

**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- 52/ OUT 25

RSE2025 PMBA/FEST-UFES

Vitória,

Outubro de 2025

EQUIPE TÉCNICA

Sarah Maria Vargas (coordenadora)

Marcelo Renan Santos

Camila Miguel

Sarah de Souza Alves Teodoro

Wesley Dondoni Colombo

João Luiz G. Fonseca

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	4
2	METODOLOGIA	4
2.1	COLETA	4
2.2	ANÁLISES	7
2.2.1	Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas.....	7
2.2.2	Avaliação da saúde das tartarugas marinhas.....	9
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	10
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	14
3.1	DIVERSIDADE GENÉTICA.....	15
3.2	PARÂMETROS DE SAÚDE.....	23
3.3	METAIS PESADOS.....	26
3.4	DADOS REPRODUTIVOS.....	28
4	INTEGRAÇÃO COM A FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT).....	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	30
6	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	32
7	REFERÊNCIAS	32

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest-UFES) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento aos objetivos do Programa. Estas alterações foram orientadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) e aprovadas pelo Comitê Interfederativo (CIF), por meio de: (1) Ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição), (2) Proposta Técnica de continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest-UFES” e (3) Ofício SEI Nº 32/2024/CTBio/DIBIO/ICMBio, Nota Técnica nº 1/2024-CTBio/DIBIO/ICMBio e Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024.

As modificações implementadas encontram-se nos seguintes Materiais Suplementares, os quais contemplam todo o período de execução do PMBA/Fest-UFES: 1) MS – Malha amostral, que apresentam as estações amostrais executadas ao longo do tempo por todos os Anexos/Temas, separados por cada marco temporal histórico mencionado acima (“Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Deliberação 803”); 2) Frequência amostral, o qual contempla o histórico da periodicidade amostral (seguindo os mesmos Anexos/Temas contemplados no item 1) e 3) MS – Mapas históricos das malhas amostrais, que apresenta os mapas das malhas amostrais (incluindo as estações) executadas por todos os Anexos/Temas.

Segue o detalhamento temporal, como forma de esclarecer a execução dentro dos marcos históricos: “Ano 1” (setembro de 2018 e setembro de 2019); “Transição” (outubro de 2019 e julho de 2022); “Novo Ciclo” (agosto de 2022 a setembro de 2024) e “Deliberação 803” (outubro de 2024 a março de 2026). O grupo da Ecotoxicologia é uma exceção a esta historicidade, pois iniciou a amostragem referente ao “Novo Ciclo” em janeiro de 2023 e segue com a “Deliberação 803”, na periodicidade já informada.

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/Fest-UFES 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) e na Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024. 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-UFES a fim de determinar os indicadores.

2.1 COLETA

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *Caretta caretta* e *D. coriacea*: O monitoramento das tartarugas-marinhas em área de nidificação foi realizado na Foz do rio Doce durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. A área controle para *C. caretta* foi a Praia do Forte ou

Arembepe (BA). As praias foram monitoradas com 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 Arembepe 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 o 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 (também conhecida como *D-loop*) e os microssatélites do DNA nuclear. Os fragmentos do 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 (DNAm_t) e genotipagem dos microssatélites.

Para amplificação das sequências do DNAm_t 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. As sequências da região controle do DNAm_t foram geradas para ambas as direções (forward e reverse) em sequenciador ABI Prism 3500. A amplificação dos loci microssatélites foi realizada de acordo com os dados da literatura e foram específicos para cada espécie (SHAMBLIN et al., 2009, FITZSIMMONS, 1995, KICHLER et al., 1999, SHAMBLIN et al., 2007, MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008, DUTTON & FREY, 2009, RODEN & DUTTON, 2011, ALSTAD, 2011). Os loci microssatélites gerados foram visualizados e identificados com o software 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 microssatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética foram calculados através do programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012) sendo, número de alelos por loco (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e). A estimativa de riqueza alélica (A_r) foi calculada usando o pacote PopGenReport para R (ADAMACK e GRUBER, 2014). A identidade individual foi estimada pelo programa COLONY 2.0 (JONES & WANG, 2010), através do método de máxima verossimilhança e o cálculo de probabilidade de identidade (PI) no programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número populacional efetivo (N_e) foi calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

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

2.2.2 Avaliação da saúde das tartarugas marinhas

Hemograma: Os hemogramas foram realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) foi realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm na centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos (Tr) foi realizada na câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 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, ureia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises foram realizadas por espectrofotometria (Humastar 200®), utilizando kits Invitro® de acordo com as recomendações do fabricante e eletrólitos por eletrodos de íon seletivo (MEDMAX®) (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 emersão. 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 serem visualizadas, alinhadas e mensuradas utilizando o software Geneious (KEARSE et al., 2012). O índice de heterozigotidade individual (H_i) foi incluído para os marcadores de microssatélites como parâmetro auxiliar no entendimento da perda de alelos e da heterozigotidade nas populações, sendo calculado com o GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). No entanto, a apresentação dos resultados dessa análise foi removida dos gráficos dos indicadores de diversidade genética devido à similaridade entre os valores de H_i com H_o (heterozigotidade observada) e H_e (heterozigotidade esperada), o que resultava em redundância nos resultados. O índice H_i foi mantido apenas para o cálculo do Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT), cujo cálculo é detalhado mais adiante neste mesmo item do relatório. Foi incluída uma análise de demografia populacional, que avalia se as populações de tartarugas sofreram gargalo populacional recente e

histórico, através do pacote de dados Vareff (NIKOLIC & CHEVALET, 2014), o que possibilitou 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. Houve também a substituição de primer utilizado para a amplificação do DNA mitocondrial da tartaruga-de-couro (H950-Dc, COLOMBO et al. 2024), que foi usado no lugar do H950 por apresentar melhor desempenho nas reações de PCR e na qualidade das sequências geradas para a espécie.

Ao longo do monitoramento genético realizado no período do PMBA/Fest-UFES, foi observado que algumas fêmeas de tartarugas-cabeçudas, de tartarugas-de-couro e juvenis de tartarugas-verdes, previamente registradas em coletas anteriores, foram identificadas novamente em campanhas subsequentes. Esses animais foram denominados "recapturas" para os juvenis e "remigrantes" para as 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 ES-Pós global para as três espécies e BA global apenas para tartarugas-cabeçudas e verdes, onde o N amostral se refere ao total de animais coletados da população nas localidades em questão.

No PMBA/Fest-UFES, a análise dos dados genéticos gerados durante os anos de monitoramento contínuo 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, a partir do quinto ano 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 RA2023 (FEST-RT45, 2024). O IGAT foi construído utilizando os dados genéticos gerados de setembro de 2018 a março de 2025, 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 e 24,99), baixo (entre 25 e 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, ano 1 ao 7) e a área controle (BA, até o ano 6). 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 para a espécie, portanto para essa espécie o IGAT foi calculado apenas para ES-Pós.

Durante a preparação deste relatório, foi realizada uma revisão completa no banco de dados genéticos acumulado ao longo dos anos de monitoramento. Nessa etapa, foram identificadas algumas amostras que ainda não tinham sido incluídas nas análises anteriores, seja porque o sequenciamento e/ou a genotipagem só foram concluídos após o fechamento dos relatórios anuais, ou por questões técnicas (como baixa qualidade de algumas amostras) que acabaram impedindo a incorporação de parte dos dados no momento oportuno. Com isso, o conjunto de dados foi atualizado incluindo essas informações que estavam pendentes e recuperando sequências e genótipos que anteriormente estavam registrados como dados ausentes (*missing data*). Essa atualização pode ter causado pequenas diferenças em relação aos resultados apresentados em anos anteriores quando analisados de forma separada, mas o panorama geral das populações e as conclusões do monitoramento permanecem os mesmos. Portanto, essa atualização não compromete a validade dos relatórios anteriores, apenas refina e fortalece as análises realizadas até o momento.

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 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.

Metas 1 e 2: A partir do sétimo ano de monitoramento, por decisão do CIF a partir da Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024, as coletas na área controle (Bahia) foram descontinuadas, mantendo-se apenas a amostragem na área impactada pelo rompimento (Espírito Santo). Embora essa mudança tenha seguido orientações externas ao PMBA/Fest-UFES, é importante destacar que a exclusão da área controle pode comprometer a continuidade das comparações diretas entre áreas impactadas e não impactadas, limitando a interpretação dos dados no contexto mais amplo da avaliação de impactos. Neste relatório, ainda foram realizadas comparações com os dados anteriormente obtidos na Bahia (até o sexto ano de monitoramento). No entanto, a ausência de dados atualizados da área controle impede a avaliação de possíveis mudanças que possam ter ocorrido nesse intervalo, reduzindo o poder analítico das comparações temporais e espaciais. Essa limitação é particularmente sensível para *C. mydas*, pois não há dados genéticos disponíveis do período pré-rompimento para os marcadores microsatélites para a espécie. Para *C. caretta*, apesar de terem sido analisadas amostras anteriores ao monitoramento, o número de indivíduos estudados no período pré-rompimento é pequeno quando comparado ao período pós, o que enfraquece a robustez estatística das análises para os microsatélites. Nos relatórios anteriores, as comparações com a área controle e com o período pré-rompimento foram fundamentais para identificar padrões genéticos, de saúde, de contaminantes e possíveis alterações populacionais, mas a partir deste relatório, essas análises tornam-se mais limitadas.

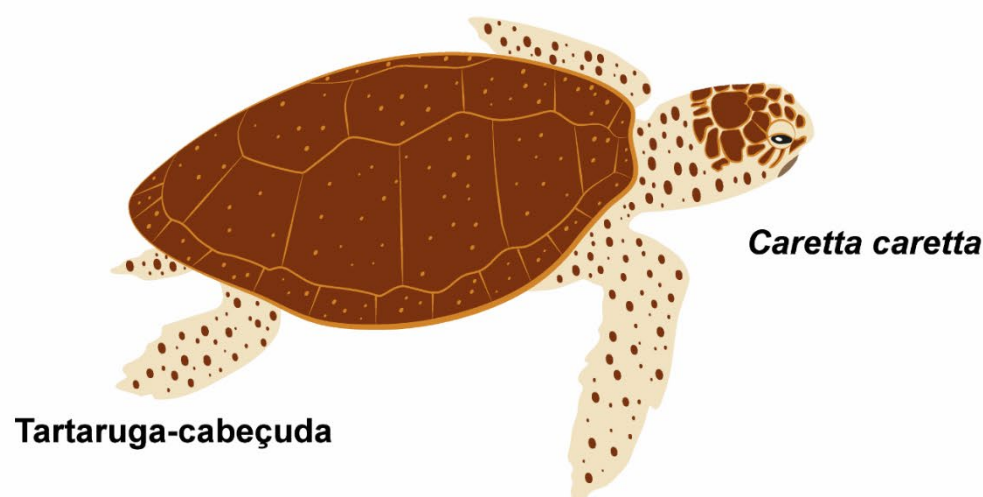
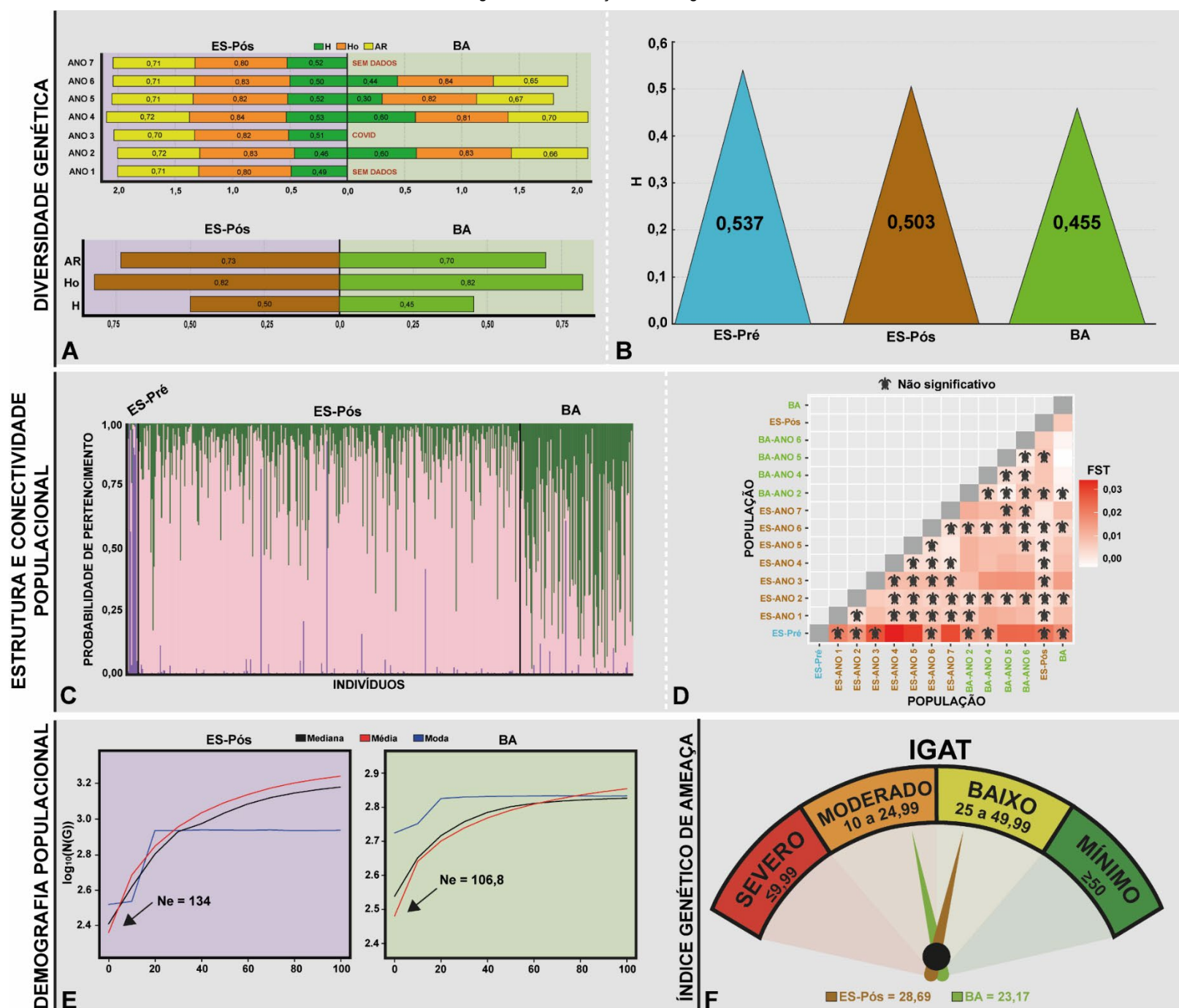
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest-UFES 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-UFES 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 anos do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7), utilizando dados mitocondriais (*D-loop*) e os nucleares (microssatélites) para as populações da tartaruga-cabeçuda (*C. caretta*) do Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). A: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Ano 1 a 7) e áreas (ES-Pós e BA); B: Comparação dos valores de diversidade haplotípica encontrados em ES-Pré, ES-Pós e BA; C: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pré, ES-Pós e BA; D: Matriz de par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Ano 1 a 7), períodos (ES-Pré e ES-Pós) e regiões (ES e BA); E: Gráfico do gargalo populacional gerado pelo programa Varref e valor do Ne contemporâneo estimado pelo NeEstimator para ES-Pós e BA; F: Valores de IGAT e grau de ameaça para ES-Pós e BA. Siglas: H: diversidade haplotípica baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigosidade observada, 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 divergência genética para inferência da 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.



*Nos relatórios anteriores, para o índice tamanho efetivo populacional (Ne), foram incluídos os valores para as populações “Pré” de tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta* - Cc) e de tartarugas-de-couro (*Dermochelys coriacea* - Dc), mas após revisão, identificamos que o número de amostras reduzido disponível para essas populações para a análise em questão (N=9 para Cc e N=2 para Dc) inviabiliza a obtenção de estimativas estatisticamente confiáveis, já que o Ne é dependente do número de amostras (N), dentre outras variáveis. Por esse motivo, a partir deste relatório não serão mais apresentados os valores de Ne e IGAT para as populações “Pré” de tartarugas-cabeçudas e tartarugas-de-couro.

** Durante a revisão dos dados, foi detectado um equívoco na estimativa do tamanho efetivo populacional (Ne), baseado nas análises de microssatélites (DNA nuclear) de *Caretta caretta* nos relatórios anteriores, resultando em um valor de Ne mais elevado para BA do que para ES-Pós. Esta estimativa foi corrigida e atualizada neste relatório, indicando um padrão oposto, com valores de Ne superiores para ES-Pós em comparação com BA.

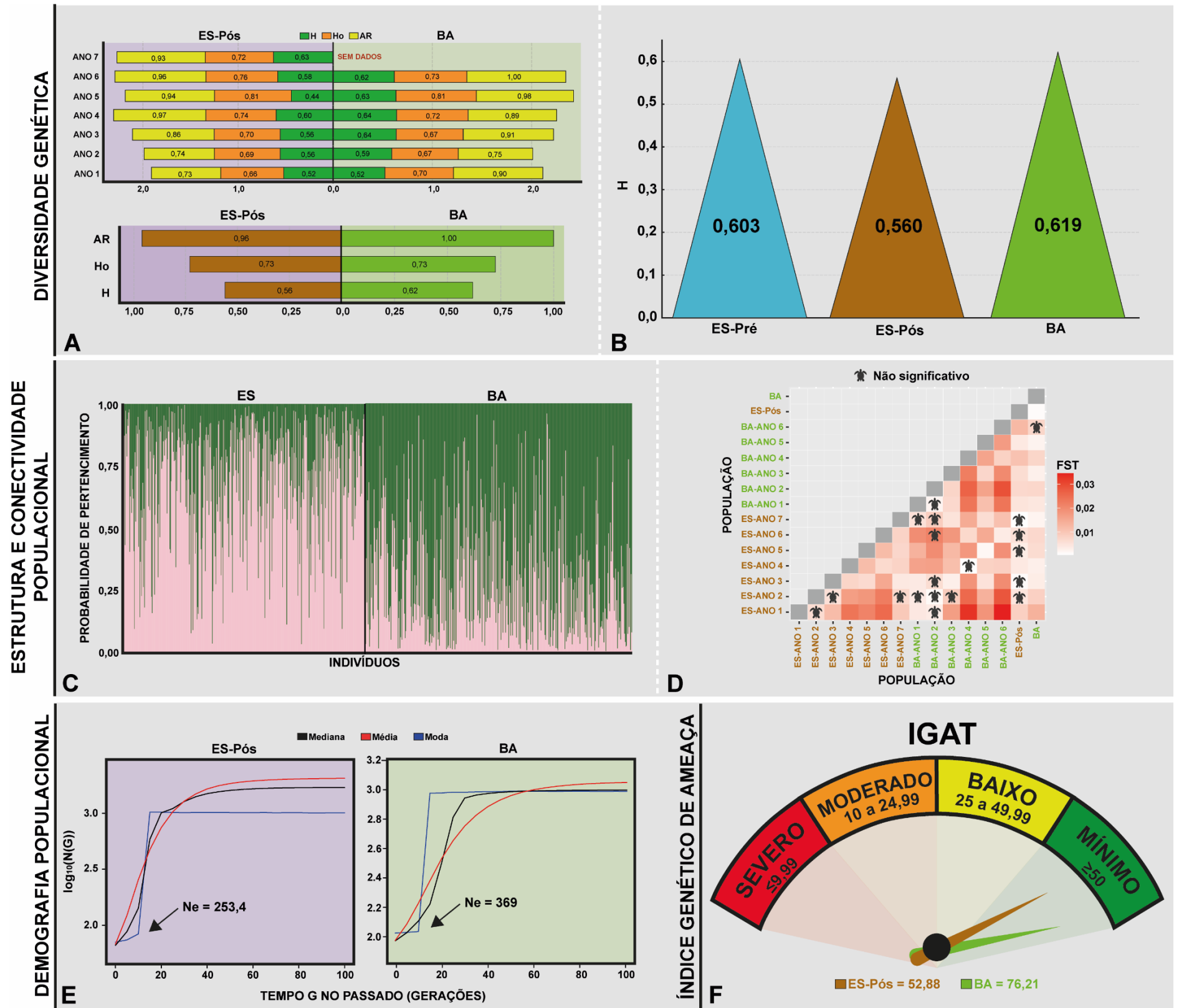
Ressaltamos que essas atualizações não comprometem os demais resultados ou conclusões gerais dos relatórios anteriores. Apesar dos fatos apontados, todos os valores gerados a partir dos dados do marcador mitocondrial, inclusive para as populações “Pré” das três espécies (Ex.: número de haplótipos, diversidades haplotípicas e nucleotídicas e conectividade populacional) e todos os demais valores gerados a partir dos marcadores microssatélites (Ex.: riqueza alélica, heterozigosidades esperadas e observada, gargalo populacional e conectividade populacional) estão corretos e não houve mudança nos padrões e tendências gerais encontrados ao longo do PMBA/Fest-UFES.

A população da tartaruga-cabeçuda no período ES-Pós continua apresentando uma tendência de redução (6,33%) na diversidade haplotípica com relação à ES-Pré, embora o valor da diversidade de ES-Pós tenha sido maior que o da população controle BA (Figuras 1A e 1B). Essa diferença de valores entre as regiões pode ser explicada por fatores evolutivos como a deriva genética, especialmente em populações pequenas, como já observado para a tartaruga-de-couro (VARGAS et al., 2022). Fatores ecológicos exclusivos das populações, como diferentes níveis de fidelidade das fêmeas ao local de desova (MARCOVALDI et al. 2010) e o retorno natal (filopatRIA), que podem limitar o fluxo gênico entre as populações (BALTAZAR-SOARES et al., 2020), também podem explicar diferentes variações nos índices de diversidade para o marcador mitocondrial. Além disso, é importante ressaltar que os dados da BA são correspondentes a apenas quatro temporadas e vão apenas até o sexto ano de monitoramento, enquanto ES-Pós corresponde às sete temporadas reprodutivas. A falta de novas amostras da área controle também pode estar influenciando no grau de diferença observado entre as populações. Já para os marcadores nucleares microssatélites, foi detectada uma baixa, porém significativa ($p \leq 0,001$) estrutura populacional espacial (entre ES-Pós e BA), evidenciada pelo DAPC e pelos valores de F_{ST} pareados (Figuras 1C e 1D). As comparações com ES-Pré ficaram comprometidas por causa do baixo N amostral para os marcadores microssatélites (conforme nota de rodapé da Figura 1). Os resultados encontrados sugerem um nível baixo de conectividade e fluxo gênico entre as áreas, que pode eventualmente ser mediado pelos machos (LUDWIG et al. 2023), mas também destacam diferenças significativas nas composições genéticas, que podem estar relacionadas ao comportamento filopátrico das fêmeas de tartaruga-cabeçuda. O tamanho populacional efetivo (N_e) estimado para a tartaruga-cabeçuda foi de 134,0 para a área atingida (ES-Pós) e 106,8 para a área controle (BA) (Figura 1E). Apesar do valor aparentemente mais alto para o ES, é importante destacar que ambas as populações já apresentavam sinais de vulnerabilidade genética antes do rompimento da barragem, o que reforça a necessidade do monitoramento contínuo. O N_e representa o número de indivíduos que efetivamente contribuem para a reprodução e, portanto, para a transmissão da diversidade genética às próximas gerações. Assim, esse valor pode ser influenciado pela estruturação das populações e por comportamentos reprodutivos da espécie, como múltipla paternidade, poliginia e poliandria (AMORIM et al., 2025), além de também ser afetado pelo número de amostras analisadas para cada área. No caso da comparação em questão, o maior número de indivíduos amostrados para ES e a ausência de atualização dos dados da área controle (BA) após o sexto ano também podem ter contribuído para essa diferença entre as áreas.

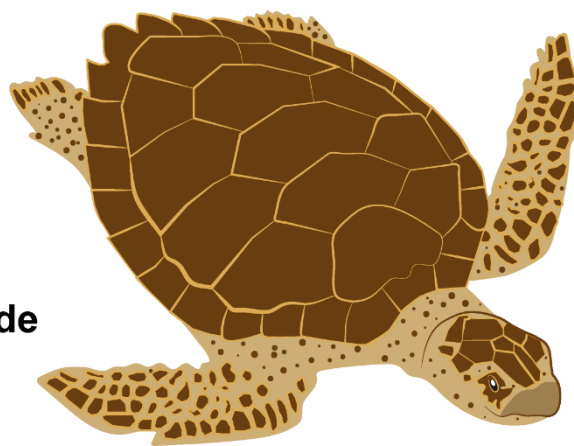
A análise da demografia populacional histórica mostrou a presença de um gargalo populacional significativo para a espécie nas duas áreas (Figura 1), revelando vulnerabilidade genética. O Índice Geral de Ameaça às Tartarugas (IGAT) revelou um índice de ameaça classificado como "baixo" (IGAT=28,69) para tartaruga-cabeçuda no ES-Pós e "moderado" (IGAT=23,17) para a área controle BA (Figura 1F). A diferença do IGAT para ES-Pós e BA deve ser interpretada com cautela, já que grandes diferenças amostrais podem estar influenciando esses resultados. Resumindo, a população de ES-Pós continua apresentando uma tendência de redução na diversidade haplotípica comparada com ES-Pré

(6,33%), com uma estrutura populacional baixa com BA, porém significativa, sugerindo certo nível de conectividade entre as áreas.

Figura 2: Indicadores de diversidade genética. Distribuição dos índices de diversidade genética, estrutura genético-populacional e tamanho efetivo populacional monitorados ao longo dos anos do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: ano 7), utilizando dados mitocondriais (D-loop) e os nucleares (microssatélites) para as populações de tartaruga-verde (*C. mydas*) do Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). A: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Ano 1 a 7) e áreas (ES-Pós e BA); B: Comparação dos valores de diversidade haplotípica encontrados em ES-Pré, ES-Pós e BA; C: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pós e BA; D: Matriz par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Ano 1 a 7) e regiões (ES e BA); E: Gráfico do gargalo populacional gerado pelo programa Varref e valor do Ne contemporâneo estimado pelo NeEstimator para ES-Pós e BA; F: Valores de IGAT e grau de ameaça para ES-Pós e BA. Siglas: H: diversidade haplotípica, baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigiosidade observada, Ar: Riqueza alélica, Ne: tamanho populacional efetivo, baseados nas análises dos microssatélites. 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 divergência genética para inferência da 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.



Tartaruga-verde



Chelonia mydas

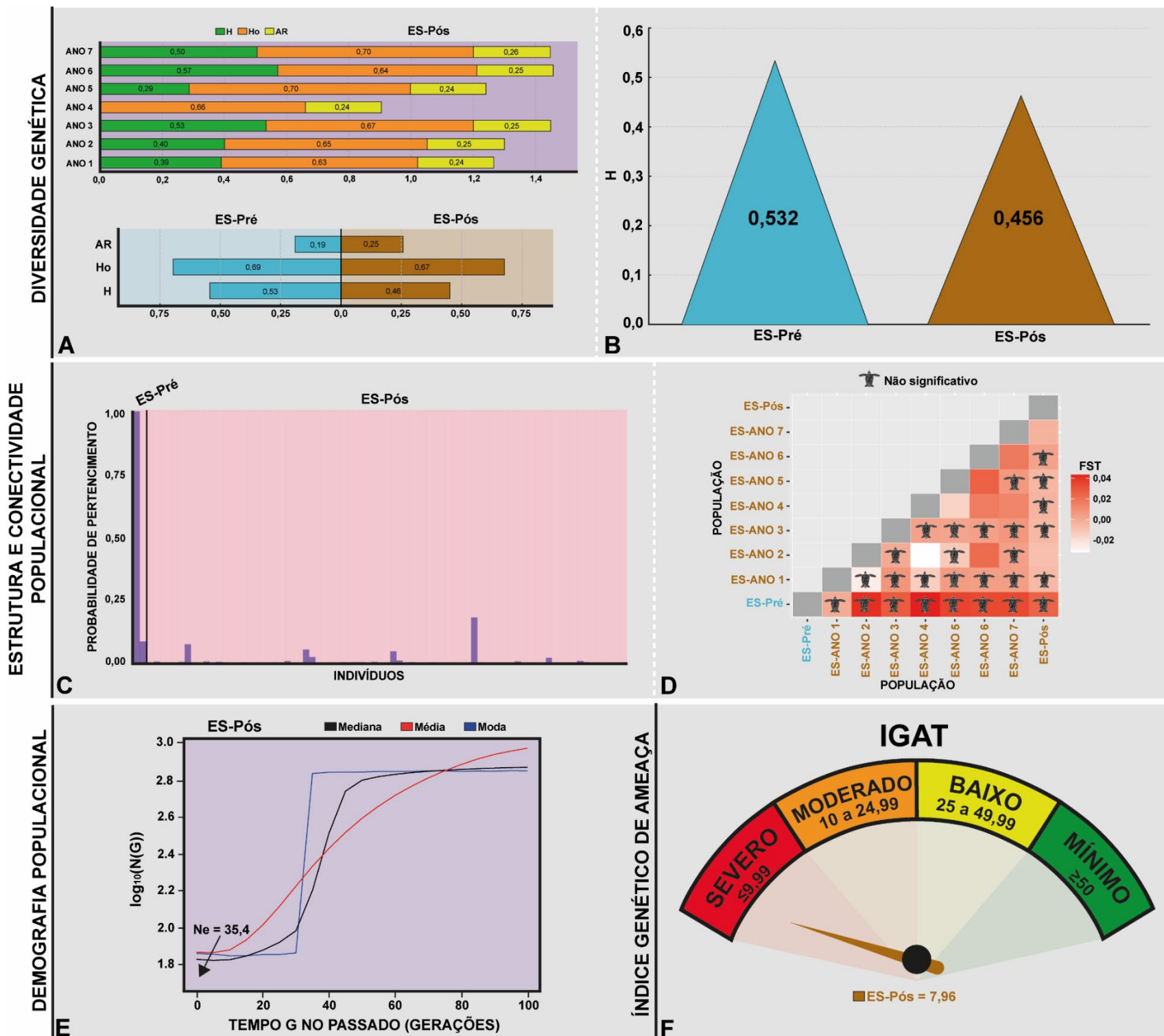
A população de tartarugas-verdes no período ES-Pós continua exibindo uma tendência de redução na diversidade genética, com uma perda de 7,13% na diversidade haplotípica em comparação ao período ES-Pré. Essa redução sugere impactos sobre a população desde o rompimento da barragem de Fundão, com a diversidade haplotípica em ES-Pós sendo 9,53% menor que a área controle BA (Figura 1A e 1B). No ano 6 do monitoramento PMBA-FEST, foi identificado um novo haplótipo na BA, ainda não descrito na literatura. Entretanto, um haplótipo, presente anteriormente no ES-Pré, desapareceu no ES-Pós, mas ainda permanece na área controle (BA), indicando uma perda de linhagens genéticas específicas na área impactada.

Para os marcadores nucleares microssatélites, foram identificadas diferenças populacionais estatisticamente significativas tanto temporais (entre alguns pares de anos) quanto espaciais (entre ES e BA), embora essas diferenças sejam baixas. Essa estrutura populacional foi evidenciada pelo DAPC e pelo F_{ST} pareado significativo ($p \leq 0,001$). A análise DAPC revelou um alto grau de mistura e conectividade genética entre a área afetada (ES) e a área controle (BA), sugerindo um compartilhamento de áreas de origem natal para esses juvenis (Figura 1C e D).

A demografia histórica da população indicou um tamanho efetivo (N_e) para ES 31,33% menor que o valor estimado para BA. Esse declínio possivelmente está associado a um gargalo populacional ocorrido há cerca de 15 gerações para ES e para BA, sendo menos abrupto para BA, o que ainda indica maior estabilidade em comparação à área afetada (Figura 1E). Para as tartarugas-verdes da área impactada (ES-Pós), o Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) foi de 52,88, enquanto na área controle (BA) o valor foi de 76,21, ambos classificados como “risco de ameaça mínimo” (Figura 1F). Contudo, mesmo dentro da classificação de risco mínimo, essas populações ainda são geneticamente vulneráveis, considerando que já apresentavam níveis reduzidos de diversidade antes do rompimento da barragem. Os valores encontrados, quando analisados em conjunto com os outros parâmetros, podem estar indiretamente relacionados aos efeitos contínuos do rompimento da barragem sobre a diversidade genética das tartarugas-verdes. Deve-se também considerar que as amostras são de indivíduos juvenis, ou seja, que ainda não estão se reproduzindo. Como nem todos os filhotes e juvenis atingem a fase adulta, isso pode influenciar os parâmetros genéticos estimados, uma vez que os cálculos para N_e e IGAT consideram os indivíduos que efetivamente contribuem geneticamente para as próximas gerações. Assim, o risco mínimo indicado pelo IGAT pode estar associado ao fato de as amostras envolverem indivíduos juvenis, o que influencia diretamente o cálculo do N_e e, por consequência, o próprio índice. Resumindo, observa-se uma redução na diversidade genética da população do ES após o rompimento da barragem de Fundão, com perda de haplótipos e baixo tamanho populacional efetivo (N_e). A diversidade haplotípica no ES-Pós continua menor em comparação à ES-Pré e à BA, indicando impactos desde o rompimento da barragem. A estrutura genética apresentou variações temporais e espaciais, com evidências de mistura genética entre as áreas de ES e BA, sugerindo compartilhamento de áreas de origem dos juvenis. A análise demográfica revelou um gargalo populacional histórico. O IGAT para o ES-Pós foi inferior ao da BA-Pós, apontando

maior vulnerabilidade genética na área afetada. Essa situação indica uma possível influência contínua do rompimento da barragem, comprometendo a recuperação da população.

Figura 3: Indicadores de Diversidade Genética. Distribuição dos índices de diversidade genética, estrutura genético-populacional e tamanho efetivo populacional monitorados ao longo dos anos do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: ano 7), utilizando dados mitocondriais (*D-loop*) e nucleares (microssatélites) para as populações da tartaruga-de-couro (*D. coriacea*) do Espírito Santo (ES). A: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Ano 1 a 7) e períodos (ES-Pré e ES-Pós); B: Comparação dos valores de diversidade haplotípica encontrados em ES-Pré e ES-Pós; C: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pré e ES-Pós; D: Matriz par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Ano 1 a 7) e períodos (ES-Pré e ES-Pós); E: Gráfico do gargalo populacional gerado pelo programa Varref e valor do Ne contemporâneo estimado pelo NeEstimator para ES-Pós; F: Valores de IGAT e grau de ameaça para ES-Pós. Siglas: H: diversidade haplotípica baseada na análise do DNA mitocondrial. Ho: heterozigiosidade observada, 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 divergência genética para inferência da 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.



*Nos relatórios anteriores, para o índice tamanho efetivo populacional (N_e), foram incluídos os valores para as populações “Pré” de tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta* - Cc) e de tartarugas-de-couro (*Dermochelys coriacea* - Dc), mas após revisão, identificamos que o número de amostras reduzido disponível para essas populações para a análise em questão ($N=9$ para Cc e $N=2$ para Dc) inviabiliza a obtenção de estimativas estatisticamente confiáveis, já que o N_e é dependente do número de amostras (N), dentre outras variáveis. Por esse motivo, a partir deste relatório não serão mais apresentados os valores de N_e e IGAT para as populações “Pré” de tartarugas-cabeçudas e tartarugas-de-couro.

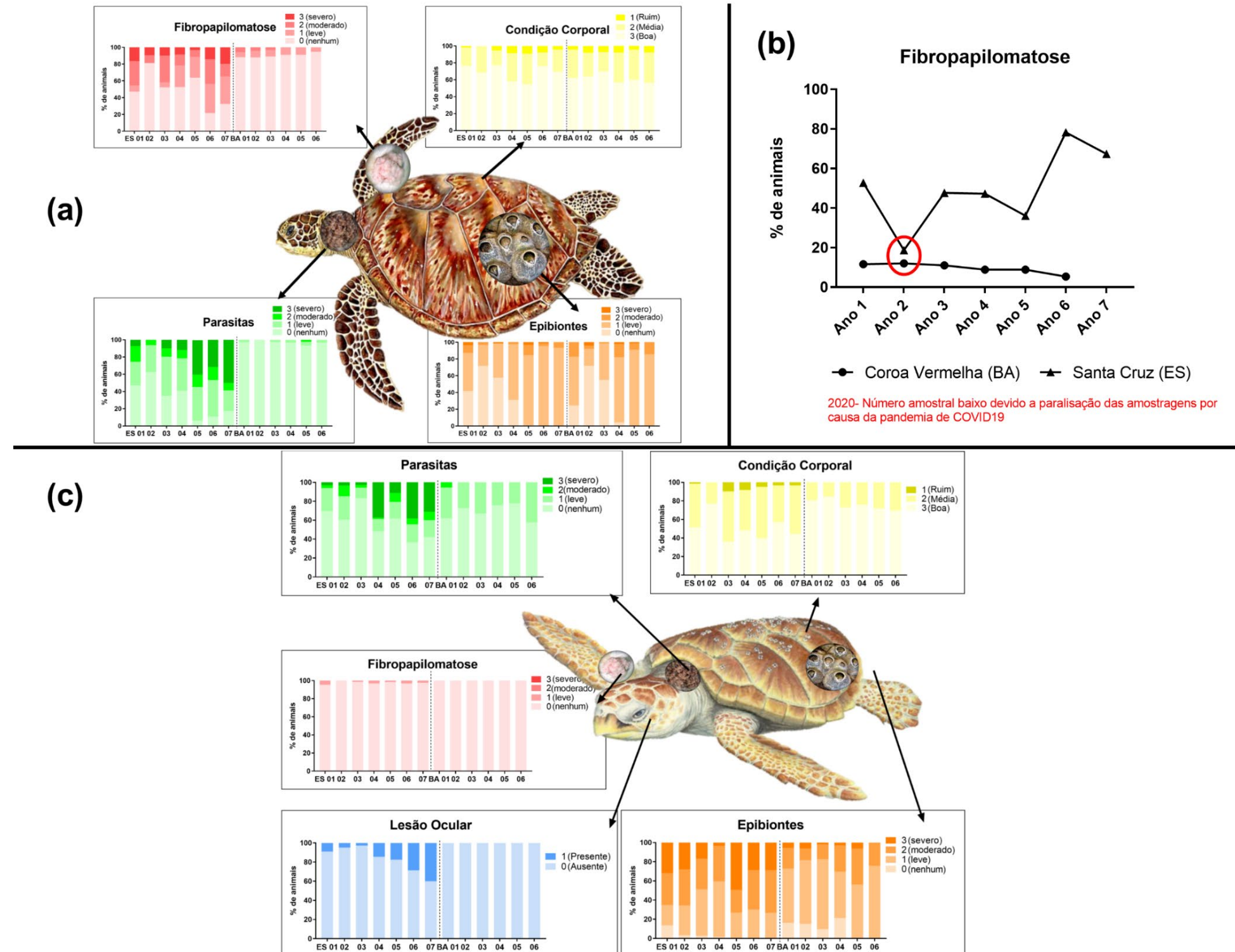
Ressaltamos que essa atualização não compromete os resultados ou conclusões gerais dos relatórios anteriores. Apesar do fato apontado, todos os valores gerados a partir dos dados do marcador mitocondrial, inclusive para as populações “Pré” das três espécies (Ex.: número de haplótipos, diversidades haplotípicas e nucleotídicas e conectividade populacional) e todos os demais valores gerados a partir dos marcadores microssatélites (Ex.: riqueza alélica, heterozigiosidades esperadas e observada, gargalo populacional e conectividade populacional) estão corretos e não houve mudança nos padrões e tendências gerais encontrados ao longo do PMBA/Fest-UFES.

A população reprodutiva de tartarugas-de-couro na área afetada pelo rompimento da barragem de Fundão apresentou uma tendência de redução na diversidade genética ao longo dos anos de monitoramento. A comparação entre os períodos ES-Pré e ES-Pós mostrou uma redução de 14,19% na diversidade haplotípica. Esse declínio pode estar relacionado ao gargalo populacional enfrentado pela espécie ao longo de muitas gerações (DUTTON et al. 1999) e/ou à ação da deriva genética, que é mais acentuada em populações pequenas e vulneráveis como a da tartaruga-de-couro no Brasil (VARGAS et al. 2022). A análise de diferenciação genética com microssatélites indicou valores de F_{ST} não significativos entre os períodos ES-Pré e ES-Pós, resultado que pode ser influenciado pelo baixo número amostral no ES-Pré para essa análise. Para o DNAmT (com um número amostral mais robusto para ES-Pré), o F_{ST} entre os períodos também foi baixo (0,004) e não significativo, sugerindo que, até o momento, não foram detectadas evidências de diferenciação genética temporal. Esse padrão pode refletir uma tendência de homogeneização genética, o que poderia indicar menor capacidade de recuperação frente a mudanças ambientais. Assim, a continuidade do monitoramento é fundamental para avaliar essa tendência. A análise da demografia histórica revelou um padrão de redução populacional (evento de gargalo genético) ao longo das últimas 40 gerações, pelo menos (Figura 1E). Esse evento indica que o tamanho dessa população foi drasticamente reduzido, o que pode ter consequências profundas para sua capacidade de adaptação e recuperação. O Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) exibiu um valor extremamente baixo para ES-Pós (IGAT=7,96), sendo categorizado como “severo”. Esses resultados indicam que a população de tartarugas-de-couro da área afetada está extremamente ameaçada. A perda de diversidade genética, associada ao reduzido tamanho efetivo populacional e à degradação da saúde genética, aumenta significativamente o risco dessa população. Considerando que a espécie já está classificada como “criticamente em perigo” (BRASIL, 2022), torna-se essencial a implementação de estratégias de conservação. Além disso, as análises genéticas permitiram identificar não apenas as fêmeas que foram flagradas durante a desova, mas também estimar a presença de fêmeas que não foram amostradas em campo. Entre os indivíduos analisados no Ano 7, 33,3% eram fêmeas novas, 53,3% eram filhotes que, por meio do DNA, indicaram a presença de mães não flagradas, e 13,3% eram fêmeas remigrantes. Esses dados reforçam a importância da genética para complementar as informações de campo e que não seriam possíveis apenas com a observação direta.

Resumindo, a população de tartarugas-de-couro na área afetada pelo rompimento da barragem de Fundão apresenta tamanho efetivo populacional extremamente baixo e uma redução na diversidade genética ao longo dos 6 anos e meio de monitoramento. Comparando os períodos ES-Pré e ES-Pós, observou-se uma queda na diversidade haplotípica, indicando um declínio significativo na variabilidade genética, que pode estar associado ao baixo N_e e à ação da deriva genética, mais acentuada em populações pequenas e vulneráveis, como a da tartaruga-de-couro. O IGAT aponta uma condição de ameaça severa na saúde genética da população. Esses dados reforçam a grave vulnerabilidade da tartaruga-de-couro na região afetada.

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) ao longo dos anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (b) Prevalência (%) de fibropapilomatose em *Chelonia mydas* juvenis na área controle (Coroa Vermelha, BA) e na área impactada (APA Costa das Algas, Santa Cruz, ES) ao longo dos 7 anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (c) Indicadores externos de saúde avaliados no exame físico em *Caretta caretta*, em Povoação ou Regência (ES), Praia do Forte ou Arembépe (BA), ao longo dos 7 anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7).



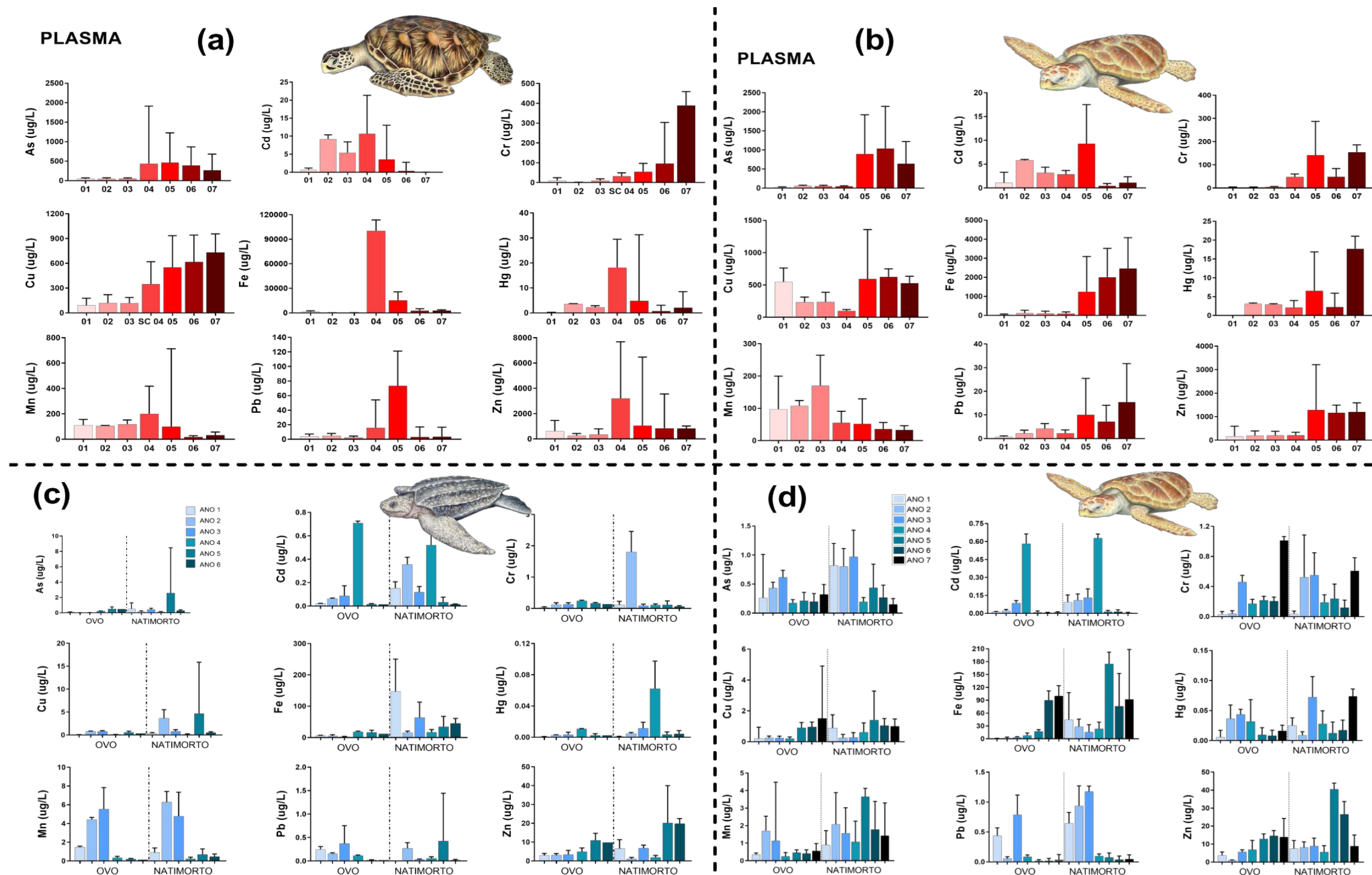
Ao longo dos anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES, observou-se um aumento significativo na prevalência de fibropapilomatose em tartarugas-verdes juvenis (*Chelonia mydas*) na APA Costa das Algas, Santa Cruz (SC). No ano 7, 67,4% dos indivíduos capturados na APA Costa das Algas apresentaram a doença, destas, 15,2% tiveram escore moderado e 19,6% escore severo. Apesar da diminuição de 10% em relação ao ano anterior, é a segunda maior prevalência já registrada. A análise dos animais recapturados em Santa Cruz revelou que, dos 18 animais recapturados no Ano 7, somente 4 não apresentaram a doença, 5 desenvolveram tumores entre a primeira captura e a recaptura e 9 já estavam com a doença desde a primeira amostragem, indicando uma progressão rápida da doença na população. Além disso, 82,6% dos animais apresentaram infestação por ectoparasitas e, destes, 50% apresentaram escore severo. Esta é a maior porcentagem deste escore já registrada. É importante considerar que este relatório se baseia em dados coletados durante apenas uma campanha, realizada no período chuvoso. Historicamente, observamos um aumento significativo no número de animais com fibropapilomas e parasitas nas campanhas de coleta realizadas durante o período seco. É possível que as porcentagens atuais aumentem ou se igualem às do Ano 6, uma vez que a próxima campanha pode revelar um cenário diferente. A elevada prevalência de fibropapilomatose e parasitismo observada na área impactada sugere fortemente a influência de fatores ambientais locais na saúde das tartarugas marinhas. A fibropapilomatose é uma doença frequentemente associada à poluição, contaminação química e alterações na qualidade da água. Paralelamente, o aumento do parasitismo pode indicar tanto uma imunossupressão nos animais quanto desequilíbrios ambientais, como mudanças na qualidade da água, a presença de poluentes ou até mesmo as alterações climáticas (FOLEY et al., 2005; SANTOS et al., 2010). No ano 7, as tartarugas-cabeçudas que desovam na Foz do rio Doce, apresentaram persistente deterioração da condição corporal e continuam a apresentar fibropapilomas. A infestação por ectoparasitas atingiu 58% das tartarugas da área impactada, representando o segundo maior índice de parasitismo registrado ao longo da série temporal e indicam um agravamento do quadro sanitário da população. Observou-se um incremento substancial na prevalência de lesões oculares, com um aumento de 40% entre o ano 6 e o 7. Ao longo dos anos, a porcentagem de lesões oculares foi: 9% no Ano 1; 5% no Ano 2; 2,8% no Ano 3; 14,5% no Ano 4; 17,5% no Ano 5; 28,6% no Ano 6; e 40% no Ano 7. A presença de fibropapilomas e lesões oculares, associada à deterioração da condição corporal e ao aumento da carga parasitária, sugere a ocorrência de imunossupressão e comprometimento da saúde dos indivíduos, possivelmente relacionados à exposição ao MLD.

Resumindo, as tartarugas-verdes juvenis na área de alimentação impactada continuam a apresentar uma alta incidência de fibropapilomatose e ectoparasitismo. Na Foz do rio Doce, área de desova, as tartarugas-cabeçudas continuam a apresentar elevada prevalência de ectoparasitas e fibropapilomas, com um aumento notável nos casos de lesões oculares, indicando um comprometimento generalizado da saúde dos animais, provavelmente ligado à contaminação ambiental. Em ambas as regiões, a degradação da qualidade ambiental está afetando negativamente a saúde das tartarugas marinhas, o que pode ter sérias consequências para a sobrevivência e reprodução dessas espécies. A ausência de coletas na área controle durante o Ano 7 representa uma lacuna significativa e que limita a distinção entre as variações naturais na saúde das tartarugas e os impactos diretamente relacionados às

atividades humanas, impedindo uma compreensão mais precisa do verdadeiro estado de saúde e nível de contaminação na região.

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, do Ano 1 ao Ano 7 (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (b) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES, durante os anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (c) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Dermochelys coriacea* capturadas em Povoação e Regência, ES, durante os anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (d) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas *Caretta caretta* capturadas em Povoação e Regência, ES, durante os anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7).



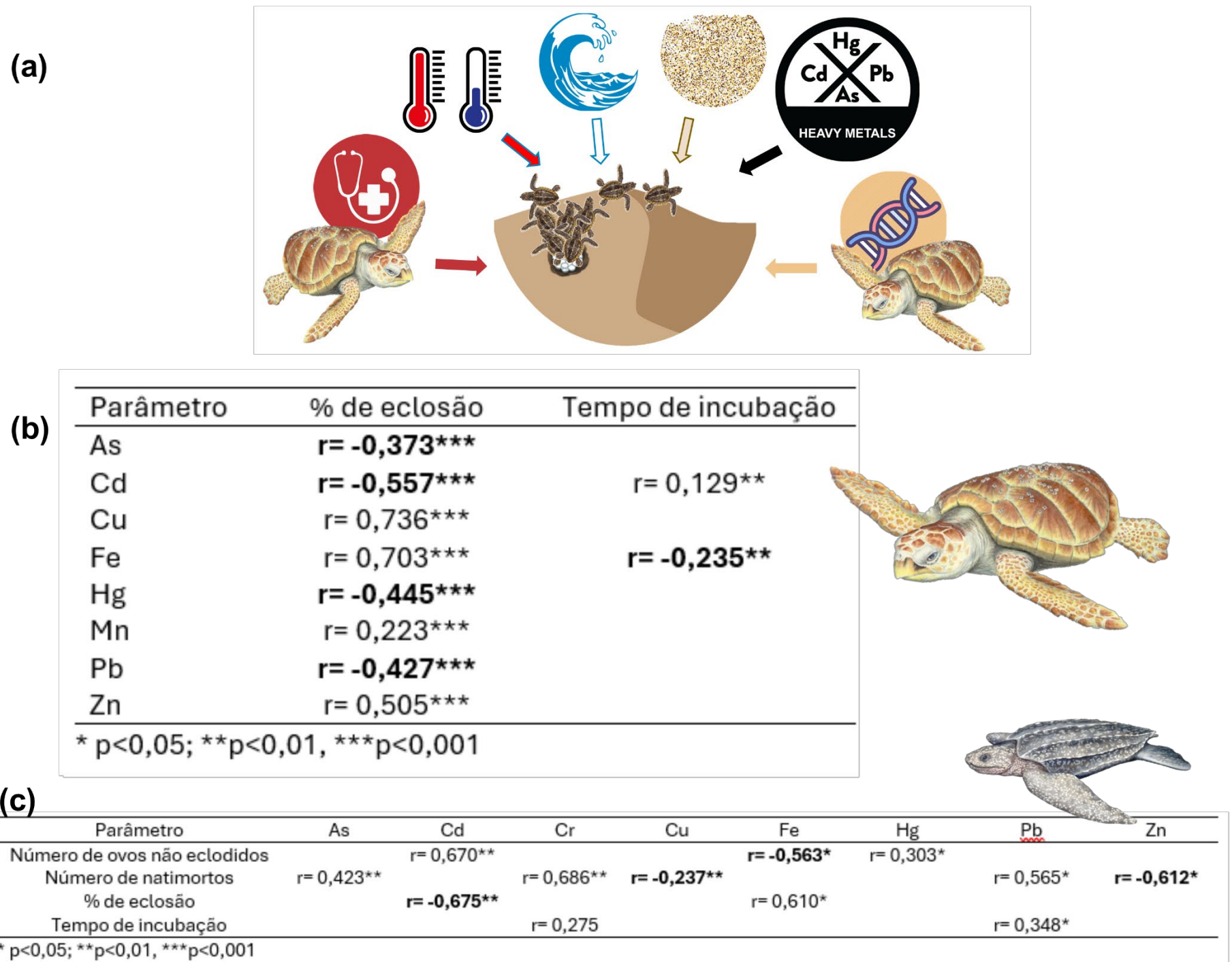
A análise temporal das concentrações de metais no plasma de tartarugas-verdes juvenis (*Chelonia mydas*) que se alimentam na área impactada revelou padrões distintos ao longo dos anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES (outubro de 2018 a março de 2025). Observou-se aumento dos níveis de arsênio (As) do primeiro ao quarto ano, seguido de estabilização dos níveis elevados nos dois anos subsequentes. Os níveis de cádmio (Cd), mercúrio (Hg), ferro (Fe), manganês (Mn), chumbo (Pb) e zinco (Zn) apresentaram flutuações ao longo do tempo, com concentrações maiores no ano 4, exceto pelo arsênio e chumbo, cujas maiores concentrações foram no ano 5. O cobre (Cu) e o cromo (Cr) demonstraram um aumento contínuo ao longo do período de estudo, atingindo os maiores valores no sétimo ano.

A análise temporal das concentrações de metais em plasma, ovos e natimortos de tartarugas marinhas na região da Foz do rio Doce revelou uma variabilidade significativa ao longo dos anos, com picos nas concentrações de arsênio e zinco no plasma da tartaruga-cabeçuda nos anos 5, 6 e 7 do monitoramento PMBA/Fest-UFES. A detecção de todos os metais analisados nos ovos recém-colocados das duas espécies indica uma transferência materna dos contaminantes. No ano 7, os ovos tiveram os níveis mais elevados de cromo, cobre e ferro já observados. Já nos natimortos, foram o mercúrio e o cromo que apresentaram as maiores concentrações já registradas. Os níveis mais elevados de alguns metais nos natimortos sugerem a bioacumulação de metais provenientes do sedimento do ninho durante a 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 dinâmica da região, com seus eventos de alta energia e consequente ressuspensão de sedimentos, expõe continuamente as tartarugas marinhas ao MLD. Tartarugas-verdes juvenis são especialmente vulneráveis por permanecerem décadas em áreas de alimentação impactadas, sofrendo exposição crônica e apresentando altas concentrações de metais como: cromo, mercúrio, ferro e chumbo. Além da transferência materna, seus ovos ficam expostos ao MLD no ninho por aproximadamente 60 dias, sendo assim, essa exposição durante o desenvolvimento embrionário, um estágio extremamente sensível, pode causar efeitos disruptivos que se manifestam mesmo após a eclosão. Em resumo, a contaminação por metais é um problema sério para ambas as espécies na área impactada. As tartarugas-verdes juvenis mostram evidências de exposição crônica, enquanto a presença de metais no plasma e em ovos e embriões de tartarugas-cabeçudas e tartarugas-de-couro sugere um risco significativo para o desenvolvimento embrionário, o sucesso reprodutivo e a saúde. A dinâmica ambiental local agrava essa exposição contínua, aumentando a vulnerabilidade desses animais.

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 anos do PMBA/Fest-UFES (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 setembro de 2024: Ano 6; outubro de 2024 a março de 2025: Ano 7). (c) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos de *Dermochelys coriacea* de Povoação e Regência, ES, Brasil, ao longo dos anos do PMBA/Fest-UFES.



O sucesso reprodutivo das tartarugas marinhas na foz do rio Doce é influenciado por uma complexa combinação de fatores ambientais e poluição. Embora elementos como temperatura, umidade, tipo de solo, inundações, saúde da mãe e genótipo afetem o sucesso reprodutivo, nossos estudos revelaram que os metais pesados, principalmente os não essenciais (arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo) têm um impacto negativo na eclosão dos ovos das tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) e tartarugas-de-couro (*Dermochelys coriacea*).

As correlações negativas entre a concentração de metais não essenciais (As, Cd, Hg e Pb) nos ovos e natimortos e a taxa de eclosão sugere um mecanismo de toxicidade sobre o desenvolvimento embrionário. O aumento do tempo de incubação associado a níveis elevados de cádmio (*Caretta caretta*), crômio e chumbo (*Dermochelys coriacea*) e a correlação positiva entre os metais não essenciais (As, Cd, Cr, Hg e Pb) e o número de ovos não eclodidos e natimortos em *D. coriacea* corroboram essa hipótese. Por outro lado, a correlação positiva entre os metais essenciais (Cu, Fe, Mn, Zn) e a taxa de eclosão indica a importância desses elementos para o metabolismo embrionário. A persistência das correlações sugere que a influência dos contaminantes nos parâmetros reprodutivos das tartarugas não é um evento isolado ou uma coincidência. Pelo contrário, indica que existe uma relação contínua e provável causa-efeito entre os níveis de contaminantes no ambiente ou nos tecidos das tartarugas e os dados reprodutivos. Essa observação consistente ao longo de vários anos reforça a ideia de que a contaminação é um problema crônico e persistente, impactando diretamente a saúde reprodutiva da população de tartarugas. Isso valida a importância de monitorar esses contaminantes como fatores críticos para a conservação da espécie. Mesmo que outros fatores ambientais (temperatura, umidade etc.) também influenciem as taxas de eclosão, os contaminantes aparecem como um componente significativo na equação da saúde reprodutiva.

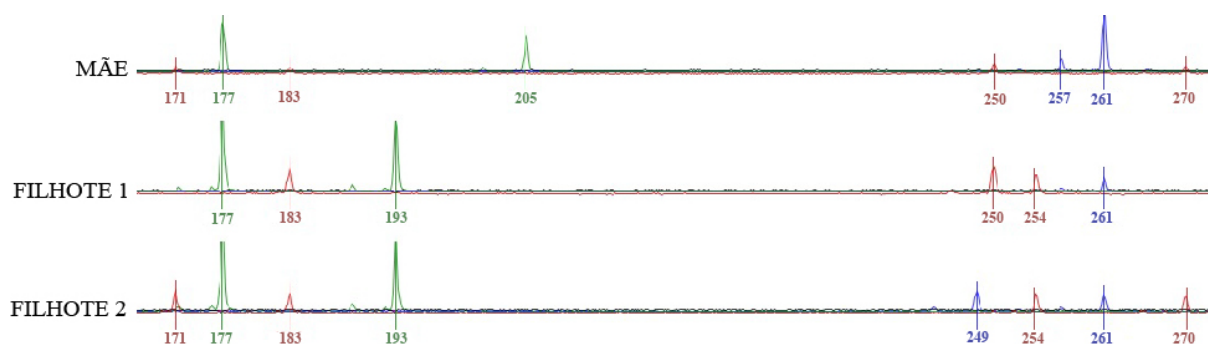
Apesar de as correlações observadas se manterem, é crucial reconhecer que a redução no número amostral e a interrupção da coleta de amostras de ovos das tartarugas-de-couro no Ano 7 comprometem a confiabilidade e a capacidade de generalização dos resultados. Essa diminuição amostral pode mascarar variações sutis, porém importantes, na reprodução das tartarugas, dificultando a detecção de tendências reais de melhora ou piora ao longo do tempo. Por exemplo, se houver uma diminuição sutil, mas importante, em um dado reprodutivo devido à poluição, uma amostra menor pode não ser suficiente para identificar essa diferença como estatisticamente significativa.

4 INTEGRAÇÃO COM A FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT)

Inferência da presença de fêmeas de tartarugas-de-couro não amostradas a partir dos dados genéticos de filhotes

No Ano 6 (2023/24), assim como no Ano 4 (2021/22), as análises genéticas revelaram que uma fêmea de tartaruga-de-couro coletada sem marcas em Povoação (em parceria com a FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR) era a mesma de uma coleta anterior realizada no Ano 1 (2018/19) do PMBA/Fest-UFES. A continuidade do monitoramento vem evidenciando que o registro de fêmeas da espécie sem marcas, mas previamente amostradas, não é um evento isolado. Esse fenômeno sugere que a perda de marcas pode ser comuns entre as tartarugas-de-couro no ES, o que pode gerar um viés nas estimativas populacionais (RRDM-RT39D, 2022). Além disso, um episódio ocorrido no Ano 5 (2022/23), no qual foi possível identificar geneticamente e incluir nas análises um filhote natimorto que não possuía parentesco com as fêmeas já registradas, contribuiu para melhorar as estimativas de diversidade genética de uma população com número reduzido de indivíduos. Entre os indivíduos analisados no ano 7, por exemplo, 53,3% eram filhotes provenientes de ninhos de fêmeas não amostradas, identificadas pelo DNA dos filhotes. Nesse mesmo ano, as análises de parentesco revelaram que uma fêmea encontrada morta encalhada sem marcas de inonel em Comboios (Aracruz) havia desovado pelo menos duas vezes na mesma região, pois filhotes de dois ninhos distintos foram identificados como seus descendentes (Figura 7). Desse modo, a genética é a melhor ferramenta para desvendar a correspondência entre descendentes de ninhos sem registro das fêmeas com suas respectivas genitoras. Todos esses fatos em conjunto destacam a relevância do uso de metodologias complementares, como a coleta e análise genética de natimortos de ninhos sem registro das fêmeas, captura, marcação e recaptura, bem como as análises genéticas de todas as fêmeas flagradas, encalhadas e os PIT tags. Essas abordagens são essenciais para solucionar questões críticas de biologia e de conservação, como o tamanho populacional (tamanho censo) e comportamento reprodutivo, especialmente em uma espécie que enfrenta alto risco de extinção, como a tartaruga-de-couro.

Figura 7: Exemplo da importância das análises genéticas para desvendar a correspondência entre descendentes de ninhões sem registro das fêmeas com suas respectivas genitoras. O perfil genético de uma fêmea de tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) encontrada morta sem marcas de inonel em Comboios (Aracruz) foi comparado com os genótipos de filhotes de vários ninhões “órfãos” diferentes. As análises dos genótipos dos microssatélites da fêmea (171/183, 177/205, 250/270 e 257/261) e de dois filhotes de diferentes ninhões indicaram que ambos os filhotes compartilham pelo menos um alelo de cada marcador (Filhote 1: 177, 183, 250 e 261 e Filhote 2: 177, 171 ou 183, 261 e 270) com a fêmea encontrada encalhada, revelando que ela conseguiu desovar ao menos duas vezes antes de morrer. Esse achado demonstra como a genética permite ampliar o conhecimento sobre o tamanho e a dinâmica populacional das espécies.



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

Durante o PMBA/Fest-UFES, foram realizadas análises genéticas e avaliações de saúde das populações de tartarugas marinhas *C. caretta* (tartaruga-cabeçuda), *C. mydas* (tartaruga-verde) e *D. coriacea* (tartaruga-de-couro), comparando áreas impactadas no Espírito Santo com áreas controle na Bahia. O período monitorado ocorreu entre setembro de 2018 a março de 2025 (PMBA, FEST-RT51-RSE2025), com exceção das áreas controle da Bahia no último período de coleta.

Os dados indicam que as populações de tartarugas marinhas do ES já eram historicamente fragilizadas antes do rompimento da barragem, devido aos gargalos populacionais antigos e/ou recentes e à perda de diversidade genética (Figuras 1B, 1E, 2B, 2E, 3B e 3E). Esses fatores aumentaram a vulnerabilidade genética e comprometeram a saúde dessas populações, reduzindo a capacidade adaptativa frente às perturbações ambientais antrópicas. O rompimento da barragem do Fundão trouxe novos desafios ambientais, que o monitoramento permitiu identificar e compreender em curto e médio prazos (FRANCO et al. 2024). Dado o ciclo de vida longo das tartarugas marinhas, os impactos de eventos ambientais na genética da população podem levar décadas para se manifestar plenamente, reforçando a importância do monitoramento contínuo. Populações podem crescer em número (tamanho censo) e se recuperar aparentemente de um impacto ambiental, mas somente um monitoramento genético revela se há perda de diversidade e fragilidade genética. Por exemplo, a estimativa do tamanho efetivo populacional (N_e), pode ser substancialmente menor que o tamanho censo, indicando que o aumento numérico não necessariamente reflete um aumento correspondente na diversidade genética (DIERICKX et al., 2015). Ou seja, pode indicar que poucos indivíduos estariam realmente contribuindo para a próxima geração, revelando uma baixa diversidade genética mesmo em populações mais numerosas. A dinâmica ambiental da foz do rio Doce, com sua alta energia e constante ressuspensão

de sedimentos contaminados com MLD, expõe continuamente as tartarugas marinhas a poluentes. As tartarugas-verdes juvenis que se alimentam nessa área demonstraram ser particularmente vulneráveis. Sua permanência prolongada em locais impactados resulta em exposição crônica, evidenciada não apenas pelas altas concentrações de metais como cromo e cobre detectadas no sétimo ano de monitoramento, mas também pela alta prevalência de fibropapilomatose e ectoparasitismo, indicando um problema de saúde significativo nessa população. Apesar das tartarugas-cabeçudas passarem menos tempo nas áreas de desova (cerca de três meses anuais), elas também apresentaram elevadas concentrações de metais como cromo, mercúrio, ferro e chumbo no plasma e um aumento significativo na prevalência de ectoparasitas, lesões oculares e fibropapilomas. Tal fato sugere um comprometimento generalizado da saúde dos animais, diretamente relacionado à contaminação ambiental. Além da transferência desses contaminantes da mãe para o ovo (transferência materna), a exposição direta dos ovos ao MLD nos ninhos por aproximadamente 60 dias durante o desenvolvimento embrionário, um estágio extremamente sensível, pode causar efeitos disruptivos que se manifestam mesmo após a eclosão. Em ambas as espécies e áreas, a exposição ao MLD está afetando negativamente a saúde das tartarugas marinhas, com consequências diretas para a sobrevivência e a reprodução dessas espécies vulneráveis.

Ao longo dos anos de monitoramento do PMBA/Fest-UFES, foi detectada nas populações de tartarugas marinhas (*C. caretta*, *C. mydas* e *D. coriacea*) na área impactada pelo rompimento da barragem de Fundão uma redução significativa na diversidade genética, com perda de linhagens genéticas únicas, podendo culminar em uma menor capacidade de recuperação. Esse cenário de baixa diversidade genética é agravado pelo comportamento filopátrico das fêmeas, que acaba limitando o fluxo gênico, e pela homogeneização genética, principalmente para a tartaruga-de-couro, dificultando a recuperação dessas espécies na região afetada. As análises genéticas também permitiram identificar, a partir dos dados genéticos de filhotes natimortos, fêmeas de tartarugas-de-couro não flagradas e contribuíram para estimativas mais precisas do tamanho populacional. Considerando que a tartaruga-de-couro já está classificada como “criticamente em perigo” (BRASIL, 2022), os resultados encontrados reforçam que essa população encontra-se em situação crítica de ameaça, o que torna essencial a implementação de estratégias de conservação em relação a essa espécie. Com base nesses achados, é evidente que as populações de tartarugas marinhas nas áreas afetadas possuem menor resiliência frente às transformações ambientais e 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). Ainda, é importante destacar que a descontinuidade da área controle (Bahia) a partir do sétimo ano compromete a possibilidade de comparação entre áreas impactadas e não impactadas, enfraquecendo a capacidade de avaliar possíveis mudanças ao longo do tempo. Sem essa referência, interpretações mais amplas sobre os efeitos do rompimento da barragem na saúde, genética e reprodução ficam limitadas. Além disso, a redução na representatividade amostral impacta diretamente a robustez e a capacidade de generalização dos resultados obtidos. Especificamente, a diminuição do número de indivíduos amostrados de 60 para 45 para tartarugas-cabeçudas (*C. caretta*) e de 45 para 15 para as análises de saúde das tartarugas-de-couro (*D. coriacea*) limita a detecção de alterações sutis nos parâmetros

analisados. A deterioração da qualidade ambiental nas áreas impactadas compromete tanto a saúde quanto a genética dessas tartarugas, tornando-as ainda mais suscetíveis a ameaças e diminuindo sua capacidade adaptativa diante dos recentes impactos ambientais. Esse cenário reforça a urgência na implementação de estratégias de conservação específicas para mitigar os impactos e promover a recuperação dessas populações.

6 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todos os itens previstos foram realizados.

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, 2014.

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*, 3: 457-460, 2011.

AMORIM, L.; CHIEZA, L.; LASALA, J.A.; TEODORO, S.S.A.; COLOMBO, W.L.; BARCELOS, A.C.; GUIMARÃES, P.R.L.; DA FONSECA, J.L.G.; MARCONDES, A.C.J.; SANTOS, A.S.; VARGAS, S.M. Reproductive strategies in loggerhead sea turtle *Caretta caretta*: polyandry and polygyny in a Southwest Atlantic rookery. *PeerJ*, 13: e18714, 2025.

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.

BRASIL. Portaria MMA no 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria no 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria no 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria no 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. *Diário Oficial da União*, 08 jun. 2022, Ed. 108, Seção 1, p. 74. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_a

nexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 25 mar. 2024.

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, 64 (9): 1974–1980, 2012.

COLOMBO, W. D.; DE FREITAS JUSTINO, J.; BARCELOS, A. C.; VILAÇA, S. T.; PAVANELLI, L.; VARGAS, S. M. Reassessing leatherback turtle lineages and unveiling the first evidence of nuclear mitochondrial DNA in sea turtles. Scientific Reports, 14(1): 31313, 2024.

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, 19: 11-15, 1987.

DUTTON, P. H.; BOWEN, B. W.; OWENS, D. W.; BARRAGAN, A.; DAVIS, S. K. Global phylogeography of leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). Journal of Zoology, 248, 397-409, 1999.

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

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

FEST, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. Relatório Semestral de Evolução do PMBA/Fest-UFES - 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-UFES - 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, 12: 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. *Journal of Wildlife Diseases*, 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. *Molecular Ecology*, 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*, 5: 187-189, 2005.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, 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.; LEWISON, R.L.; SEMINOFF, J.A.; DEHEYN, D.D.; DUTTON, P.H. Pollutants and the health of green sea turtle's resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere*, 84 (5): 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*, 35: 1547-1549, 2018.

LUDWIG, S.; AMORIM, L.; BARCELOS, A.C.; GUIMARÃES, P.; MEDEIROS, L.; ERICKSON, J.; VARGAS, S.M. Going deeper into the molecular ecology of the Southwest Atlantic *Caretta caretta* (Testudinata: Cheloniidae), what do microsatellites reveal to us? *Marine Biology*, 170 (7): 78, 2023.

MARCOVALDI, M. Â.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S.; LIMA, E. H.; THOMÉ, J. C.; ALMEIDA, A. P. Satellite-tracking of female loggerhead turtles highlights fidelity behavior in northeastern Brazil. *Endangered Species Research*, 12 (3): 263-272, 2010.

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*, 9: 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. Package "VarEff": variation of effective size, software VAREFF (package R in file. zip) and the documentation. 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*, 28: 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.

REIS, E. C.; SOARES, L. S.; VARGAS, S. M.; SANTOS, F. R.; YOUNG, R. J.; BJORNDAL, 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*, 3: 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*, 10 (1): 3–9, 2011.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 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-UFES-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-UFES-RRDM - Síntese integrativa entre Ambientes - RA2022 – PMBA/Fest-UFES-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-UFES-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-UFES-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.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-UFES-RRDM - Síntese integrativa entre Ambientes - RA2023 – PMBA/Fest-UFES-RRDM e ambientes. RT-45, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 2023.

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. 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, 46 (6): 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, 115 (3): 193–201, 2015.

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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 87–95, 2010.

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*, 7: 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*, 10: 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.

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.

VARGAS, S. M.; ARAUJO, F.C.F.; MONTEIRO, D.S.; ESTIMA, C.E.; ALMEIDA, A.P.; SOARES, L.S.; 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 Southwest Atlantic. *Regional Studies in Marine Science*, 55: 102530, 2022.