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- 55/ OUT 26

RA2025 PMBA/FEST-UFES

Vitória,

Outubro de 2026

EQUIPE TÉCNICA

Sarah Maria Vargas (coordenadora)

Marcelo Renan Santos

Camila Miguel

Sarah de Souza Alves Teodoro

Felipe Donateli Gatti

Wesley Dondoni Colombo

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 21

3.3 METAIS PESADOS 23

3.4 DADOS REPRODUTIVOS 25

4 INTEGRAÇÃO COM A FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT) 27

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO 28

6 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS 30

7 REFERÊNCIAS 30

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) passaram 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 tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta)* e tartarugas-de-couro (*Dermochelys 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 tartaruga-cabeçuda 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 inconel (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 tartaruga-cabeçuda, e de tartaruga-de-couro) 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 tartarugas-de-couro. Os ninhos e as amostras de tartaruga-cabeçuda em Regência e Arembepe foram monitorados e coletados pela nossa equipe.

Foram coletadas amostras de tecido, sangue e de carapaça *de* tartaruga-cabeçuda ao longo da temporada reprodutiva em cada área (Linhares e área controle). Não foram coletadas amostras sanguíneas de tartarugas-de-couro 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 8ºC. 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 tartarugas-verdes (*Chelonia mydas)*: Foram realizadas 2 campanhas de captura de tartarugas-verdes 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 das tartarugas-verdes 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 das tartarugas-verdes 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 inconel (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 8ºC. 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 para as tartarugas-verdes, 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/mm^3, respectivamente, sendo o d = 0,18, ou seja 5% do valor médio e 1 − α = 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 tartaruga-cabeçuda, 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/mm^3, respectivamente, sendo o d = 0,2, ou seja 5% do valor médio e 1 − α = 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 ressuspendido 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 (DNAmt) e genotipagem dos microssatélites.

Para amplificação das sequências do DNAmt foram utilizados os primers LCM e H950 (ABREU-GROBOIS et al., 2006) para as três espécies de tartarugas marinhas: tartaruga-cabeçuda, tartaruga-verde *e* tartaruga-de-couro. 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 controlem do DNAmt 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 (Na), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He). A estimativa de riqueza alélica (Ar) 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 GenAlEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número

populacional efetivo (Ne) foi calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição e variação genética bem como avaliar os níveis de estrutura populacional, foram realizadas comparações par-a-par entre as amostras pré e pós rompimento da barragem e entre as áreas impactadas e não-impactadas, para ambos marcadores moleculares (DNAmt e loci 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 µl de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias foi realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (THRALL et al., 2004). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido ®. Foram contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

Análises bioquímicas: Foi analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, ureia, ácido úrico, calcio, 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 heterozigosidade individual (Hi) foi incluído para os marcadores de microssatélites como parâmetro auxiliar no entendimento da perda de alelos e da heterozigosidade nas populações, sendo calculado com o GenAlEx 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 Hi com Ho (heterozigosidade observada) e He (heterozigosidade esperada), o que resultava em redundância nos resultados. O índice Hi 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-cabeçudas, tartarugas-verdes e tartarugas-de-couro 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 (≤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 tartaruga-cabeçuda e tartaruga-verde, 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 tartaruga-de-couro 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.

Para o RA2025, o tamanho efetivo populacional contemporâneo (Ne) deixou de ser estimado pelo NeEstimator e passou a ser representado pela mediana das estimativas do VarEff em escala natural. Essa decisão foi adotada porque o NeEstimator, especialmente pelo método baseado em desequilíbrio de ligação, é sensível ao tamanho e a composição das amostras, e aos pressupostos de população fechada e gerações discretas. No presente conjunto de dados, esses fatores podem introduzir viés, pois a área controle da Bahia deixou de ser amostrada em parte das campanhas e as espécies avaliadas apresentam sobreposição de gerações, o que pode afetar diretamente estimativas baseadas em desequilíbrio de ligação (DO et al., 2014; WAPLES et al., 2014). O VarEff foi mantido por permitir avaliar a trajetória demográfica a partir das frequências alélicas e por fornecer uma estimativa padronizada de Ne, aqui resumida pela mediana em escala natural. No entanto, as estimativas do NeEstimator e do VarEff não são diretamente equivalentes, pois derivam de modelos, pressupostos e escalas interpretativas distintas (NIKOLIC & CHEVALET, 2014).

Como consequência, o Ne foi retirado do cálculo do Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT), evitando a substituição direta de uma métrica por outra não equivalente. Assim, o IGAT passou a integrar apenas métricas diretamente associadas à diversidade genética observada nos marcadores mitocondriais e nucleares, sendo calculado como: IGAT = (H + Ho + Hi + AR) / 4. A escala de interpretação também foi atualizada para refletir essa nova composição: severo (< 1,5), moderado (1,6 a 2,9), baixo (3 a 4,5) e mínimo (> 4,5). Dessa forma, o índice permanece como uma síntese da condição genética das populações, sem combinar estimativas de diversidade com estimativas demográficas obtidas por métodos não intercambiáveis.

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 tartaruga-cabeçuda foram incluídas pois não tínhamos amostras coletadas 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 predizer 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 tartarugas-verdes, pois não há dados genéticos disponíveis do período pré-rompimento para os marcadores microssatélites para a espécie. Para a tartaruga-cabeçuda, 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 microssatélites. 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.

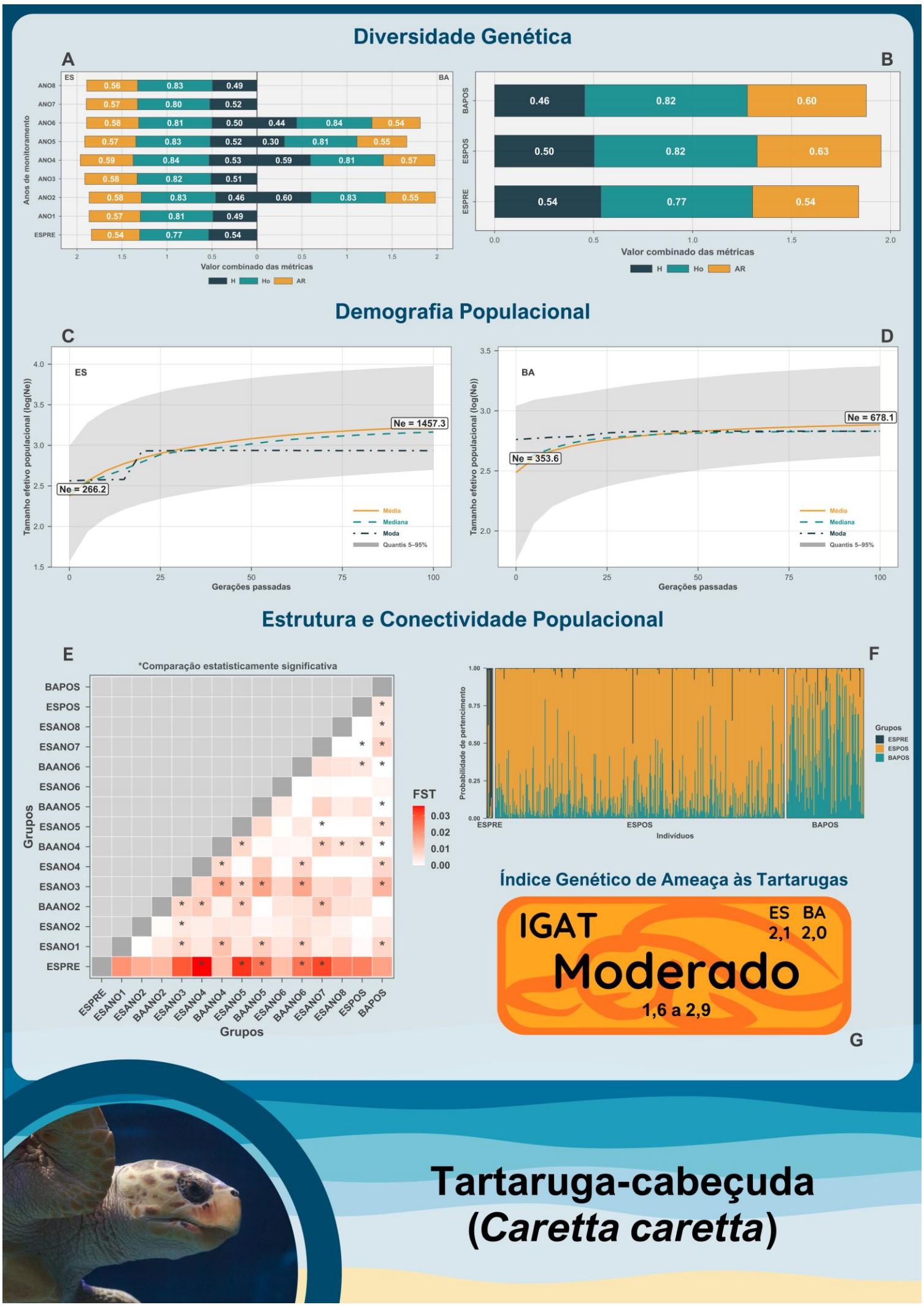
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

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

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; outubro de 2025 a março de 2026: ano 8), utilizando dados mitocondriais (D-loop) e os nucleares (microssatélites) para as populações da tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) do Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). A e B: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Anos 1 a 8) e áreas (ES-Pré, ES-Pós e BA); C e D: Gráfico do gargalo populacional e Ne gerados pelo programa VarEff para o ES e BA, respectivamente; E: Matriz par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Anos 1 a 8), períodos (ES-Pré e ES-Pós) e regiões (ES e BA). F: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pré, ES-Pós e BA; G: 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 de Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.

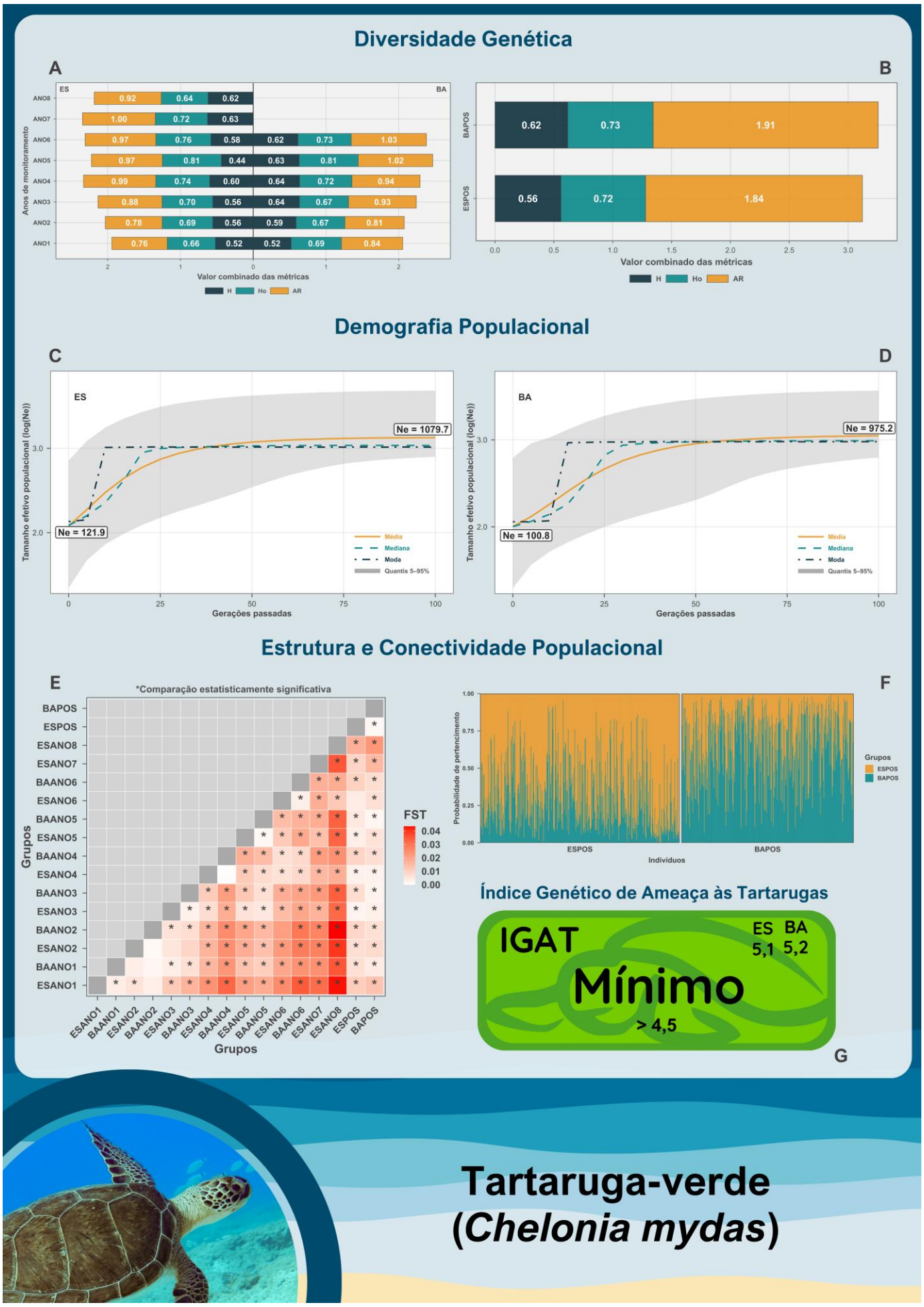


**O relatório atual apresenta alterações metodológicas na estimativa do tamanho efetivo populacional (Ne) e no cálculo do Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) em relação aos relatórios anteriores. Essas atualizações estão descritas no final da seção 2.3 Histórico de Alterações e Adaptações de Metodologias, em Meta 1: Atualizações Metodológicas aplicadas no RA2025.*

Para a tartaruga-cabeçuda, os resultados indicaram manutenção da diversidade genética nuclear ao longo do monitoramento (Figura 1AB). A heterozigosidade observada (Ho) permaneceu relativamente estável nos anos pós-rompimento, tanto no ES quanto na BA. A riqueza alélica (AR) apresentou padrão semelhante, sem evidência de redução acentuada pós-rompimento. Ainda assim, sua interpretação deve considerar diferenças no tamanho amostral entre anos e áreas, pois métricas baseadas na composição alélica são sensíveis ao esforço amostral e ao delineamento das coletas (HOBAN et al., 2021; HOBAN et al., 2022). Na comparação entre áreas, ES-Pós e BA apresentaram valores próximos de Ho e AR, indicando níveis semelhantes de diversidade nuclear. ES-Pré apresentou valores menores, mas essa comparação deve ser tratada com cautela devido ao baixo número amostra. Para DNAmt, a diversidade haplotípica (H) foi maior em ES-Pré do que em ES-Pós e BA (Figura 1AB), sugerindo redução temporal da diversidade no ES após o rompimento. Essa diferença entre marcadores é esperada em tartarugas marinhas, pois o DNAmt reflete a linhagem materna e tende a ser mais sensível à filopatria das fêmeas, enquanto os microssatélites representam herança biparental e podem captar fluxo gênico mediado por machos (MARCOVALDI et al., 2010; SHAMBLIN et al., 2014; BALTAZAR-SOARES et al., 2020).

A análise demográfica indicou gargalo populacional recente nas duas áreas avaliadas (Figura 1CD). As estimativas de tamanho efetivo populacional (Ne) foram maiores em BA do que em ES-Pós, mas essa diferença não representa contraste direto de tamanho populacional censitário, já que o Ne pode ser influenciado pela estrutura genética, composição amostral e contribuição reprodutiva efetiva dos indivíduos (NIKOLIC & CHEVALET, 2014). Em tartarugas marinhas, fatores como filopatria, múltipla paternidade (AMORIM et al., 2025) e variação no sucesso reprodutivo também podem influenciar essas estimativas. Assim, o sinal de gargalo reforça que valores de Ho e AR mais elevados não eliminam a necessidade de continuidade do monitoramento, pois a heterozigosidade pode responder lentamente a reduções populacionais, enquanto a variação alélica tende a ser mais sensível à perda de alelos raros e à deriva genética (BROQUET et al., 2010; ALLENDORF, 2024). A avaliação da estrutura genética indicou baixa diferenciação nuclear entre as áreas, mas com sinal detectável de estruturação entre ES-Pós e BA (Figura 1EF). A DAPC apresentou separação parcial entre os grupos, enquanto o F_{ST} apontou diferenciação sutil entre ES-Pós e BA. Esse padrão é coerente com a biologia da espécie, pois a filopatria das fêmeas pode favorecer estruturação entre áreas de nidificação, enquanto o fluxo gênico mediado por machos pode reduzir a diferenciação observada nos marcadores nucleares (JOMBART et al., 2010; LUDWIG et al., 2023; SHAMBLIN et al., 2014). O Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) atualizado indicou condição moderada de ameaça genética para a tartaruga-cabeçuda nas duas áreas avaliadas (Figura 1G). Esse resultado sintetiza a manutenção da diversidade nuclear, a redução da diversidade haplotípica em ES-Pós, o gargalo recente nas duas áreas e a diferenciação nuclear sutil entre ES-Pós e BA. Portanto, a condição genética da espécie não deve ser interpretada como crítica no momento, mas os resultados também não descartam risco genético. A tartaruga-cabeçuda permanece em condição de vulnerabilidade, reforçando a necessidade de monitoramento para avaliar se os padrões observados representam estabilidade, recuperação ou perda gradual de diversidade.

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; outubro de 2025 a março de 2026: ano 8), utilizando dados mitocondriais (D-loop) e os nucleares (microssatélites) para as populações de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) do Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). A e B: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Anos 1 a 8) e áreas (ES-Pós e BA); C e D: Gráfico do gargalo populacional e Ne gerados pelo programa VarEff para o ES e BA, respectivamente; E: Matriz par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Anos 1 a 8) e regiões (ES e BA). F: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pós e BA; G: 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, 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 de Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.



**O relatório atual apresenta alterações metodológicas na estimativa do tamanho efetivo populacional (Ne) e no cálculo do Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) em relação aos relatórios anteriores. Essas atualizações estão descritas no final da seção 2.3 Histórico de Alterações e Adaptações de Metodologias, em Meta 1: Atualizações Metodológicas aplicadas no RA 2025.*

Para a tartaruga-verde, os resultados indicaram manutenção da diversidade genética nuclear nos juvenis amostrados nas áreas de alimentação, considerando os marcadores microssatélites avaliados (Figura 2AB). A heterozigosidade observada (Ho) permaneceu elevada nas duas áreas, apesar de oscilações entre anos, sem evidência de redução contínua ao longo do monitoramento. A riqueza alélica (AR) apresentou variação mais ampla que Ho, mas também não indicou perda acentuada de diversidade nuclear. Essas diferenças entre anos e áreas devem ser interpretadas com cautela, pois métricas baseadas na composição alélica são sensíveis ao esforço de coleta e à distribuição temporal das amostras *(HOBAN et al., 2021; HOBAN et al.,* 2022). Na comparação entre áreas, ES-Pós e BA apresentaram valores próximos de Ho e AR, indicando níveis semelhantes de diversidade nuclear.

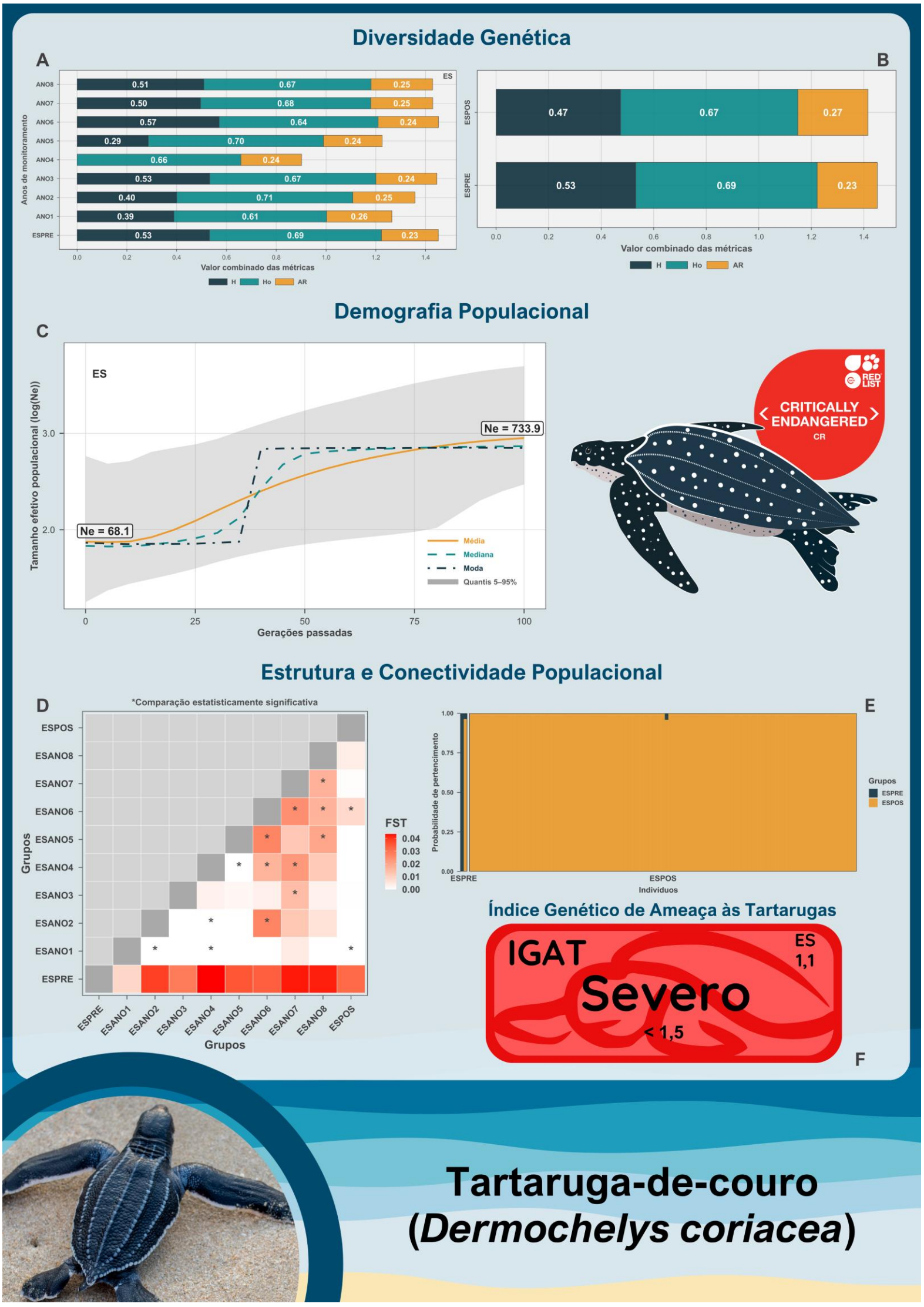
Para o DNA mitocondrial, a diversidade haplotípica (H) foi maior em BA e Es-Pré do que em ES-Pós (Figura 2AB), sugerindo menor diversidade na área impactada. Entretanto, essas comparações devem considerar a descontinuidade amostral da Bahia e possíveis variações temporais na composição dos juvenis em áreas de alimentação.

O tamanho efetivo populacional contemporâneo (Ne) foi ligeiramente maior em ES-Pós do que em BA (Figura 2CD). Essa diferença não deve ser interpretada como evidência direta de melhor condição demográfica no ES, uma vez que a ausência de amostragens na Bahia pode afetar a composição do conjunto analisado. O valor de Ne não indica quantos indivíduos existem de fato na população, mas sim quantos indivíduos uma população idealizada precisaria ter para apresentar o mesmo nível de perda de diversidade genética causado pela deriva genética observado nos dados (NIKOLIC & CHEVALET, 2014). O baixo Ne de *C. mydas* indica maior sensibilidade potencial à deriva genética. Entretanto, essa interpretação deve considerar que as amostras são compostas por juvenis em áreas de alimentação e não por adultos reprodutivos. Nessa fase, a composição genética pode refletir a mistura de coortes, a contribuição de áreas natais compartilhadas e, eventualmente, a presença de indivíduos aparentados, fatores que podem aumentar a similaridade genética entre os indivíduos amostrados e influenciar as estimativas de Ne. Ainda assim, os valores elevados de Ho, AR indicam que não há evidências de perda genética acentuada nas áreas avaliadas. No entanto, o monitoramento continua necessário, pois a diversidade alélica tende a responder mais rapidamente do que a heterozigosidade a mudanças no tamanho ou na dinâmica das populações (BROQUET et al., 2010; ALLENDORF, 2024).

A avaliação da estrutura genética indicou baixa diferenciação nuclear entre ES-Pós e BA (Figura 2EF). A DAPC apontou separação parcial entre os grupos, sem divisão completa entre ES e BA. Esse padrão é compatível com áreas de alimentação utilizadas por juvenis, cuja composição genética pode refletir mistura de indivíduos provenientes de diferentes áreas de nidificação. Assim, ES-Pós e BA apresentam conectividade ou composição genética compartilhada, mas não são geneticamente idênticas. A variação anual dos juvenis é compatível com áreas de alimentação de múltiplas origens reprodutivas (BOWEN & KARL, 2007; JOMBART et al., 2010). O Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) indicou condição mínima de ameaça genética para as tartarugas-verdes nas duas áreas avaliadas (Figura 2G).

Esse resultado sintetiza a manutenção de diversidade nuclear elevada, diversidade haplotípica relativamente alta e baixa diferenciação entre áreas. Apesar disso, o baixo Ne e a influência do delineamento amostral na Bahia indicam que a espécie deve continuar sendo acompanhada.

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; outubro de 2025 a março de 2026: ano 8), utilizando dados mitocondriais (D-loop) e nucleares (microssatélites) para as populações da tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) do Espírito Santo (ES). A e B: Comparação entre os valores de H, Ho e Ar entre anos (Anos 1 a 8) e períodos (ES-Pré e ES-Pós); C: Gráfico do gargalo populacional e Ne gerados pelo programa VarEff para o ES; D: Matriz par a par de divergência genética (F_{ST}) entre anos (Anos 1 a 8) e períodos (ES-Pré e ES-Pós). E: Gráfico de probabilidade de pertencimento dos indivíduos (DAPC) de ES-Pós e BA; F: Valor de IGAT e grau de ameaça para o 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 8) e períodos (ES-Pré e ES-Pós); E: Gráfico do gargalo populacional gerado pelo programa VarEff 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: 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 de Covid-19. IGAT: índice genético de ameaça às tartarugas.



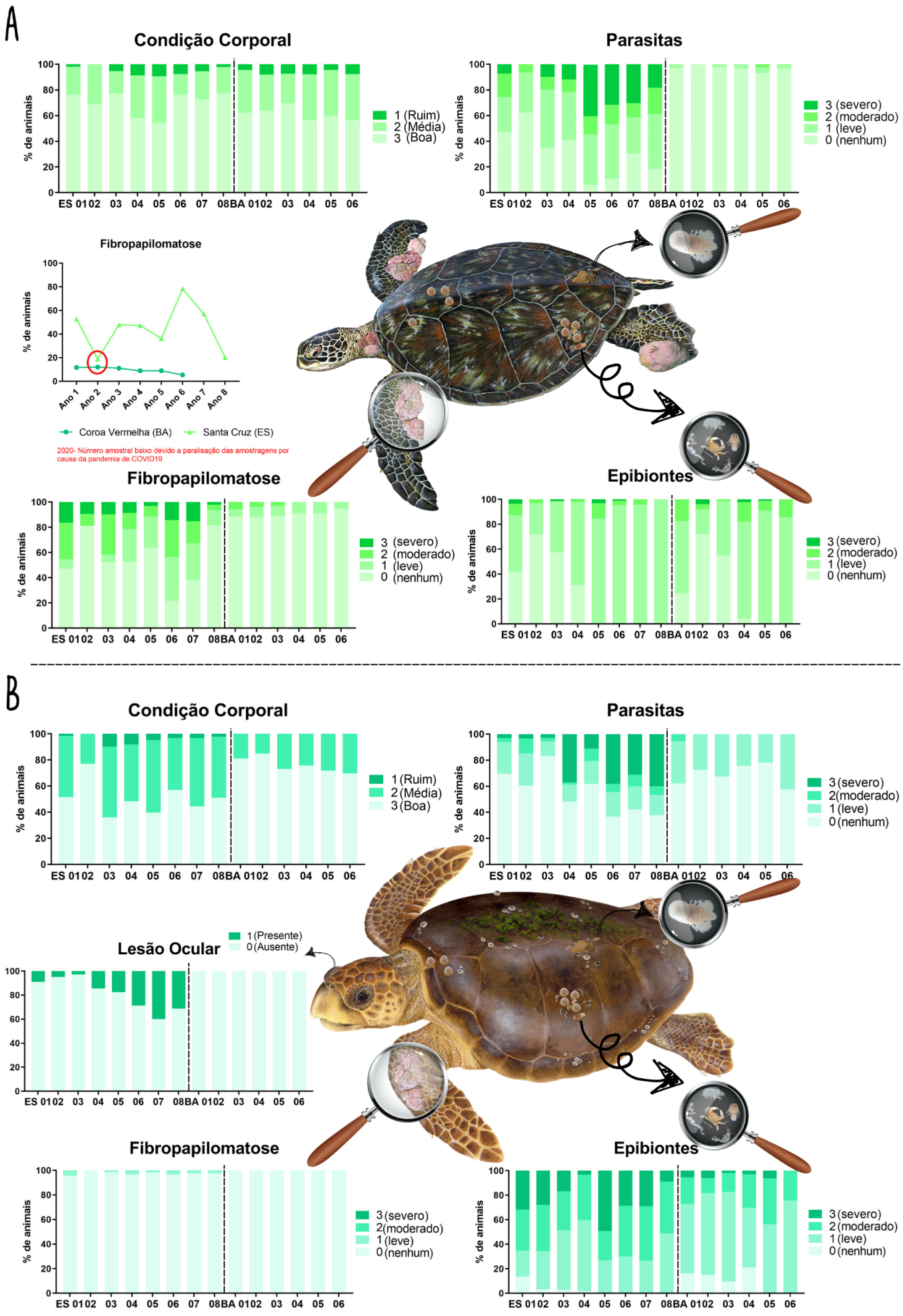
A tartaruga-de-couro apresentou o cenário genético mais crítico entre as espécies avaliadas, compatível com seu elevado grau de ameaça. Nas análises por ano, a heterozigosidade observada (Ho) permaneceu relativamente estável, sem indicação de queda progressiva ao longo do monitoramento (Figura 3AB). A riqueza alélica (AR), por outro lado, apresentou valores baixos e pouco variáveis, sugerindo diversidade alélica reduzida. Esse padrão é relevante para a conservação, pois métricas baseadas na composição alélica tendem a ser sensíveis à perda de variantes raras e ao efeito da deriva genética, especialmente em populações pequenas ou historicamente reduzidas (HOBAN et al., 2021; HOBAN et al., 2022; VARGAS et al., 2022). Entretanto, esses resultados devem ser interpretados considerando o baixo número amostral em alguns anos e, principalmente, no grupo ES-Pré (N=2), limitando a inferência sobre variações temporais mais robustas.Para o DNA mitocondrial, a diversidade haplotípica (H) foi menor em ES-Pós do que em ES-Pré (Figura 3AB), sugerindo redução da diversidade genética no período pós-rompimento. Na comparação entre períodos, ES-Pós e ES-Pré apresentaram valores próximos de Ho. Embora o baixo número de amostras prévias limite a inferência sobre a magnitude dessas variações temporais, o padrão observado não elimina a evidência de condição genética preocupante para a espécie.

A estimativa contemporânea de tamanho efetivo populacional (Ne) foi a menor entre as espécies avaliadas (Figura 3C), indicando maior vulnerabilidade demográfica relativa da tartarugas-de-couro. Como Ne não representa o tamanho censitário, mas a intensidade esperada da deriva genética a partir dos dados, valores baixos sugerem maior suscetibilidade à perda de diversidade ao longo do tempo (NIKOLIC & CHEVALET, 2014). Mesmo com Ho relativamente alta, o baixo Ne e a baixa AR indicam que a população pode estar mais exposta à perda de alelos e aos efeitos da deriva, reforçando que a heterozigosidade observada não deve ser interpretada isoladamente como ausência de risco genético (BROQUET et al., 2010; ALLENDORF, 2024). Esse conjunto de resultados indica que a vulnerabilidade genética da tartarugas-de-couroestá associada sobretudo à menor capacidade de manter sua diversidade genética ao longo do tempo.

A avaliação da estrutura genética foi limitada pela ausência de área controle equivalente e pelo baixo número amostral de ES-Pré. A DAPC apresentou separação parcial entre os grupos, seguindo o padrão geral observado nas três espécies, mas sua interpretação deve considerar o desequilíbrio amostral entre ES-Pré e ES-Pós (Figura 3E). O F_{ST} entre ES-Pós e ES-Pré não foi significativo, e as comparações anuais não indicaram um padrão temporal simples de separação progressiva. Assim, os dados atuais não indicam uma separação genética clara entre os períodos avaliados. No entanto, reforçam a importância de ampliar e manter o monitoramento, para que a estrutura temporal da espécie possa ser avaliada com maior robustez. O Índice Genético de Ameaça às Tartarugas (IGAT) atualizado indicou condição severa de ameaça genética para a tartarugas-de-couro no Espírito Santo (Figura 3F). Esse resultado sintetiza a combinação de baixo Ne, baixa riqueza alélica relativa e redução da diversidade haplotípica no período pós-rompimento. Diferentemente das demais espécies, a tartarugas-de-couro permanece em condição genética mais crítica no monitoramento, exigindo atenção prioritária devido à maior vulnerabilidade à deriva genética, menor capacidade de retenção de variação alélica e maior risco de perda de diversidade ao longo do tempo.

3.2 PARÂMETROS DE SAÚDE

Figura 4. Indicador Parâmetros de saúde. (A) Indicadores externos de saúde obtidos no exame físico de juvenis de tartaruga-verde e prevalência (%) de fibropapilomatose, 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: ano 8). (B) Indicadores externos de saúde avaliados no exame físico em tartaruga-cabeçuda, em Povoação ou Regência (ES), Praia do Forte ou Arembepe (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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: ano 8).



Ao longo dos oito anos de monitoramento do PMBA/Fest, observa-se uma clara deterioração progressiva da saúde das tartarugas-verdes juvenis, na APA Costa das Algas. Nos primeiros anos (Anos 01 a 03), observa-se mais animais com boa condição corporal e baixa carga parasitária e de epibiontes; no entanto, nos Anos 4 e 5 ocorre um declínio abrupto da condição corporal coincidindo com um aumento de infestações parasitárias severas e a onipresença de epibiontes (Figura 4). Esse cenário de debilidade sistêmica parece ter deixado a população vulnerável, culminando em eventos críticos subsequentes, como um aumento expressivo de tumores graves no Ano 6 e o desaparecimento de animais sem epibiontes, sugerindo que o impacto ambiental sofrido gerou consequências que persistem até o Ano 8.

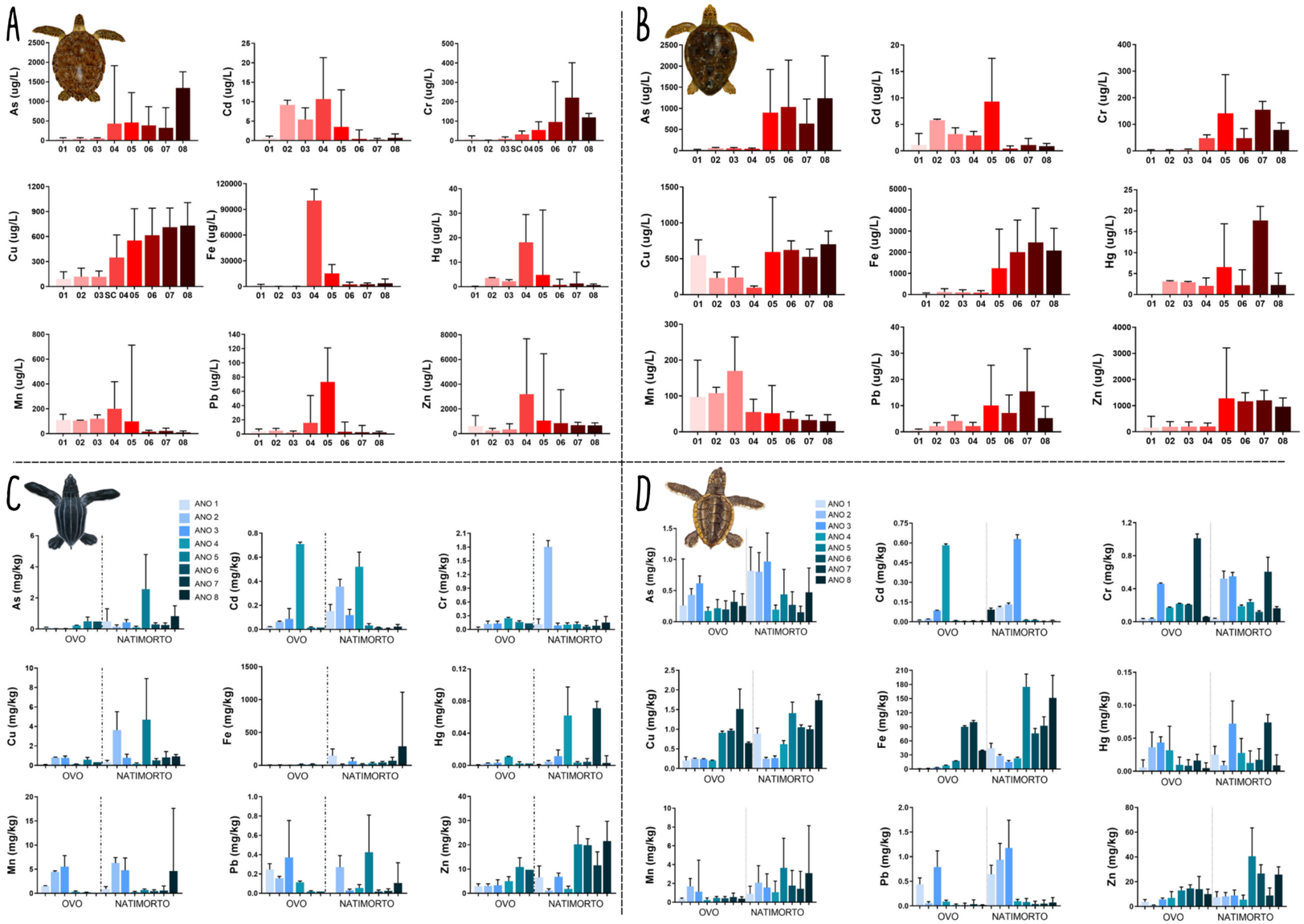
Apesar da prevalência de fibropapilomatose no Ano 8 ser a menor historicamente observada na série temporal da APA Costa das Algas, é importante considerar que tais dados são de uma única campanha amostral, realizada exclusivamente durante o período chuvoso. Historicamente, observamos um aumento significativo no número de animais com fibropapilomas e parasitas nas campanhas de coleta realizadas durante o período seco. Dessa forma, é possível que as porcentagens atuais aumentem, uma vez que a próxima campanha pode revelar um cenário diferente. Embora a taxa de fibropapilomatose tenha apresentado uma queda momentânea, os demais parâmetros de saúde acendem um alerta, visto que 100% das tartarugas avaliadas possuem epibiontes e 82% apresentam parasitas. Essa redução nos tumores pode se correlacionar ao fato de que metade das tartarugas coletadas nesta etapa é composta por novos recrutas (CCC < 40cm). O que significa que tais tartarugas migraram há pouco tempo para a zona de alimentação costeira, vindas de uma região pelágica, mais distante do litoral. Em virtude disso, supõe-se que esses indivíduos recém-chegados ainda não tenham desenvolvido sintomas visíveis da patologia, devido ao curto período de permanência na área. Portanto, apenas a continuidade do monitoramento a longo prazo permitirá determinar se a redução na prevalência de fibropapilomatose reflete uma tendência real de declínio da enfermidade ou se decorre apenas de uma oscilação sazonal e demográfica pontual.

Nas tartarugas-cabeçudas que desovam na Foz do Rio Doce, observa-se também uma tendência de declínio progressivo na saúde dos animais. Inicialmente (Anos 01 a 03), a população apresenta uma condição corporal majoritariamente "Boa", com baixa incidência de ectoparasitas e raras lesões oculares (Figura 4). No entanto, a partir do Ano 04, ocorre uma transição crítica: a carga ectoparasitária aumenta para níveis "Severos", a prevalência de lesões oculares cresce de forma acentuada, os animais apresentam a onipresença de epibiontes e a condição corporal começa a se deteriorar, com um crescimento visível do escore Médio. Nos Anos 07 e 08, embora a fibropapilomatose permaneça estável, o efeito cumulativo do parasitismo severo e das lesões oculares sugere um cenário de estresse crônico, resultando em uma população significativamente mais vulnerável do que no início do monitoramento.

Portanto, o monitoramento indica um contínuo declínio na saúde dos juvenis na APA Costa das Algas, onde a aparente melhora recente nos tumores pode ser apenas um reflexo temporário da chegada de novos recrutas e de fatores sazonais. A população reprodutiva na Foz do Rio Doce também enfrenta um comprometimento generalizado da saúde, ao longo dos anos, com o avanço de doenças oculares e infestações crônicas tornando essas fêmeas muito mais vulneráveis. 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 e 8 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: Ano 8). (b) Níveis de metais pesados no plasma de tartarugas-cabeçudas 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: Ano 8). (c) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas-de-couro 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: Ano 8). (d) Níveis de metais pesados nos ovos e natimortos de tartarugas tartarugas-cabeçudas 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026, Ano 8).



A análise dos níveis de metais revelou flutuações significativas com padrões distintos ao longo dos oito anos de monitoramento do PMBA/Fest. Nas tartarugas-verdes juvenis que se alimentam na APA Costa das Algas, observa-se que os níveis de As e Cu apresentaram um aumento contínuo, atingindo o pico no Ano 8, indicando uma exposição crônica (Figura 5). Já os metais Cd, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn apresentaram níveis mais baixos no triênio inicial (Anos 1 a 3), seguidos de um aumento significativo nos Anos 4 e 5. Especificamente, os maiores valores de Cd, Fe, Hg, Mn e Zn ocorreram no Ano 4, enquanto o pico de Pb foi registrado no Ano 5. Embora esses níveis tenham declinado nos anos subsequentes, mantiveram-se superiores aos valores iniciais do Ano 1. Essa dinâmica química correlaciona-se com uma clara deterioração progressiva da saúde dos animais. A correlação temporal entre o pico de metais pesados (Cd, Hg, Pb) no Ano 4 e o declínio abrupto da condição corporal evidencia o impacto desses poluentes na saúde dos animais. A persistência de altos níveis de As e Cu até o Ano 8, somada à prevalência de fibropapilomatose e o parasitismo severo, indica uma exposição crônica potencializada pela dinâmica hidrossedimentológica local. Portanto, a área impactada atua como um estressor contínuo, comprometendo a sobrevivência desses juvenis.

Nas tartarugas-cabeçudas que desovam na Foz do Rio Doce, observa-se que as concentrações de As, Cu, Fe, Pb e Zn, no plasma são mais baixas nos primeiros anos de monitoramento (Ano 1 e 4) seguido de um aumento significativo no Ano 5 e mantendo-se elevados até o Ano 8 (Figura 5). Os maiores níveis de As e Cu foram encontrados no Ano 8, assim como para a tartaruga-verde. O aumento persistente de elementos como As, Cu, Fe e Pb a partir do Ano 5 pode ter induzido um quadro de imunossupressão crônica nas tartarugas-cabeçudas, comprometendo sua resiliência e desencadeando o avanço de infestações de ectoparasitas, lesões oculares e o consequente piora na condição corporal. Os ovos das tartarugas-cabeçudas apresentaram um aumento progressivo e acentuado de Cu, Fe e Zn a partir do Ano 5, além de picos isolados e extremos de Cd no Ano 4 e Cr no Ano 7, refletindo diretamente a transferência materna. Nos natimortos, os níveis de Cu, Fe e Zn também se mantiveram elevados nos anos finais, indicando um efeito cumulativo da transferência materna associada à absorção direta de metais presentes na areia do ninho durante a incubação.

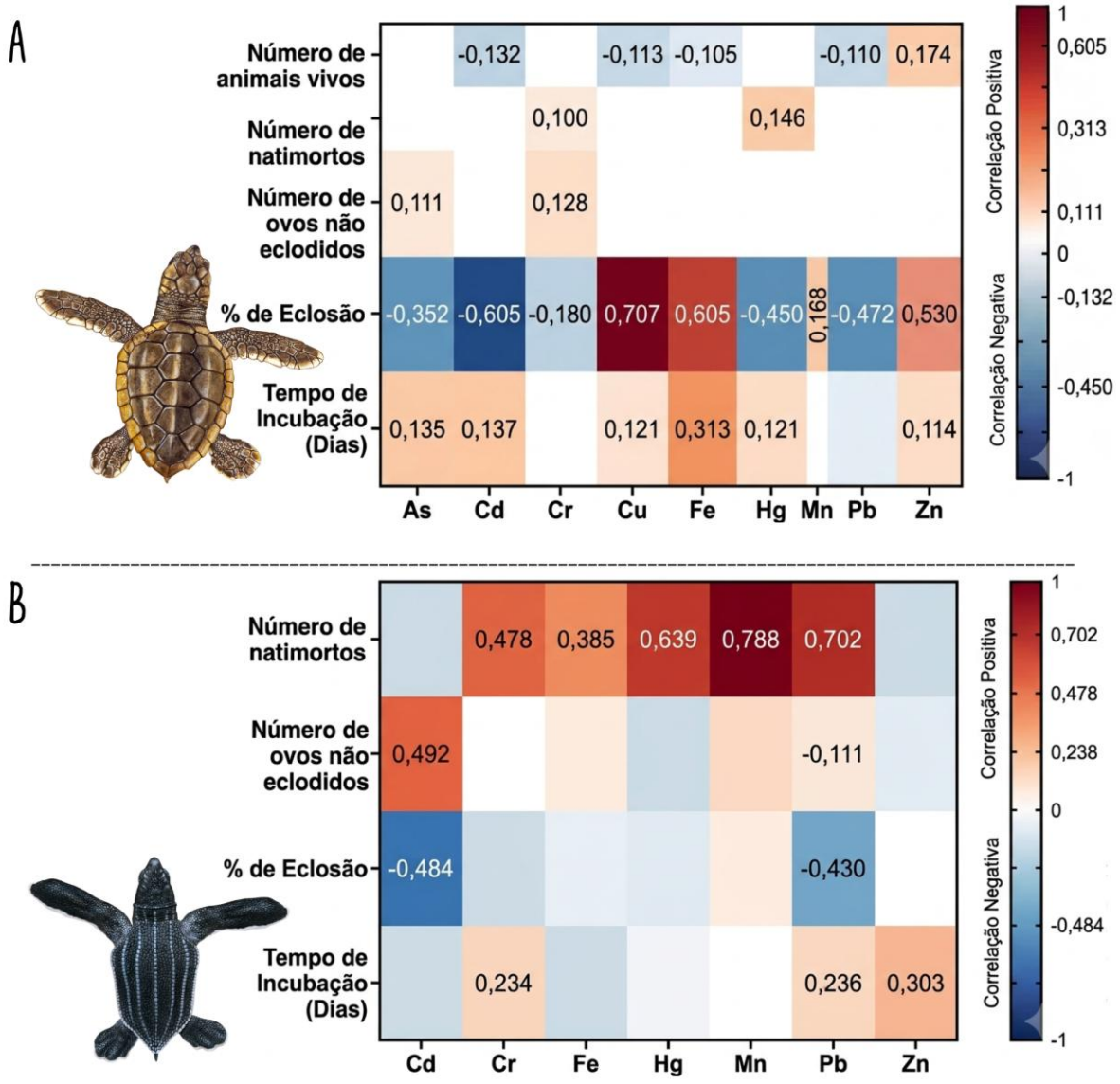
Nos natimortos das tartarugas-de-couro, o perfil de contaminação mudou ao longo do tempo, migrando de uma carga inicial focada em Cr, Mn e Pb nos primeiros anos para um acúmulo tardio e elevado de Fe, Hg e Zn no fim do monitoramento. O Ano 5 representou um período de estresse ambiental agudo, marcado por picos drásticos e simultâneos de As, Cd e Cu. A descontinuidade nas análises dos ovos após o Ano 6 gera uma lacuna que dificulta a isolar o papel da transferência materna frente à influência da absorção ambiental. Sem o pareamento desses dados nos anos finais, não é possível determinar se as elevações tardias registradas nos natimortos (Fe, Hg, Mn, Zn) refletem uma mudança recente nas áreas de forrageamento das fêmeas (via transferência materna) ou uma degradação crônica na qualidade sedimentar das praias de desova ao longo do tempo.

O monitoramento evidencia que a dinâmica ambiental local e os eventos de ressuspensão de sedimentos expõem continuamente as tartarugas marinhas aos contaminantes, gerando um cenário de estresse crônico e imunossupressão que provoca a progressiva deterioração física e o avanço de doenças em juvenis e adultos. Além disso, a presença de metais no plasma, ovos e natimortos confirma

o risco decorrente tanto da transferência materna quanto da absorção no ninho durante o desenvolvimento embrionário, ameaçando o sucesso reprodutivo e a saúde de todas as espécies estudadas.

3.4 DADOS REPRODUTIVOS

Figura 6. Indicador Dados Reprodutivos. (A) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos de tartarugas-cabeçudas 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 setembro de 2025: Ano 7; outubro de 2025 a março de 2026: Ano 8). (B) Correlações de Spearman entre metais pesados e dados reprodutivos de tartarugas-de-couro de Povoação e Regência, ES, Brasil, ao longo dos 8 anos do PMBA/Fest-UFES.



Para as tartarugas-cabeçudas os níveis de Cu, Fe e Zn apresentaram correlações positivas e fortes com o sucesso de eclosão. Como esses três elementos são essenciais para o desenvolvimento

embrionário, esses valores indicam que a sua presença em níveis adequados está fortemente associada a um maior sucesso de eclosão (Figura 6). Em contraste, a porcentagem de eclosão cai drasticamente quando há presença de As, Cd, Hg e Pb, evidenciando o potencial embriotóxico desses elementos não-essenciais. O tempo de incubação apresentou uma relação positiva com As, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb. Sugerindo que o esses contaminantes, podem retardar a taxa de desenvolvimento do embrião dentro do ninho, prolongando o período necessário para o nascimento.

Para as tartarugas-de-couro, os níveis de Cr, Fe, Hg, Mn e Pb apresentaram correlações positivas com o número de natimortos por ninho, ou seja, quanto mais altas as concentrações desses metais, mais natimortos foram encontrados, sugerindo toxicidade durante o desenvolvimento embrionário. O Cd destacou-se como um fator crítico para a diminuição do sucesso reprodutivo, correlacionando-se positivamente com o número de ovos não eclodidos e negativamente com a porcentagem de eclosão. Além disso, as concentrações de Cr, Pb e Zn prolongaram o tempo de incubação, potencializando a vulnerabilidade dos ninhos a fatores ambientais externos.

A persistência dessas correlações para ambas as espécies, ao longo do monitoramento do PMBA/Fest, sugere uma relação contínua, possivelmente de causa-efeito entre as concentrações dos 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 das espécies. Embora outros fatores ambientais (temperatura, umidade etc.) também influenciem o sucesso de eclosão, os contaminantes aparecem como um componente significativo na equação da saúde reprodutiva.

É imperativo ressaltar que a redução do tamanho amostral e a interrupção da coleta de ovos das tartarugas-de-couro no sétimo ano de monitoramento impõem limitações à robustez e à generalização dos resultados. A diminuição da amostragem pode obscurecer variações sutis, mas cruciais, na dinâmica reprodutiva, reduzindo a sensibilidade estatística para detectar tendências temporais significativas de deterioração ou recuperação da população. Além da redução amostral, a ausência de coletas em uma área controle é um fator limitante crítico. A falta desses dados impede a comparação robusta entre ninhos sob influência de contaminantes e ninhos em ambientes preservados, dificultando a distinção entre os efeitos antropogênicos dos metais e as variações naturais inerentes aos locais de nidificação, o que impacta diretamente a precisão das conclusões sobre o impacto real dos contaminantes na espécie.

4 INTEGRAÇÃO COM A FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR (FPT)

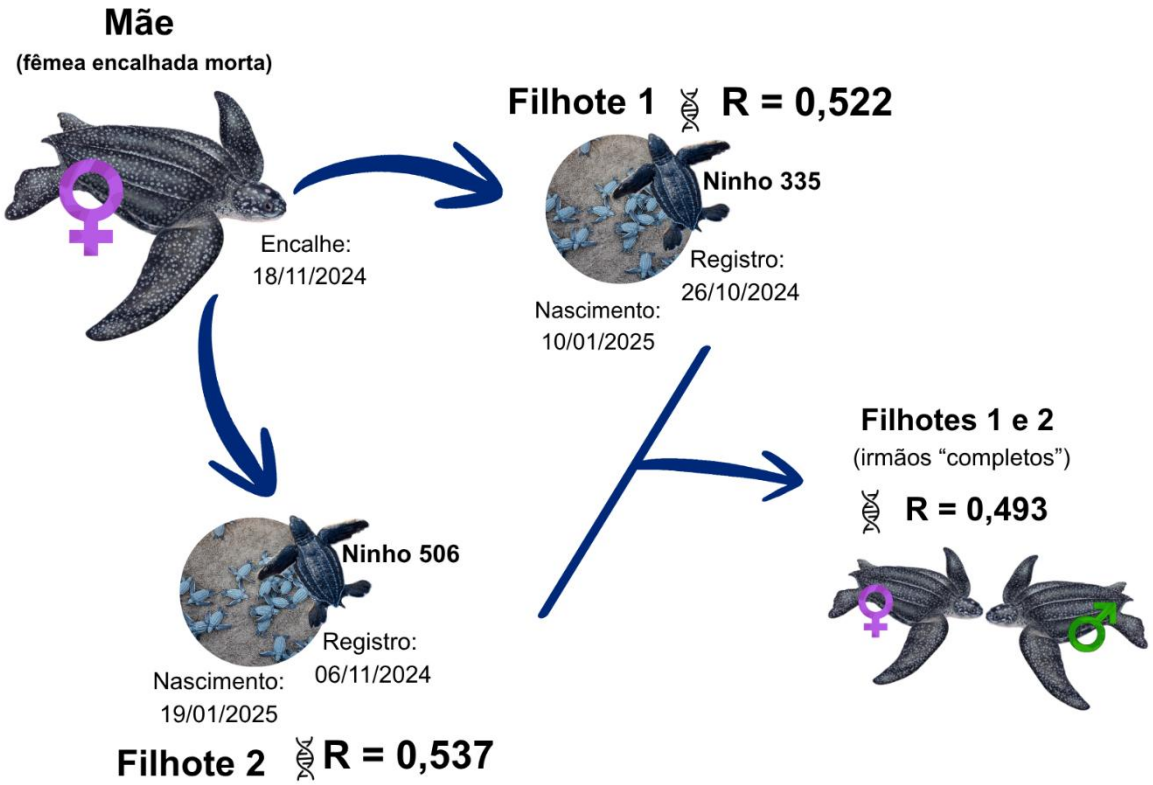
Inferência da presença de fêmeas de tartarugas-de-couro não amostradas a partir dos dados genéticos de filhotes natimortos

Ao longo do monitoramento, as análises genéticas têm demonstrado sua importância para complementar os registros de campo e refinar a identificação individual de fêmeas de tartarugas-de-couro no Espírito Santo. No Ano 4 (2021/22) e no Ano 6 (2023/24), fêmeas coletadas sem marcas em Povoação, em parceria com a Fundação Projeto TAMAR, foram geneticamente identificadas como indivíduos já amostrados no Ano 1 (2018/19) do PMBA/Fest-UFES. Esses registros indicam que a ocorrência de fêmeas sem marcas, mas previamente amostradas, não é isolada, sugerindo que a perda de marcas pode ser comum na população monitorada e gerar viés nas estimativas populacionais baseadas apenas em marcação e recaptura (RRDM-RT39D, 2022).

No Ano 5 (2022/23), a identificação genética de um filhote natimorto sem parentesco com as fêmeas já registradas permitiu incluir uma fêmea não flagrada nas análises, contribuindo para melhorar as estimativas de diversidade genética em uma população com número reduzido de indivíduos. No Ano 7, 53,3% dos indivíduos analisados corresponderam a natimortos provenientes de ninhos de fêmeas não amostradas, identificadas a partir do DNA dos natimortos. Nesse mesmo ano, as análises de parentesco também revelaram que uma fêmea encontrada morta, encalhada em Comboios, Aracruz, sem marcas de inconel, havia desovado pelo menos duas vezes na mesma região, uma vez que natimortos de dois ninhos distintos foram identificados como seus descendentes (Figura 7). No Ano 8, duas fêmeas não flagradas em campo foram novamente detectadas por meio das análises genéticas dos natimortos, uma já registrada no Ano 7 e outra no Ano 4. A detecção da fêmea do Ano 7 é particularmente relevante, pois indica remigração anual, um intervalo menos frequente para a espécie, cujas fêmeas geralmente retornam para desovar a cada dois ou três anos na região (COLMAN et al., 2019). Além disso, também no ano 8, um natimorto órfão foi incluído nas análises para representar uma fêmea não registrada em campo nem identificada geneticamente entre as fêmeas previamente amostradas. Esse resultado reforça a importância da área monitorada para a reprodução da tartaruga-de-couro e evidencia a capacidade da genética de detectar eventos que dificilmente seriam reconhecidos apenas pelo monitoramento em campo.

Em conjunto, esses achados demonstram que a análise genética de fêmeas flagradas, fêmeas encalhadas e filhotes natimortos de ninhos de fêmeas não flagradas é essencial para associar descendentes às suas genitoras, identificar remigrantes, detectar fêmeas não observadas em campo e reduzir incertezas sobre o tamanho censitário e o comportamento reprodutivo da população. Dessa forma, a integração entre genética, captura-marcação-recaptura, registro de PIT tags e monitoramento de campo constitui uma abordagem fundamental para responder questões críticas de biologia e conservação da tartaruga-de-couro, especialmente considerando seu estado de espécie criticamente ameaçada.

Figura 7: Representação esquemática das relações de parentesco inferidas entre uma fêmea de tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) encontrada morta, sem marcas de inconel, em Comboios (Aracruz), e dois filhotes natimortos provenientes de ninhos sem registro materno. As relações foram estimadas a partir de marcadores microssatélites no GenAlEx, utilizando o coeficiente de parentesco **R** de Queller & Goodnight (1989). Os resultados indicaram que a fêmea corresponde à provável mãe dos filhotes dos ninhos 335 e 506, com valores de parentesco próximos a 0,5. Além disso, os dois filhotes apresentaram relação compatível com irmãos completos, ou seja, descendentes da mesma mãe e do mesmo pai. Esses resultados indicam que a fêmea desovou ao menos duas vezes na região antes de morrer, evidenciando a importância das análises genéticas para associar filhotes de ninhos "órfãos" às suas respectivas genitoras e ampliar o conhecimento sobre o tamanho e a dinâmica reprodutiva da população.



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-cabeçudas, tartarugas-verdes e tartarugas-de-couro, comparando áreas impactadas no Espírito Santo com áreas controle na Bahia. O período monitorado compreende setembro de 2018 a março de 2026 (PMBA, FEST-RT51-RSE2025), sendo que as coletas nas áreas controle da Bahia foram realizadas até o Ano 6, último período com amostragem nesta região.

Os dados genéticos indicam que as populações de tartarugas marinhas monitoradas já apresentavam sinais de vulnerabilidade antes do rompimento da barragem de Fundão, associados a gargalos populacionais antigos e/ou recentes, baixo tamanho efetivo populacional em algumas espécies e redução de componentes específicos da diversidade genética (Figuras Figura *1*,Figura *2* eFigura *3*). No relatório atual, tartarugas-cabeçudas e tartarugas-verdes mantiveram diversidade nuclear relativamente elevada, enquanto a tartaruga-de-couro apresentou a condição genética mais crítica,

marcada por menor Ne, baixa riqueza alélica relativa e redução da diversidade haplotípica no período pós-rompimento. Esses resultados reforçam que a vulnerabilidade genética não deve ser avaliada apenas por uma métrica isolada, mas pela integração entre diversidade mitocondrial, nuclear, Ne, estrutura genética e histórico demográfico.

O rompimento da barragem de Fundão adicionou novas pressões ambientais a populações que já estavam sujeitas a fatores de risco naturais e antrópicos, e o monitoramento tem permitido avaliar esses efeitos em curto e médio prazo (FRANCO et al., 2024). Considerando o ciclo de vida longo das tartarugas marinhas, possíveis efeitos genéticos de perturbações ambientais podem levar décadas para se manifestar plenamente. Por isso, a continuidade do monitoramento é essencial para distinguir variações temporais naturais de tendências consistentes de perda de diversidade, alteração na composição genética ou redução do tamanho efetivo populacional. Mesmo quando uma população apresenta recuperação aparente em número de indivíduos, isso não garante recuperação genética. O tamanho efetivo populacional (Ne) pode ser substancialmente menor que o tamanho censitário, indicando que apenas uma fração dos indivíduos contribui efetivamente para a próxima geração. Dessa forma, populações numericamente maiores ainda podem apresentar baixa representatividade reprodutiva, maior influência da deriva genética e perda de alelos ao longo do tempo (DIERICKX et al., 2015; NIKOLIC & CHEVALET, 2014; ALLENDORF et al., 2024).

A vulnerabilidade observada é agravada por características da história de vida das tartarugas marinhas, como a filopatria das fêmeas, que pode limitar o fluxo gênico materno entre áreas de nidificação e intensificar diferenças regionais na composição genética. Esse aspecto é especialmente relevante para a tartaruga-de-couro, que apresentou a condição mais crítica entre as espécies avaliadas e já se encontra classificada como “criticamente em perigo” (BRASIL, 2022). Nesse contexto, as análises genéticas têm sido fundamentais para complementar os dados de campo, inclusive ao permitir a identificação indireta de fêmeas não flagradas a partir de filhotes natimortos, ampliando a compreensão sobre a contribuição reprodutiva da espécie na área monitorada (MIGUEL et al., 2022a; MIGUEL et al., 2022b; VARGAS et al., 2022; LUDWIG et al., 2023; MIGUEL et al., 2023; FRANCO et al., 2024).

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, gerando um cenário de estresse crônico e imunossupressão que provoca a progressiva deterioração física e o avanço de doenças em juvenis e adultos. As tartarugas-verdes juvenis que se alimentam na APA Costa das Algas demonstraram ser particularmente vulneráveis, apresentando um declínio abrupto da condição corporal a partir do quarto ano, acompanhado por infestações parasitárias severas e a onipresença de epibiontes. A permanência prolongada desses animais na área de alimentação resulta em uma exposição crônica, evidenciada pelas concentrações crescentes de As e Cu que atingiram o pico no Ano 8. Embora a taxa de fibropapilomatose tenha registrado uma queda temporária no último ano, esse dado pontual pode decorrer da sazonalidade da campanha no período chuvoso ou do recrutamento recente de novos indivíduos pelágicos que ainda não manifestaram sintomas visíveis.

Apesar das tartarugas-cabeçudas passarem menos tempo nas áreas de desova (cerca de três meses anuais), elas também apresentaram uma tendência similar de declínio progressivo na saúde. Houve um aumento significativo e persistente de As, Cu, Fe e Pb no plasma a partir do Ano 5, com os maiores níveis de As e Cu registrados no Ano 8, o que pode ter induzido um quadro de debilidade que desencadeou o avanço de ectoparasitas severos, lesões oculares e piora no escore corporal. Além disso, os ovos e natimortos dessa espécie apresentaram um incremento progressivo de Cu, Fe e Zn, confirmando o risco decorrente tanto da transferência materna quanto da absorção direta do MDL no ninho durante os cerca de 60 dias de incubação.

Para os natimortos das tartarugas-de-couro, o perfil de contaminação apresentou um acúmulo elevado de Fe, Hg e Zn nos últimos anos de monitoramento. Em ambas as espécies avaliadas, a bioacumulação gerou consequências reprodutivas. A presença de elementos embriotóxicos como As, Cd, Hg e Pb reduziu as taxas de eclosão, elevou o número de natimortos e de ovos não eclodidos, e prolongou o tempo de incubação, potencializando a vulnerabilidade dos ninhos e ameaçando a sobrevivência dessas espécies.

A descontinuidade da área controle na Bahia a partir do sétimo ano limitou a comparação entre áreas impactadas e não impactadas, reduzindo a capacidade de avaliar mudanças temporais em genética, saúde e reprodução. Essa limitação é agravada pela redução da representatividade amostral em componentes do monitoramento, o que diminui o poder de detecção de alterações sutis e a robustez das inferências. Portanto, a manutenção de séries temporais consistentes, com esforço amostral equilibrado entre áreas, é essencial para interpretar adequadamente a trajetória das populações monitoradas. 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 dloop 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.

ALLENDORF, F. W.; HÖSSJER, O.; RYMAN, N. What does effective population size tell us about loss of allelic variation? Evolutionary Applications, 17(6), e13733, 2024.

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, WL.; 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_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 25 mar. 2024.

BROQUET, T.; ANGELONE, S.; JAQUIÉRY, J.; JOLY, P.; LÉNA, J.-P.; LENGAGNE, T.; PLÉNET, S.; LUQUET, E.; PERRIN, N. Genetic bottlenecks driven by population disconnection. Conservation Biology, 24(6), 1596-1605, 2010.

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.

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

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.; TILLETT, B. J.; OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) 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.

HOBAN, S.; ARCHER, F. I.; BERTOLA, L. D. et al. Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition. Biological Reviews, 97(4), 1511-1538, 2022.

HOBAN, S.; BRUFORD, M. W.; FUNK, W. C. et al. Global commitments to conserving and monitoring genetic diversity are now necessary and feasible. BioScience, 71(9), 964-976, 2021.

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. GenAlEx 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 crosspecies 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* (Linaeus, 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.

WAPLES, R. S.; ANTAO, T.; LUIKART, G. Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size. Genetics, 197(2), 769-780, 2014.