, A. F. & Williams, K. (comps.). Proceedings of the 26th annual symposium on sea turtle biology book of abstracts. Island of Crete, Greece: ISTS 179, 2006.
- ADAMACK, A. T., & GRUBER, B. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in ecology and evolution*, 5(4), 384-387.
- ALMEIDA, A. D. P., SANTOS, A. J. B., THOMÉ, J. C. A., BELINI, C., BAPTISTOTTE, C., MARCOVALDI, M. Â., ... & LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, (1).2011
- ALSTAD, T. I.; SHAMBLIN, B. M.; BAGLEY, D. A.; EHRHART, L. M.; NAIRN, C. J. Isolation and Characterization of tetranucleotide microsatellites from the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *CONSERVATION GENETIC RESOURCES* V. 3, P. 457-460, 2011.
- BALTAZAR-SOARES, M., KLEIN, J. D., CORREIA, S. M., REISCHIG, T., TAXONERA, A., ROQUE, S. M., PASSOS, L.D.; DURÃO, J.; LOMBA, J.P.; DINIS, H.; CAMERON, S.J.K.; STIEBENS, V.A. EIZAGUIRRE, C. Distribution of genetic diversity reveals colonization patterns and philopatry of the loggerhead sea turtles across geographic scales. *Scientific reports*, 10(1), 18001, 2020.
- BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F. Y., BURKE, T. Single-locus and DNA fingerprinting. In: Hoelzel A. R. (ed). *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, p. 225-269, 1992.
- CAMACHO, M.; BOADA, L. D.; ORÓS, J.; CALABUIG, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine pollution bulletin*, v. 64, n. 9, p. 1974–80, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748504>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- COLMAN, L. P.; THOMÉ, J. C. A.; ALMEIDA, A. D. E. P.; BAPTISTOTTE, C., BARATA, P. C. R.; BREDERICK, A. C.; RIBEIRO, F. A.; VILA-VERDE, L.; GODLEY B. J. Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988–2017: reproductive biology and conservation. *Endangered Species Research* 39, 147-158, 2019.
- CRIM, J. L.; SPOTILA, L. D.; O'CONNOR, M.; REINA, R.; WILLIAMS, C. J.; PALADINO, F.V. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11, 2097-2106, 2002.

- DIERICKX, E. G., SHULTZ, A. J., SATO, F., HIRAOKA, T., EDWARDS, S. V. Morphological and genomic comparisons of Hawaiian and Japanese Black-footed Albatrosses (*Phoebastria nigripes*) using double digest RAD seq: implications for conservation. *Evolutionary Applications*, 8 (7), 662-678, 2015.
- DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J., & OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular ecology resources*, 14(1), 209-214. 2014.
- DOYLE J. J., DOYLE J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUTTON, P. H.; FREY, A. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 354-356, 2009.
- DUTTON, P. H.; RODEN, S. E.; STEWART, K. R.; LACASELLA, E.; TIWARI, M.; FORMIA, A.; THOMÉ, J. C.; LIVINGSTONE, S. R.; ECKERT, E.; CHACON-CHAVERRI, D.; RIVALAN, P.; ALLMAN, P. Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conservation Genetics* 14, 625-636, 2013.
- ENCALADA, S. E., LAHANAS, P. N., BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B., MIYAMOTO, M. M., & BOWEN, B. W. (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*, 5, 473-483.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics, 2015.
- FERNANDES, G. W., GOULART, F. F., RANIERI, B. D., COELHO, M. S., DALES, K., BOESCHE, N., ... & SOARES-FILHO, B. Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação*, 14(2), 35-45, 2016.
- FEST, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. Relatório Semestral de Evolução do PMBA/Fest - Síntese Integrativa entre Ambientes. RT-42. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 204 pag. 2023.
- FEST, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. Relatório Anual de Evolução do PMBA/Fest - Síntese Integrativa entre Ambientes. RT-43. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 193 pag. 2023.
- FITZSIMMONS N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 12: p. 432-440, 1995.
- FOLEY A.M.; SCHROEDER B.A.; REDLOW A.E.; FICK-CHILD K.J.; TEAS W.G. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980-98): trends and associations with environmental factors. *J Wildl Dis* 41:29-41, 2005.

FRANCO T.; ZORZAL-ALMEIRA S.; SÁ F.; BIANCHINI A.; DERGAM J.A.; ESKINAZI-SANTANA E.M.; ALBINO J.; SALLES L.S.V.; SANTOS L.G.M.; LAGE A.P.R.; BASTOS A.C. Ex-post impact assessment on a large environmental disaster, *Environmental Challenges*, 100889, 2024.

HALE, M. L.; BURG, T. M.; STEEVES, T. E. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS One* 7, e45170, 2012.

IKONOMOPOULOU, M.P.; OLSZOWY, H.; LIMPUS, C.; FRANCIS, R.; WHITTIER, J. Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. *Mar. Environ. Res.* 71(1), 10-16.2011.

JOMBART T, DEVILLAR S & BALLOUX F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BCM Genetics* 11: 94, 2010.

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

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

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

KICHLER, K.; HOLDER, M. T.; DAVIS, S. K.; MÁRQUEZ-M., R.; OWENS, D. W. Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 819-830, 1999.

KOMOROSKE, L. M. et al. Pollutants and the health of green sea turtle's resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere*, v. 84, n. 5, p. 544-552, 2011.

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

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

LENZ, A. J.; AVENS, L.; BORGES-MARTINS, M. Age and growth of juvenile green turtles *Chelonia mydas* in the western South Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 568, 191-201, 2017.

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

- LUDWIG, S., AMORIM, L., BARCELOS, A.C. ET AL. Going deeper into the molecular ecology of the Southwest Atlantic *Caretta caretta* (Testudinata: Cheloniidae), what do microsatellites reveal to us?. *Marine Biology* 170, 78, 2023.
- MARCOVALDI, M. Â., & CHALOUPKA, M. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endangered Species Research*, 3(2), 133-143.2007.
- MIGUEL, C., COSTA, P. G., BIANCHINI, A., Luzardo, O. L. P., VIANNA, M. R. M., & de DEUS S. M. R. Health condition of *Chelonia mydas* from a foraging area affected by the tailings of a collapsed dam in southeast Brazil. *Science of The Total Environment* 821, 153353. 2022a.
- MIGUEL, C., de DEUS S. M. R., BIANCHINI, A., & VIANNA, M. R. M. Potential adverse effects of heavy metals on clinical health parameters of *Caretta caretta* from a nesting area affected by mining tailings in Brazil. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 2, 100015. 2022b.
- MIGUEL, C., VIANNA, M. R. M., & de DEUS S. M. R. Doce river mining tailings can be an influencing factor in loggerhead turtles' reproductive success in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 196, 115601. 2023
- MONZÓN-ARGUELLO, C.; MUÑOZ, J.; MARCO, A.; LÓPEZ-JURADO, L. F.; RICO, C. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *Conservation Genetics*, v. 9, p. 1045-1049, 2008.
- NARO-MACIEL, E.; BONDIOLI, A. C. V.; MARTIN, M.; ALMEIDA, A. P.A.; BAPTISTOTTE, C.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. A.; SANTOS, A. J. B.; AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: a focus on the southwestern Atlantic. *Journal of Heredity* 103, 792-805, 2012.
- NIKOLIC, N., & CHEVALET, C.. Estimation of effective population size and variation in the 1000 time scale (1.1; pp. 1–26).2014
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, v. 28, p. 2537-2539, 2012.
- PERRAULT, J.; WYNEKEN, J.; THOMPSON, L.J.; JOHNSON, C.; MILLER, D.L. Why are hatching and emergence success low? Mercury and selenium concentrations in nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) and their young in Florida. *Marine Pollution Bulletin*. 62(8), 1671-1682. 2011.
- PIRY, S., LUIKART, G., & CORNUET, J. M M. BOTTLENECK: a program for detecting recent 1029 effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity*, 1030: 502–503, 1999.
- REIS, E. C, SOARES, L. S, VARGAS, S. M, SANTOS, F. R, YOUNG, R. J, BJORN DAL, K. A., BOLTEN, A. B., LÔBO-HAJDU. G. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics* 11, 1467-1477, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS, M. R. de D.; FERREIRA, L. S.; BAPTISTOTTE, C.; GROSSMAN, A.; BELLINI, C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do

Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal science, v. 46, n. 6, p. 491–499, 2009.

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

SANTOS R.G.; MARTINS A.S.; TOREZANI E.; BAPTISTOTTE C.; FARIAS J.N.; HORTA P.A.; WORK T.M.; BALAZS G.H. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: A case study with *Chelonia mydas* off Brazil. Dis Aquat Organ 89:87–95, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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