

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

**Material Suplementar Ambiente Marinho – Tema Cetáceos**

**RT- 43/ JUN 23**

**RA2022 PMBA/Fest**

Vitória,

Junho de 2023

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>4</b>
2.1	COLETA.....	4
2.1.1	Taxa anual de encalhes, de distribuição sazonal e espacial, e de óbitos de cetáceos na costa do Espírito Santo .....	4
2.1.2	Genética, concentração de elementos-traço, concentração de compostos organoclorados e organobromados, hpas, isótopos estáveis, estrutura etária e sexual, histopatologia e microbiologia	6
2.2	ANÁLISE .....	10
2.2.1	Taxa anual de encalhes, de distribuição sazonal e espacial e de óbitos de cetáceos na costa do Espírito Santo .....	10
2.2.2	Índices de diversidade e estruturação genética de cetáceos no litoral do Espírito Santo.....	11
2.2.3	Alterações nas concentrações de elementos-traço em cetáceos.....	13
2.2.4	Alterações nas concentrações de compostos organoclorados em cetáceos .....	14
2.2.5	Alterações nas concentrações de compostos organobromados de origem antrópica e de origem natural em cetáceos .....	14
2.2.6	Alterações nas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cetáceos .....	15
2.2.7	Razão isotópica de C e N em amostras de <i>S. guianensis</i> e <i>P. blainvillei</i> .....	15
2.2.8	Estrutura etária e sexual das populações de <i>S. guianensis</i> e <i>P. blainvillei</i> .....	16
2.2.9	Prevalência de histopatologias.....	17
2.2.10	Prevalência de patógenos bacterianos e fúngicos.....	17
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIA .....	17
<b>3</b>	<b>RESULTADOS DOS INDICADORES.....</b>	<b>18</b>
3.1	TAXA ANUAL DE ENCALHES DE CETÁCEOS NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO. ATENÇÃO ESPECIAL PARA ODONTOCETOS ( <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> ).....	19
3.2	TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO .....	23
3.3	TAXA DE ÓBITO PARA <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE.....	26

3.4	SAÚDE DOS CETÁCEOS .....	29
3.5	ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> .....	33
3.6	ESTRUTURA ETÁRIA E SEXUAL DAS POPULAÇÕES DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> .....	59
3.7	ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS.....	62
3.8	RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> E <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> .....	69
4	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS.....	72
5	REFERÊNCIAS.....	72

## 1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

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

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

## 2 METODOLOGIA

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

### 2.1 COLETA

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

Área de estudo:

A área de estudo abrange o litoral do estado do Espírito Santo com aproximadamente 392 km de extensão, com orientação predominante no sentido NNE norte-nordeste para SSW sul-sudoeste, e localizada em frente às bacias petrolíferas do Espírito Santo e Campos. A amplitude se estende entre as latitudes 18.33°S no município de Conceição da Barra, até 21.30°S no município de Presidente Kennedy. O escoamento sobre a plataforma continental é predominantemente sul-sudoeste, principalmente ao longo da quebra da plataforma onde corre a Corrente do Brasil (Ghisolfi et al., 2015). O padrão de ventos é predominantemente norte-

nordeste, principalmente na primavera e verão austral, e sul-sudeste-leste associado à passagem de frentes frias, principalmente no inverno austral (Ghisolfi et al., 2015). A temperatura do ar no período estudado apresentou média de  $24.4^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ , com mínima de  $15.8^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $29.9^{\circ}\text{C}$ . A temperatura da água é amena, com temperatura média no inverno em torno de  $24^{\circ}\text{C}$  (Bezamat et al., 2015).

#### Monitoramento e dados de encalhe:

Os procedimentos de registro, resgate e exame de cetáceos encalhados seguem basicamente as recomendações do Protocolo da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE) (IBAMA, 2005). Além disso, grande parte dos procedimentos são baseados no guia Marine Mammals Ashore (Geraci & Lounsbury, 2005) e no Protocolo de Necrópsia de Baleias Francas (McLellan et al., 2004). Os registros de cetáceos encalhados são obtidos pelo Programa de Monitoramento de Praias das Bacias de Campos e Espírito Santo (PMP-BC/ES) em um acordo de parceria técnica com duas instituições responsáveis, integrantes da REMAB (Rede Brasileira de Encalhamento de Mamíferos Aquáticos), o Instituto Baleia Jubarte (IBJ) e o Instituto ORCA (licenças SISBIO n. 13303-9 e 64724-8) e em cooperação com o PMBA/Fest. As praias são monitoradas diariamente pelo PMP-BC/ES para detectar cetáceos encalhados usando predominantemente quadriciclos. Animais vivos encontrados pelos monitores do PMP-BC/ES são notificados imediatamente para as equipes de resgate do IBJ e ORCA procederem com o atendimento. Em se tratando de pequenas carcaças estas são recolhidas e entregues ao IBJ ou ORCA conforme área de atuação. Carcaças ao norte da foz do Rio Doce são encaminhadas para o IBJ e ao sul do Rio Doce para o ORCA. Grandes carcaças, acima de 3 metros são examinadas *in situ*. Todas as carcaças passam por exames necroscópicos visando o diagnóstico da causa do óbito e a colheita de amostras biológicas para finalidades de pesquisas específicas e para complementação do diagnóstico. Esta amostragem segue padrões sistemáticos para atender os padrões necessários para análise histopatológica e medição de contaminantes ambientais.

#### Espécies alvo:

Embora um total de 20 espécies de mamíferos marinhos tenham sido relatados na região do monitoramento ao longo dos 40 anos anteriores ao desastre (Mayorga et al., 2020), o presente estudo concentra resultados em duas espécies de cetáceos, consideradas alvo, por serem costeiras e estuarinas o botos-cinza (*Sotalia guianensis*) e a toninha (*Pontoporia blainvillei*). Além do aspecto costeiro, são residentes, encontradas na área durante todo o ano e provavelmente os cetáceos mais afetados pelos rejeitos do rompimento da barragem de Fundão.

#### Estágios de decomposição:

A classificação dos estágios de decomposição inicialmente proposta por Kuiken & García-Hartmann (1991) foi utilizada para orientar a coleta de amostras biológicas. Os códigos de decomposição morfológica são subdivididos de I a V, onde: I é o animal vivo (torna-se código II ao morrer); o código II é quando a carcaça

está muito fresca (sem inchaço); o código III é decomposição moderada (inchaço, descamação da pele, mas órgãos ainda intactos); o código IV é quando a decomposição é avançada (inchaço significativo, órgãos irreconhecíveis) e, finalmente; código V quando nenhum órgão está presente. Quanto mais avançado o estágio de decomposição maior a dificuldade para se determinar diagnósticos macroscópicos e também mais limitados são os aproveitamentos laboratoriais relacionados com os exames complementares.

Sexagem:

A sexagem é definida com base na avaliação morfológica do sistema reprodutor externo ou avaliação das estruturas anatômicas internas relacionadas com o aparelho reprodutor, por exemplo, gônadas.

Faixa etária:

A faixa etária é definida com base no comprimento total (CT) dos animais, de modo que para o boto cinza na região do estudo, filhotes são considerados animais inferiores a 1m, juvenis entre 1m e 1,75m e adultos acima de 1,75m. Já para as toninhas, os filhotes são considerados animais inferiores a 0,74m, juvenis entre 0,74m e inferiores a 1,1m e adultos superiores a 1,1m.

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

As análises laboratoriais são realizadas em amostras coletadas de carcaças de cetáceos recolhidas nas praias da área monitorada. Os animais encalhados, normalmente são encontrados mortos. Amostras de biópsias de cetáceos podem ser coletadas durante os cruzeiros do projeto. A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1: Relação dos parâmetros a serem analisados para cetáceos na área a ser monitorada.

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

*I. Procedimento de coleta por análise:*

a) Mercúrio e elementos-traço

São coletadas amostras de músculo, fígado e rim de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). Aproximadamente 100g de amostras de músculo (dorsal, lado esquerdo), fígado e rim (esquerdo) são enviadas para UERJ. As amostras são acondicionadas em sacoplástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

b) Organoclorados e organobromados

São coletadas amostras de gordura de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras devem ter aproximadamente 100g e são enviadas à UERJ. As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio (para evitar o contato com o plástico) dentro de saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

c) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

São coletadas amostras de fígado de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras devem ter aproximadamente 100g e são enviadas à UERJ. As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio (para evitar o contato com o plástico) dentro de saco plástico zip, identificadas com etiquetas pelo lado de fora e armazenadas em freezer.

d) Isótopos estáveis

Devem ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras de músculo devem ter aproximadamente 20g. As amostras devem ser acondicionadas em saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer. As amostras são enviadas à UERJ.

e) Análise reprodutiva

Devem ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). Os testículos e ovários são pesados, medidos e fotografados.

Os ovários inteiros devem ser identificados como direito e esquerdo, e fixados em formol 10%. É importante observar que para a preservação adequada a proporção amostra: preservativo deve ser de 1:10, podendo ser reduzida, após a completa formolização (mínimo de 48h), para o envio. Os ovários são enviados à UERJ, onde são examinados e um fragmento deve ser coletado e encaminhado à UENF para análise histopatológica, seguindo o protocolo descrito abaixo (seção h).

Os testículos direito e esquerdo devem ser seccionados longitudinalmente. A face interna da metade direita devem ser coletados três fragmentos de cerca de 1cm<sup>3</sup> cada, seguindo o protocolo de coleta para histopatologia. Os três fragmentos (das porções cranial, mediana e distal) são colocados em um mesmo cassete histológico, identificado como direito ou esquerdo. O procedimento deve ser repetido para o outro testículo. Os dois cassetes devem ser acondicionados em um mesmo frasco identificado, contendo formol 10%, e observando a proporção de 1:10 descrita acima. Os testículos são enviados à UERJ.

#### f) Genética

Devem ser coletadas amostras de pele ou músculo de carcaças em qualquer estado de conservação. As amostras devem ter tamanho aproximado de um grão de feijão. Idealmente, coletar duas amostras de cada animal e colocar em um mesmo microtubo. Preparar dois microtubos para cada animal. Armazenar em álcool 100% e se possível, guardar no freezer, até o envio para o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES/UFES, São Mateus, ES.

#### g) Idade

Para a determinação de idade devem ser enviados, preferencialmente, dentes da porção central da mandíbula esquerda. Os dentes devem ser macerados para eliminação do tecido e mantidos secos à temperatura ambiente, em frasco devidamente identificado. Para acelerar a análise, os dentes devem ser coletados durante a necropsia, armazenados em frasco e enviados junto com os tecidos para as análises de contaminantes, para serem macerados na UERJ, onde são feitas as determinações de idade. É ideal enviar no mínimo 5 dentes de cada indivíduo, selecionando os mais retos. Também é ideal manter os outros dentes em coleção própria, caso seja necessário envio de mais dentes.

#### h) Histopatologia

Com a certificação do óbito dos animais encontrados nas praias é realizada a necrópsia nos institutos parceiros, com a retirada de fragmentos de tecidos para avaliação histopatológica no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF. Durante a necropsia os órgãos devem ser avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies e, os com suspeita de lesões, devem ser coletados em fragmentos com até 1 cm de espessura e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada à 10% por no mínimo 48h, excetuando-se o coração, que é colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Para as análises ósseas, após necropsia dos espécimes as ossadas passam por maceração ou são enterradas e após período variável são limpos e destinados para avaliação.

#### i) Microbiologia

Para as análises bacteriológicas e fúngicas, as amostras devem ser coletadas por meio de swabs com meio Stuart, acondicionadas em geladeira e enviadas ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA) da UENF.

## II . Procedimento de coleta por tecido

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

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

Quadro 2: Resumo das amostras a serem coletadas dependendo do estágio de decomposição da carcaça. Legenda: M – músculo, F – fígado, R – rim, G – gordura, T – testículo, O – ovário, P – pele, D – dente.

<b>Código de decomposição</b>	<b>Mercúrio + elementos</b>	<b>Clorados + bromados</b>	<b>HPAs</b>	<b>Isótopos</b>	<b>Reprodução</b>	<b>Genética</b>	<b>Idade</b>
2	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
3	M, F, R	G	F	M	T ou O	M ou P	D
4						M ou P	D
5						M ou P	D

## 2.2 ANÁLISE

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

Análise sazonal:

Análises sazonais são apresentadas apenas em relatórios anuais uma vez que requer os 12 meses de cada ano de monitoramento. Além disso são analisadas as épocas de período chuvoso (outubro a março) e seca (abril a setembro). As comparações de taxas de encalhe para ambas as análises apresentadas, são baseadas nas fases do monitoramento, entre elas pré-rompimento, pré-PMBA/Fest, Anos 1, 2, 3 e 4.

Fases do estudo:

As fases de estudo compreendem: a fase pré-rompimento que compreende dados de encalhes pretéritos ao rompimento ocorridos desde 01/01/2012 até 22/11/2015 (1421 dias), até a data que chegou os rejeitos no mar. A fase pré-PMBA/Fest compreende dados históricos de encalhe desde 23/11/2015 até a véspera do início do PMBA/Fest em 30/9/2018 (1043 dias). A fase PMBA/Fest Ano 1 vai de 01/10/2018 até 30/9/2019 (365 dias). A fase PMBA/Fest Ano 2 vai de 01/10/2019 até 30/09/2020 (365 dias). A fase PMBA/Fest Ano 3 vai de 01/10/2020 até 30/10/2021 (365 dias). E a fase PMBA/Fest Ano 4 vai de 01/10/2021 até 30/09/2022 (365 dias). Para a geração de índices de comparação baseado em ocorrências mensais, filtrou-se as ocorrências referentes primeiramente ao período chuvoso e seco, então, os totais de dias foram divididos por 30, assim sendo, a fase pré-rompimento ficou com 24 meses, a fase pré-PMBA/Fest ficou com 17 meses e as demais fases Anos 1, 2, 3 e 4 com seis meses cada. O mesmo princípio foi aplicado para analisar estações anuais.

#### Análises gerais:

Os dados foram classificados mediante o uso de tabelas dinâmicas do Microsoft Office Excel®. Análises estatísticas de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram realizadas pelo software Past 4.03 (Hammer et al., 2001). Teste de modelo linear generalizado (GLM) e gráficos realizados com RStudio (RStudio Equipe, 2019).

Nos relatórios anuais anteriores foram apresentados cinco indicadores para avaliar o impacto nas espécies de cetáceos do litoral do ES referente ao rompimento da barragem de Fundão em Mariana, contudo a partir do quarto ano apenas três deste indicadores serão avaliados, entre eles: a) Taxa anual de encalhes por espécie de cetáceos na costa do Espírito Santo; b) Taxa de distribuição sazonal de encalhes de cetáceos na costa do Espírito Santo; c) Taxa de óbito para cetáceos do Espírito Santo por diagnóstico da causa mortis. Os dois indicadores removidos das análises correspondem ao I) Taxa de distribuição espacial de encalhes de cetáceos na costa do Espírito Santo, e II) Taxa de distribuição espacial de encalhes de cetáceos do Espírito Santo em relação à Foz do Rio Doce. A decisão pela exclusão destes indicadores baseia-se no fato de que estes parâmetros não foram úteis para a finalidade de avaliação de impacto. Uma série de fatores precisam ser levados em consideração, como a mobilidade e dos animais pela área, forrageamento errático, eventual mortalidade fora da área impactada, deriva de carcaças entre locais de óbitos e locais de encalhes, e eventual arrasto de animais convalescentes por correntes oceânicas.

Para a análises temporais, utilizou-se a razão entre o número de encalhes de cada espécie (eventos) pelo número de meses correspondente de cada fase. Para análises sazonais e de época os números de eventos são divididos pela quantidade de dias de cada período correspondente.

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

Os tecidos coletados são utilizados em análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES (São Mateus), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Para a extração do DNA é utilizado o método de solução salina em que, um pequeno pedaço de músculo é picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, é obtido a solução contendo o DNA extraído. Ao final do processo o DNA é ressuspensionado com a adição de 20  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O e armazenado na geladeira a 4°C. Em seguida, as amostras de DNA são quantificadas em espectrofotômetro.

Em seguida o DNA é amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Após a amplificação dos fragmentos, as reações são purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Cada amostra é submetida a reações de sequenciamento nos dois sentidos para avaliação de marcadores mitocondriais e genotipagem para avaliação de marcadores nucleares (microsatélites).

As sequências mitocondriais são alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) são calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica ( $\pi$ ), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações. As redes de haplótipos são construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999).

Para as análises dos microsatélites, os locos são identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos é estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) e os genótipos dos indivíduos avaliados são comparados para os locos de microsatélites a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

O desequilíbrio de ligação entre os locos é verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também são testados quanto à presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos *stutter* utilizando-se o programa Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al. 2004), com correção de Bonferroni.

Para as análises intrapopulacionais são calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) e Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010).

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) é realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional é realizada uma análise de cluster bayesiana a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microsatélites e dos locais de coleta utilizando o software Structure v.2.3.2 (Pritchard et al. 2000). Após a alocação dos indivíduos em cada cluster, é realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também são calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Valores de P são considerados significativos no nível de 0,01 ( $P \leq 0,01$ ) e 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

É feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os primers a serem utilizados são ZFX0582, ZFX0923 (Bérube & Palsboll, 1996), PMSRYF (Richard et al. 1994) e TtSRYR (Rosel et al. 2003). As reações de PCR são confeccionadas com: Tampão 10x, 150  $\mu$ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de  $MgCl_2$  e 0,3  $\mu$ M de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que é aplicado 0,06  $\mu$ M. O volume final é de 25  $\mu$ L. A amplificação é realizada nas seguintes condições: 92°C

por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos são separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética é realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas é realizada com o auxílio de luz UV e estas são fotografadas.

### 2.2.3 Alterações nas concentrações de elementos-traço em cetáceos

As análises de contaminantes são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ. Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), alíquotas de aproximadamente 0,3g de músculo, fígado e rim das amostras frescas foram atacadas a frio com 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após essa etapa, foi adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>) v/v, seguido por aquecimento em banho-maria a 60°C por 2 horas até a solubilização completa da amostra. Os extratos foram resfriados por quinze minutos e foram adicionados 5mL de KMnO<sub>4</sub> (5%). As amostras retornaram ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e foram resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte, o extrato foi reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH<sub>3</sub>), 12%. O digerido final foi avolumado com água Milli-Q até 14mL. As determinações foram realizadas usando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (Malm et al. 1989; Bastos et al. 1998). A certificação do método de determinação do HgT foi feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de *Dogfish*) e DORM-5 (músculo de *Dogfish*) do *National Research Council* do Canadá, apresentando recuperação média de 98 ± 2 %, de 102 ± 7 %, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com coeficiente de variação aceitável de até 20%, além da utilização de brancos analíticos em todas as baterias. O limite de detecção do equipamento foi de 0,45 µg.L<sup>-1</sup> e de quantificação foi de 0,03 µg.g<sup>-1</sup>. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

Para a determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn), alíquotas de aproximadamente 0,2g de músculo, fígado e rim foram colocadas em tubos com tampa. A digestão das amostras foi realizada através da adição de 2mL de ácido nítrico concentrado (65%) que agiu *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram colocadas em banho-maria a 60°C por 2 horas (Dorneles et al., 2007; Lailson-Brito et al., 2012). Após o resfriamento das amostras, o digerido final foi avolumado com água Milli-Q até 10mL. A determinação das concentrações dos elementos foi realizada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS) equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), preparada a partir de uma solução padrão (Merck No.B9366989 710), foi utilizada como modificador químico. O controle de qualidade foi efetuado através do uso de materiais certificados de referência do *USA National Institute of Standards and Technology* e/ou do *National Research Council* do Canadá. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com coeficiente de variação aceitável de até 20%, além da utilização de brancos analíticos em todas as baterias. Os limites de detecção do equipamento foram: 6,33 µg.L<sup>-1</sup> para arsênio (As); 0,10 µg.L<sup>-1</sup> para cádmio (Cd); 0,26 µg.L<sup>-1</sup> para cobre (Cu); 2,38 µg.L<sup>-1</sup> para ferro (Fe); 0,36 µg.L<sup>-1</sup> para manganês (Mn) e 1,42 µg.L<sup>-1</sup> para Zinco (Zn). Já os limites de detecção dos métodos foram de: 0,30 µg.g<sup>-1</sup> para As; 0,01 µg.g<sup>-1</sup> para Cd; 0,01 µg.g<sup>-1</sup> para Cu; 0,05 µg.g<sup>-1</sup> para Fe; 0,02 µg.g<sup>-1</sup> para Mn e 0,07 µg.g<sup>-1</sup> para Zn. A recuperação do material certificado de referência DOLT-5 (em %) foi de: 99 ± 17 para As; 101 ± 5 para Cd; 97 ± 6 para Cu; 105 ± 8 para Fe e 106 ± 7 para Zn. A recuperação do TORT-2 para Mn foi de 105 ± 10 %. As concentrações do branco foram descontadas das concentrações das amostras quando estas estavam acima do limite de detecção. As análises

estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

#### **2.2.4 Alterações nas concentrações de compostos organoclorados em cetáceos**

As análises de contaminantes são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação de compostos organoclorados, cerca de 1g de gordura foi utilizada. Os padrões internos PCB 103 e PCB 198 foram adicionados às amostras e as extrações foram realizadas com aparelhos de soxhlet e balões volumétricos aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes utilizada na extração foi hexano e diclorometano (1:1) (v/v) e o conteúdo lipídico foi quantificado por gravimetria. O volume final foi reduzido para prosseguir às etapas de purificação com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LAILSON-BRITO et al., 2012; SANTOS-NETO et al., 2014) seguida de eluição em coluna de óxido de alumínio neutro com diclorometano e hexano (2:1) e diclorometano e metanol (9:1). Os pesticidas e as bifenilas policloradas (PCBs) foram mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massas (MS) e o GC-MS operou em modo de impacto de elétrons (EI). Foi aceita uma variação de 30% na recuperação do padrão interno (média  $\pm$  DP: 111  $\pm$  11%). Ao todo foram analisados 7 pesticidas e 27 congêneres de PCB. As concentrações finais foram corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como a determinação do limite de quantificação. O limite de quantificação para os pesticidas organoclorados variou entre 0,001 e 0,002 g.g<sup>-1</sup>lip.

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

As análises de contaminantes são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação de compostos organobromados de origem antrópica e natural, cerca de 1g de gordura foi utilizada. O padrão interno PBDE 181 foi adicionado às amostras e as extrações foram realizadas com aparelhos de soxhlet e balões volumétricos aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes utilizada na extração foi hexano e diclorometano (1:1) (v/v) e o conteúdo lipídico foi quantificado por gravimetria. O volume final foi reduzido para prosseguir às etapas de purificação com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguida de eluição em coluna de óxido de alumínio neutro com diclorometano e hexano (2:1) e diclorometano e metanol (9:1) (DORNELES et al., 2010; ALONSO et al., 2012). Os PBDEs e MeO-PBDEs foram mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS). O GC-MS foi operado no modo de ionização química negativa (ECNI). A amônia foi utilizada como gás reagente e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólio e interface foram ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS foi utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons m/z = 79 e 81 (de tri- a heptaBDEs) monitorados durante toda a corrida. Foi aceita uma variação de 30% na recuperação do padrão interno (média  $\pm$  DP: 95  $\pm$  21 %). Os compostos organobromados de origem antrópica analisados consistiram em 7 congêneres de PBDEs, PBEB e HBBZ, além de 8 congêneres de MeO-BDE de origem natural. As concentrações finais foram

corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através da determinação dos limites de quantificação (LQ). Dentre os compostos antrópicos, o LQ variou entre 0,0001 e 0,0005 g.g<sup>-1</sup>lip enquanto dentre os compostos naturais, o LQ variou entre 0,0001 e 0,0006 g.g<sup>-1</sup>lip. A certificação dos compostos se deu por meio da análise do material de referência de tecido adiposo de baleia-piloto (*Standard Reference Material* 1945, *National Institute of Standards and Technology*) e a recuperação dos compostos foi aceita de acordo com os critérios estabelecidos por Wade & Cantillo (1994). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

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

As análises de contaminantes são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

A metodologia de análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi adaptada e otimizada a partir de procedimentos descritos pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, *Environmental Protection Agency*), Yoshimine e Carreira (2012) e por Barros (2014). Resumidamente, alíquotas de amostras liofilizadas foram pesadas e extraídas em soxhlet com diclorometano durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram reduzidas e purificadas através de um pré-fracionamento por cromatografia líquida em coluna aberta com óxido de alumínio neutro desativado a 2%. A eluição foi realizada com diclorometano. Essa etapa foi realizada duas vezes. Em seguida, as amostras foram reduzidas em um evaporador rotativo a vácuo e a amostra passou por mais uma etapa de purificação em coluna cromatográfica aberta de vidro com óxido de alumínio desativado a 2%, sílica gel desativada a 5% e sulfato de sódio, e foi eluído uma mistura de hexano: diclorometano (1:1). O extrato foi reduzido em fluxo de nitrogênio, seguido da adição do padrão interno de quantificação e avolumados a 1mL com n-hexano. Todas as análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS) com um analisador Quadrupólo com injetor automático, o qual operou no modo de Impacto de Elétrons. Foi aceita recuperação de 40 a 110% do padrão interno (WEIJS et al., 2016), com média de  $77 \pm 19$  %. Ao todo, foram analisados 6 HPAs contendo de 2 a 3 anéis aromáticos (HPAs<sub>2-3 anéis</sub>) em sua composição e 12 HPAs de 4 a 6 anéis aromáticos (HPAs<sub>4-6 anéis</sub>). O controle de qualidade foi realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através da determinação dos limites de quantificação (LQ). Dentre os HPAs<sub>2-3 anéis</sub>, o LQ variou entre 0,0002 e 0,003 g.g<sup>-1</sup>lip enquanto dentre os HPAs<sub>4-6 anéis</sub>, o LQ variou entre 0,001 e 0,006 g.g<sup>-1</sup>lip. A certificação dos compostos se deu por meio da análise do material de referência de tecido de mexilhão (*Standard Reference Material* 2977, *National Institute of Standards and Technology*). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA versão 7.0 para Windows (StatSoft, Inc. 1984–2004, USA).

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

Essas análises são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

A determinação das razões isotópicas de carbono e de nitrogênio foi realizada em tecido muscular dos cetáceos e das suas principais presas (peixes teleósteos – identificadas por meio da análise do conteúdo

estomacal, e.g: Borobia & Barros, 1989; Di Benedito & Siciliano, 2007; Rupil et al. 2018). Alíquotas dos músculos são secos em estufa à 50°C por 72h, macerados até se tornar um pó homogêneo e, então, pesados 0,3 mg de cada amostra em cápsula de estanho. A mensuração foi feita em espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS-Delta VAdvantage, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao analisador elementar C-N-S (Flash 2000). As razões isotópicas são expressas pela notação delta ( $\delta$ ) em partes por mil, segundo a equação  $X = [(Ramostra/Rpadrão) - 1] \times 1000$ , onde X é  $^{13}C$  ou  $^{15}N$ , e R representa a razão  $^{13}C/^{12}C$  ou  $^{15}N/^{14}N$ . Para o carbono o padrão utilizado é o fóssil Belemnita da formação PeeDee - PDB e para o nitrogênio o  $N_2$  atmosférico. O controle de qualidade analítico foi feito por meio do uso de materiais certificados de referência e brancos analíticos em todas as análises. Foi calculada a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra e quando o valor foi maior que 3,5, foi feita a normalização matemática dos resultados de  $\delta^{13}C$ , segundo a equação:  $\delta^{13}C_{normalizado} = \delta^{13}C_{sem\ tratamento} - 3,32 + 0,99 \times C:N$  (Post et al., 2007).

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

As análises de determinação de estágio reprodutivo e de idade são realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ.

A idade dos odontocetos foi estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, Growth Layer Groups), depositados na dentina e/ou cemento do dente desses animais (Perrin & Myrick, 1980). A determinação da idade foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo são colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, são realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, com cerca de 25 micrometros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento. Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente são colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados são colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lâminula e selados com Entellan. As leituras são realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas são coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, são fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Fragmentos da região central do testículo contendo 1 cm<sup>3</sup> são emblocados em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos são seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as seções são coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras são realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade foi avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também são avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al., 1985). Os ovários são inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, são realizadas seções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os corpúsculos e folículos resultantes da ovulação são registrados. A determinação da maturidade sexual foi baseada em Perrin e

Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans são consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpus lúteo ou albicans em um ovário são consideradas maduras.

### **2.2.9 Prevalência de histopatologias**

Amostras de tecidos colhidas durante a realização das necropsias dos cetáceos já fixadas em formalina neutra tamponada a 10% são clivadas em fragmentos menores e acondicionadas em histossetes plásticos para o processamento histológico no processador automático, onde são desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo as amostras de tecidos são cortados no micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Os cortes são coletados em lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica no microscópio óptico. As patologias ósseas são identificadas com base na avaliação morfológica dos ossos após o processo de maceração, considerando a comparação com o padrão anatômico normal, conforme registros da literatura para a espécie.

### **2.2.10 Prevalência de patógenos bacterianos e fúngicos**

Para as análises microbiológicas, as amostras coletadas com swab com meio stuart são semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Em seguida, as amostras são incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano são repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. É realizado um esfregaço da cultura em lâmina histológica e visualização em microscópio de luz para a verificação da morfologia e coloração para gram. Testes de oxidase e catalase também são realizados para auxiliar na classificação que é realizada através de chave de identificação. Também pode ser realizada a identificação microbiana com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os microrganismos identificados, são realizados os antibiogramas e/ou antifungigramas.

## **2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIA**

Os parâmetros “Ocorrência de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* na região que abrange a foz do rio Doce até a foz do rio Piraquê-açu, presença de filhotes na composição dos grupos observados e registro de comportamento de alimentação” e “Interação dos cetáceos com a pesca” não foram contemplados no Novo Ciclo do PMBA/Fest em agosto de 2022. Tais parâmetros foram avaliados de setembro de 2018 a julho de 2022.

Desde o início do PMBA/Fest, para as análises de isótopos estáveis, idade e reprodução e de contaminantes em cetáceos, a área de coleta do boto-cinza foi subdividida em cinco regiões, com o intuito de investigar o uso do habitat e possível ocorrência de populações ecológicas distintas da espécie ao longo da costa do estado do Espírito Santo. Ao longo do monitoramento, não foi verificada diferença nos resultados entre os indivíduos coletados nas regiões 3 e 4 em relação à área de forrageamento e ecologia alimentar, apontando que eles pertencem a um mesmo grupo ecológico. Sendo assim, a partir do presente relatório, os dados dessas duas regiões serão tratados de forma conjunta, identificado como: “região 3/4” ou “Barra do Riacho e

Metropolitana”.

A metodologia da análise de elementos-traço em cetáceos não sofreu alterações no preparo das amostras e nos métodos utilizados no equipamento para a determinação das concentrações. Entretanto, devido às variações na estabilidade do equipamento e nas baterias de amostras realizadas, são esperadas algumas alterações nos valores dos limites de detecção e de quantificação ao longo do tempo, bem como os valores de recuperação dos materiais certificados. Dessa forma, ao longo do PMBA/Fest, novos limites foram adquiridos e reportados nas planilhas de dados brutos e validadores conforme foram obtidos. Para As: 0,63; 0,31; 0,26; 0,11; 0,13  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ; para Cd: 0,002 e 0,03  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ; para Mn: 0,03; 0,10 e 0,08  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Para Cu, Fe e Zn os limites permaneceram iguais ao longo dos anos do PMBA/Fest. Apesar de variações, as recuperações dos materiais certificados para todos os elementos-traço analisados em cetáceos se mantiveram entre  $100 \pm 20\%$  ao longo do PMBA/Fest.

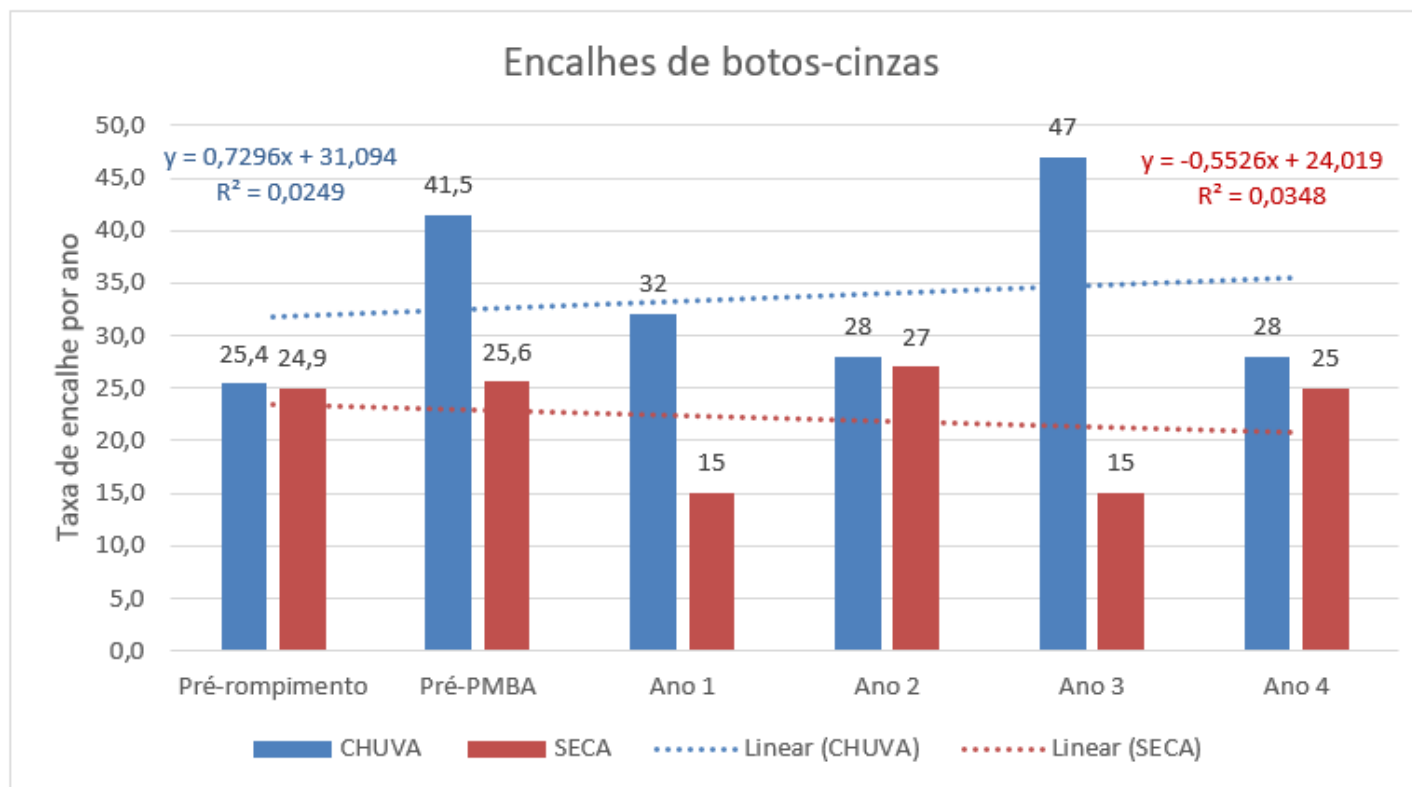
### 3 RESULTADOS DOS INDICADORES

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

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

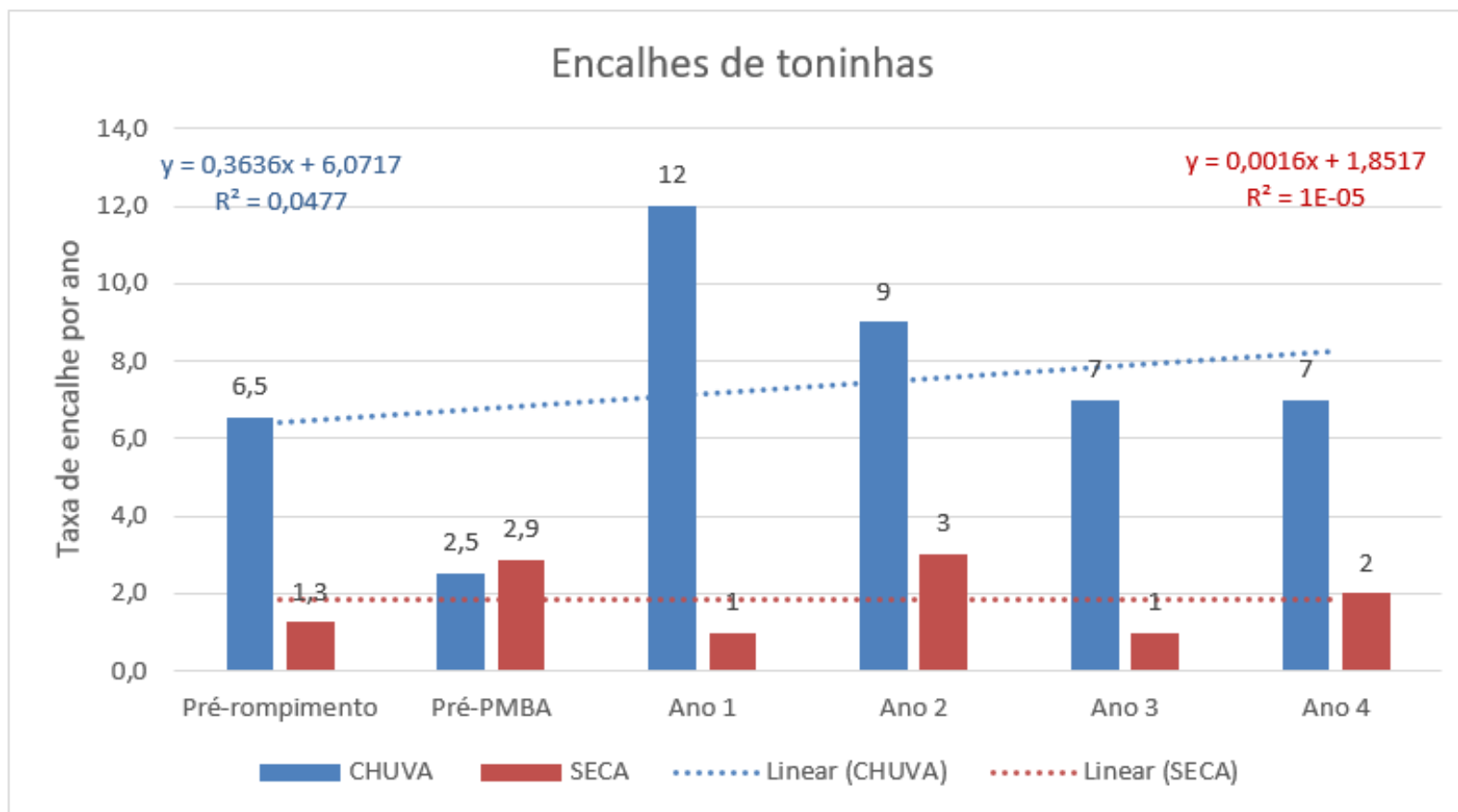
### 3.1 TAXA ANUAL DE ENCALHES DE CETÁCEOS NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO. ATENÇÃO ESPECIAL PARA ODONTOCETOS (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*)

Figura 1: Taxa de encalhes de botos-cinza por ano ao longo do período chuvoso e seco nas fases de monitoramento



A razão das taxas de encalhes anuais no Ano 4 é bastante parecida com a observada nas fases pré-rompimento e Ano 2. No entanto, nas fases pré-PMBA, Ano 1 e Ano 3 apresentaram razão na ordem de 1,6, 2,1 e 3,1 vezes mais encalhes na estação de chuvas em comparação com a época de seca, porém devem ser analisados com cuidado, associados as causas de óbitos e condições oceanográficas.

Figura 2: Taxa de encalhes de toninhas por ano ao longo do período chuvoso e seco nas fases de monitoramento



Para as toninhas essa taxa de encalhes apresentou maiores índices no período chuvoso ao longo de todo o estudo, com exceção na fase pré-PMBA, que ocorre uma inversão nos resultados, apresentando pico no período seco. Além disso, nos anos consecutivos, os encalhes voltaram a apresentar os maiores índices no período chuvoso, porém com altos índices, como no Ano 1, a razão da taxa de encalhes foi 12 vezes maior que no período seco. Esses resultados sugerem indícios de impacto, porém devem ser analisados com cuidado, associados às causas de óbitos e condições oceanográficas.

Quadro 3: Lista de espécies com ocorrência de encalhe durante as fases de monitoramento (desde 01 de janeiro de 2015 a 30 de setembro de 2022), espécies-alvo estão destacadas em laranja.

Espécies	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<i>Balaenoptera edeni</i>						1	1
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>			1			1	2
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>				1			1
Balaenopterideo			4	2	1		7
Delfinideo				1			1
<i>Kogia sp.</i>				1			1
<i>Megaptera novaeangliae</i>			11	14	17	11	53
<i>Peponocephala electra</i>				1			1
<i>Physeter macrocephalus</i>				1			1
<i>Pontoporia blainvillei</i>	31	15	13	12	8	9	88
<i>Sotalia guianensis</i>	200	186	47	55	62	53	603
<i>Stenella longirostris</i>					1		1
<i>Stenella sp.</i>	1						1
<i>Steno bredanensis</i>	1		2		2		5
<i>Tursiops truncatus</i>				2	2	1	5
<i>Delphinus delphis</i>						1	1
Total Geral	233	201	78	90	93	76	772

Durante os quatro anos de estudo foi registrada a ocorrência de 13 gêneros identificados ao longo da costa do Espírito Santo. No período chuvoso, foram constatadas 35 ocorrências de encalhes, com apenas as duas espécies-alvo, sendo o boto-cinza (*Sotalia guianensis*) com 80% (n=28) e a toninha (*Pontoporia blainvillei*) com 20% (n=7). Durante o período seco foram constatadas 42 ocorrências com sete espécies, três destas são balaenopterídeos de hábitos migratórios. Neste período, o boto-cinza apresentou 59,5% (n=25) e a toninha com 4,7% (n=2) dos encalhes.

Quadro 4: Percentual de sexo de botos-cinza encalhados nas fases de monitoramento. Na última linha é apresentado a razão sexual entre machos e fêmeas.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Macho</b>	35,5%	41,4%	<b>63,8%</b>	50,9%	48,4%	49,1%	43,4%
<b>Fêmea</b>	17,5%	18,8%	31,9%	27,3%	<b>40,3%</b>	39,6%	24,2%
<b>Indeterminado</b>	<b>47,0%</b>	39,8%	4,3%	21,8%	11,3%	11,3%	32,3%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Razão M/F*	2,0:1	2,2:1	2,0:1	1,9:1	1,2:1	1,2:1	1,8:1

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

Destaque laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias de sexo. Devido as condições das carcaças, nem todos os exemplares puderam ser sexados, apresentando 11,3% indeterminados. Os botos-cinza ao longo dos anos de estudo, apresentaram mais encalhes de machos do que fêmeas. E no Ano 4, os machos apresentaram 9,5% ocorrências a mais em relação as fêmeas, ou a razão de 1,2:1.

Quadro 5: Percentual de sexo das toninhas encalhadas nas fases de monitoramento.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Macho</b>	16,1%	<b>46,7%</b>	46,2%	33,3%	25,0%	33,3%	30,7%
<b>Fêmea</b>	<b>32,3%</b>	6,7%	30,8%	<b>33,3%</b>	0%	11,1%	22,7%
<b>Indeterminado</b>	51,6%	46,7%	23,1%	33,3%	<b>75,0%</b>	55,6%	46,6%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Razão M/F*	0,5:1	7:1	1,5:1	1:1	#DIV/0**	3:1	1,35:1

\* Razão M/F é expressa pela divisão entre o número absoluto de machos por fêmeas. \*\* DIV/0 = Divisão por zero

Na última linha é apresentada a razão sexual entre machos e fêmeas. Destaque laranja para os maiores valores entre fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias de sexo. Devido as condições das carcaças, nem todos os exemplares puderam ser sexados, apresentando 55,6% indeterminados. As toninhas apresentaram mais encalhes de machos do que fêmeas, com exceção na fase pré-rompimento que encalharam o dobro de fêmeas, e na fase pré-PMBA/Fest que apresentou sete vezes mais encalhes de machos do que fêmeas. E no Ano 4, os machos apresentaram 22,2% ocorrências a mais em relação as fêmeas, ou a razão de 3:1.

Quadro 6: Percentual de faixa etária de botos-cinza encalhados nas fases de monitoramento.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Filhote</b>	3,0%	5,4%	<b>12,8%</b>	5,5%	6,5%	5,7%	5,3%
<b>Juvenil</b>	31,0%	<b>42,5%</b>	31,9%	32,7%	38,7%	24,5%	35,0%
<b>Adulta</b>	<b>55,0%</b>	45,2%	55,3%	58,2%	51,6%	<b>66,0%</b>	52,9%
<b>Indeterminada</b>	<b>11,0%</b>	7,0%	0%	3,6%	3,2%	3,8%	6,8%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Destaque laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias de faixa etária. Para os botos-cinza, no Ano 4 os encalhes predominantes permaneceram sendo a de animais adultos (66%), assim como observado nas demais fases de monitoramento e na avaliação total das fases. Na série histórica de monitoramento, o maior percentual de filhotes foi observado na fase de Ano 1 (12,8%), o que corresponde a 9,8 pontos percentuais acima do observado na fase de pré-rompimento. Já a maior ocorrência de encalhe de botos-cinza juvenis foi observada na fase pré-PMBA/Fest (42,5%), ou seja 11,5 pontos percentuais acima do observado na fase de pré-rompimento. Esses resultados são sugestivos de impacto dos rejeitos, sobre a mortalidade de botos-cinzas mais jovens nos primeiros anos após a rompimento da barragem.

Quadro 7: Percentual de faixas etárias de toninhas encalhadas nas fases de monitoramento.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Filhote</b>	16,1%	<b>33,3%</b>	23,1%	16,7%	25,0%	<b>33,3%</b>	22,7%
<b>Juvenil</b>	<b>51,6%</b>	46,7%	61,5%	25,0%	<b>62,5%</b>	55,6%	50%
<b>Adulta</b>	<b>22,6%</b>	13,3%	15,4%	<b>58,3%</b>	12,5%	11,1%	22,7%
<b>Indeterminada</b>	<b>9,7%</b>	6,7%	0%	0%	0%	0%	4,5%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Destaque em laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias de faixa etária. Para as toninhas, no Ano 4 a faixa etária predominante permaneceu sendo a de animais juvenis (55,6%), assim como observado nas demais fases de monitoramento (exceto Ano 2) e na avaliação total das fases. Na série histórica de monitoramento, o maior percentual de filhotes foi observado tanto na fase pré-PMBA/Fest quanto na fase Ano 4, cujo valor corresponde a 17,2 pontos percentuais acima do observado na fase de pré-rompimento. Já a maior ocorrência de encalhe de toninhas juvenis foi observada na fase pré-PMBA/Fest (42,5%), ou seja 10,9 pontos percentuais acima do observado na fase de pré-rompimento. Esses achados também sugerem de que ainda possa existir impacto dos rejeitos sobre a mortalidade de toninhas mais jovens nos primeiros anos após a ruptura da barragem.

### 3.2 TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO

Quadro 8: Frequência da distribuição de encalhes de botos-cinza ao longo dos meses nas fases de monitoramento.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Outubro</b>	8,5%	<b>12,9%</b>	6,4%	7,3%	14,5%	9,4%	10,3%
<b>Novembro</b>	<b>12,0%</b>	8,1%	2,1%	9,1%	8,1%	3,8%	8,6%
<b>Dezembro</b>	4,5%	11,8%	12,8%	5,5%	6,5%	<b>15,1%</b>	8,6%
<b>Janeiro</b>	5,0%	8,6%	17,0%	9,1%	<b>24,2%</b>	3,8%	9,3%
<b>Fevereiro</b>	<b>11,0%</b>	5,9%	10,6%	10,9%	9,7%	9,4%	9,1%
<b>Março</b>	9,5%	<b>14,5%</b>	<b>19,1%</b>	9,1%	12,9%	11,3%	<b>12,3%</b>
<b>Abril</b>	10,5%	12,4%	4,3%	5,5%	4,8%	<b>13,2%</b>	9,8%
<b>Mai</b>	5,5%	3,8%	4,3%	1,8%	6,5%	<b>7,5%</b>	4,8%
<b>Junho</b>	4,5%	1,1%	0%	<b>5,5%</b>	3,2%	1,9%	2,8%
<b>Julho</b>	6,5%	9,1%	10,6%	<b>12,7%</b>	3,2%	5,7%	7,8%
<b>Agosto</b>	<b>14,5%</b>	4,8%	6,4%	3,6%	3,2%	5,7%	8,0%
<b>Setembro</b>	8,0%	7,0%	6,4%	<b>20%</b>	3,2%	13,2%	8,6%
Total Geral	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
N. ocorrências	200	186	47	55	62	53	603

Destaque em laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias mensais do ano. De maneira geral os encalhes de botos-cinza não apresentaram uma frequência específica na avaliação mensal, mas soma do total das fases, a maior concentração de encalhes desta espécie se destacou em março (12,3%), coincidindo com o aumento no mesmo mês nas fases pré-PMBA/Fest e Ano 1. E no Ano 4, o maior percentual ocorreu em dezembro com 15,1%.

Quadro 9: Frequência da distribuição de encalhes de toninhas ao longo dos meses nas fases de monitoramento.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Outubro</b>	3,2%	<b>20%</b>	0%	8,3%	12,5%	11,1%	8,0%
<b>Novembro</b>	9,7%	0%	<b>23,1%</b>	0%	12,5%	11,1%	9,1%
<b>Dezembro</b>	3,2%	6,7%	15,4%	25,0%	12,5%	<b>33,3%</b>	12,5%
<b>Janeiro</b>	<b>32,3%</b>	6,7%	30,8%	<b>33,3%</b>	<b>37,5%</b>	0%	25,0%
<b>Fevereiro</b>	<b>25,8%</b>	6,7%	7,7%	8,3%	0%	11,1%	13,6%

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
Março	9,7%	6,7%	<b>15,4%</b>	0%	12,5%	11,1%	9,1%
Abril	3,2%	<b>6,7%</b>	7,7%	0%	0%	0%	3,4%
Maio	<b>3,2%</b>	0%	0%	0%	0%	0%	1,1%
Junho	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Julho	3,2%	6,7%	0%	<b>8,3%</b>	0%	0%	3,4%
Agosto	6,5%	<b>26,7%</b>	0%	0%	0%	11,1%	8,0%
Setembro	0%	13,3%	0%	<b>16,7%</b>	12,5%	11,1%	6,8%
Total Geral	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
N. ocorrências	31	15	13	12	8	9	88

Destaque em laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias mensais do ano. Para as toninhas no Ano 4 (33,3%) e na série histórica dos encalhes, observou-se uma tendência de concentração entre novembro e janeiro para as fases de monitoramento, exceto na fase pré-PMBA/Fest cuja maior concentração de encalhes aconteceu fora de época, em agosto. Essa alteração no padrão mensal de encalhes de toninhas na fase pré-PMBA/Fest pode sinalizar a possibilidade de impacto para a espécie neste período.

Quadro 10: Frequência da distribuição de encalhes de botos-cinzas ao longo das estações nas fases de monitoramento.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
Inverno	<b>29,5%</b>	18,8%	23,4%	29,1%	8,1%	17,0%	22,4%
Outono	23,0%	25,8%	10,6%	16,4%	22,6%	<b>26,4%</b>	22,6%
Primavera	26,5%	<b>30,6%</b>	12,8%	25,5%	29,0%	26,4%	26,9%
Verão	21,0%	24,7%	<b>53,2%</b>	29,1%	40,3%	30,2%	28,2%
Total Geral	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Destaque em laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores nas categorias de estações do ano. Em relação as estações do ano, em três fases do monitoramento os encalhes de botos-cinza predominaram no verão dos Anos 1, 3 e 4 com (53,2%, 40,3% e 30,2%) respectivamente, bem como na avaliação do total geral (28,2%).

Quadro 11: Frequência da distribuição de encalhes de toninhas ao longo das estações nas fases de monitoramento.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
Inverno	9,7%	<b>46,7%</b>	0,0%	16,7%	12,5%	11,1%	15,9%
Outono	<b>22,6%</b>	6,7%	7,7%	0,0%	0,0%	0,0%	10,2%
Primavera	16,1%	26,7%	30,8%	16,7%	37,5%	<b>55,6%</b>	26,1%
Verão	<b>51,6%</b>	20,0%	<b>61,5%</b>	<b>66,7%</b>	50,0%	33,3%	47,7%
Total Geral	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Destaque em laranja para os maiores valores entre fases de monitoramento e negrito para os maiores valores nas categorias de estações do ano. Em quatro fases do monitoramento os encalhes de toninhas predominaram no verão, pré-rompimento (51,6%), no Ano 1 (61,5%), Ano 2 (66,7%) e Ano 3 (50%), bem como na avaliação do total geral (47,7%). Na fase pré-PMBA/Fest os encalhes concentraram fora da época usual, coincidindo com o inverno (46,7%), o que pode estar associado aos efeitos do impacto dos rejeitos da

barragem. No Ano 4 os encalhes predominaram na primavera havendo também recorde para esta estação ao longo de toda a série histórica (55,6%).

Quadro 12: Frequência da distribuição de encalhes de botos-cinzas ao longo das épocas nas fases de monitoramento.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Chuva</b>	50,5%	61,8%	68,1%	50,9%	<b>75,8%</b>	52,8%	58,2%
<b>Seca</b>	<b>49,5%</b>	38,2%	31,9%	49,1%	24,2%	47,2%	41,8%
Total Geral	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Destaque em laranja para maiores valores entre fases de monitoramento e negrito para maiores valores para as categorias de época do ano. Os encalhes de botos-cinza coincidem com o período chuvoso em todas as fases de monitoramento, sendo a maior proporção observada no Ano 3 com (75,8%).

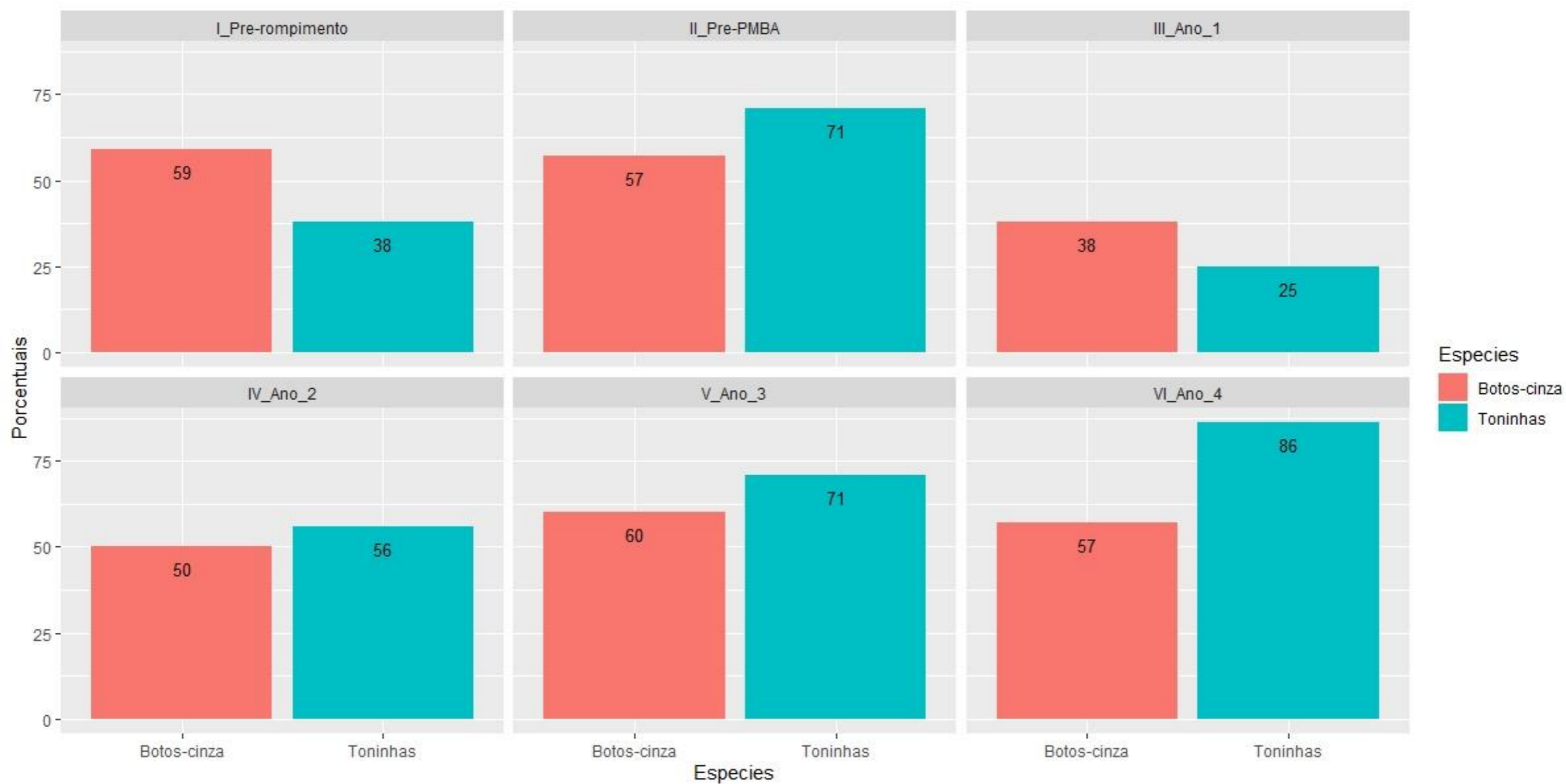
Quadro 13: Frequência da distribuição de encalhes de toninhas ao longo das épocas nas fases de monitoramento.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total
<b>Chuva</b>	83,9%	46,7%	<b>92,3%</b>	75,0%	87,5%	77,8%	77,3%
<b>Seca</b>	16,1%	<b>53,3%</b>	7,7%	25,0%	12,5%	22,2%	22,7%
Total Geral	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Destaque em laranja para os maiores valores entre as fases de monitoramento e negrito para os maiores valores das categorias de época do ano. Foi observado para as toninhas, uma alteração no padrão de encalhes em relação à época dos anos. Em todas as fases, incluindo o Ano 4, os encalhes predominam na estação de chuvas, contudo, na fase pré-PMBA, houve uma inversão nesse padrão o que pode sugerir potencial impacto pós-rompimento para toninhas nesta fase

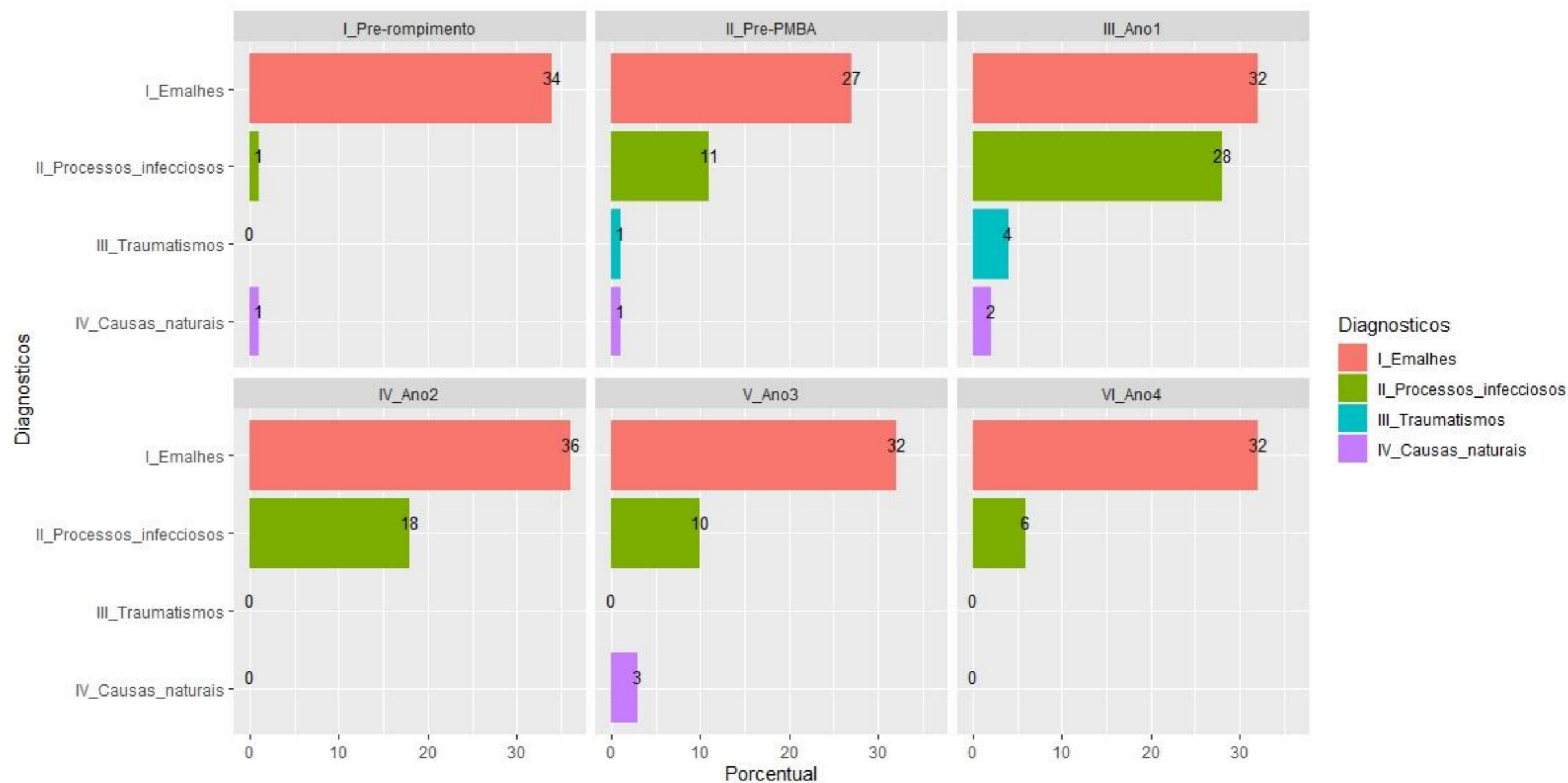
### 3.3 TAXA DE ÓBITO PARA *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE

Figura 3: Percentual de diagnósticos indeterminados para botos-cinza e toninhas ao longo das fases de monitoramento.



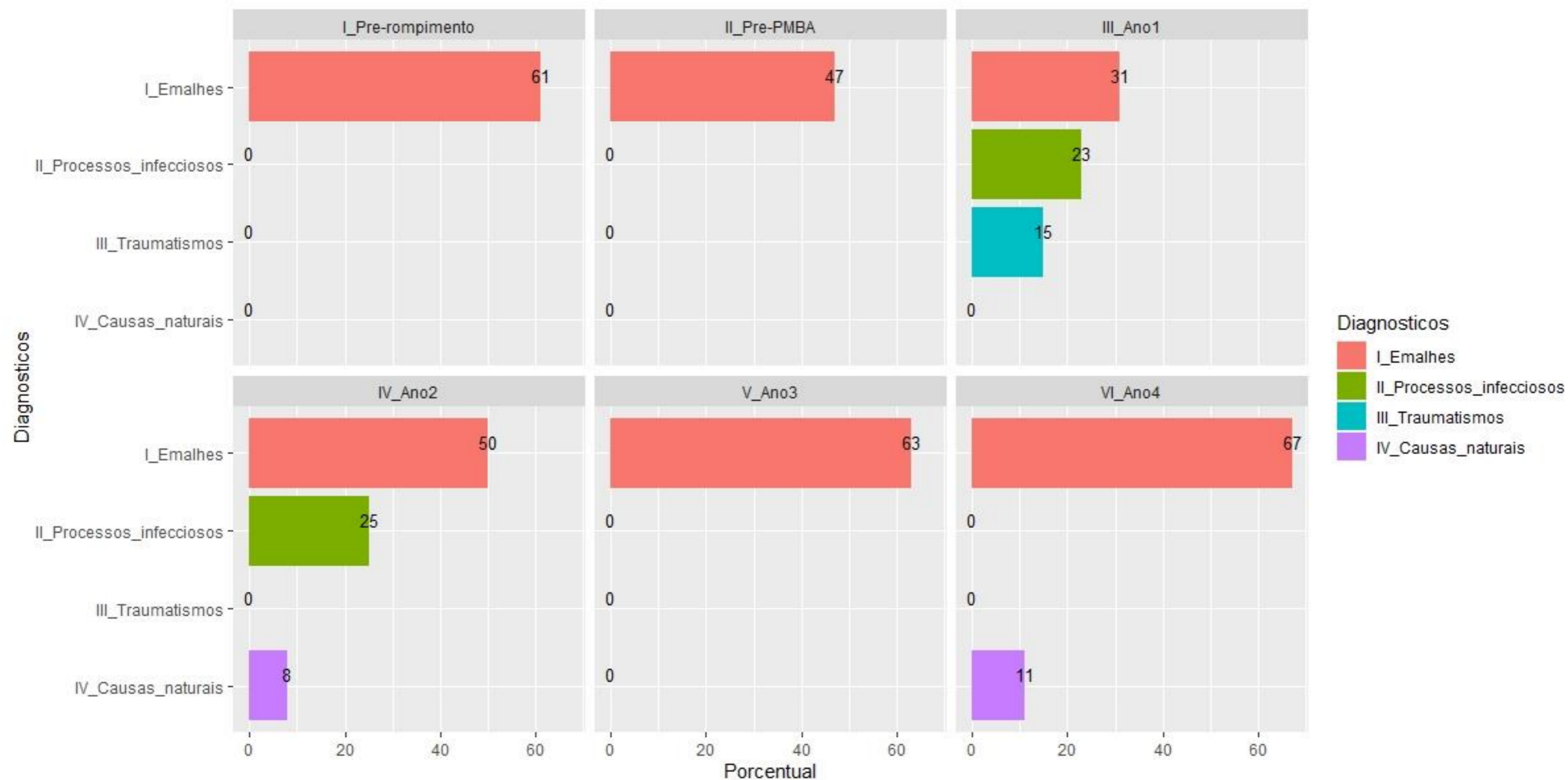
Em relação aos diagnósticos da causa de óbito, em média 57,2% foram indeterminados, isso considerando ambas espécies ao longo das fases de monitoramento. No Ano 4, o percentual de diagnóstico indeterminado chegou a 86% para toninhas e 57% para botos-cinza.

Figura 4: Percentual de diagnósticos macroscópicos para botos-cinza ao longo das fases de monitoramento, com predominância em média 62,2% em código de decomposição avançado (IV)



Quanto aos diagnósticos conclusivos para botos-cinza, o emalhe predominou em primeiro lugar com relativa igualdade entre as fases do PMBA/Fest (média de 32%). Os processos infecciosos constituíram a segunda principal causa de óbitos, com decréscimo gradativo observado desde o Ano 1 até o Ano 4. As demais causas de óbitos como traumatismos e causas naturais estiveram abaixo de 4%.

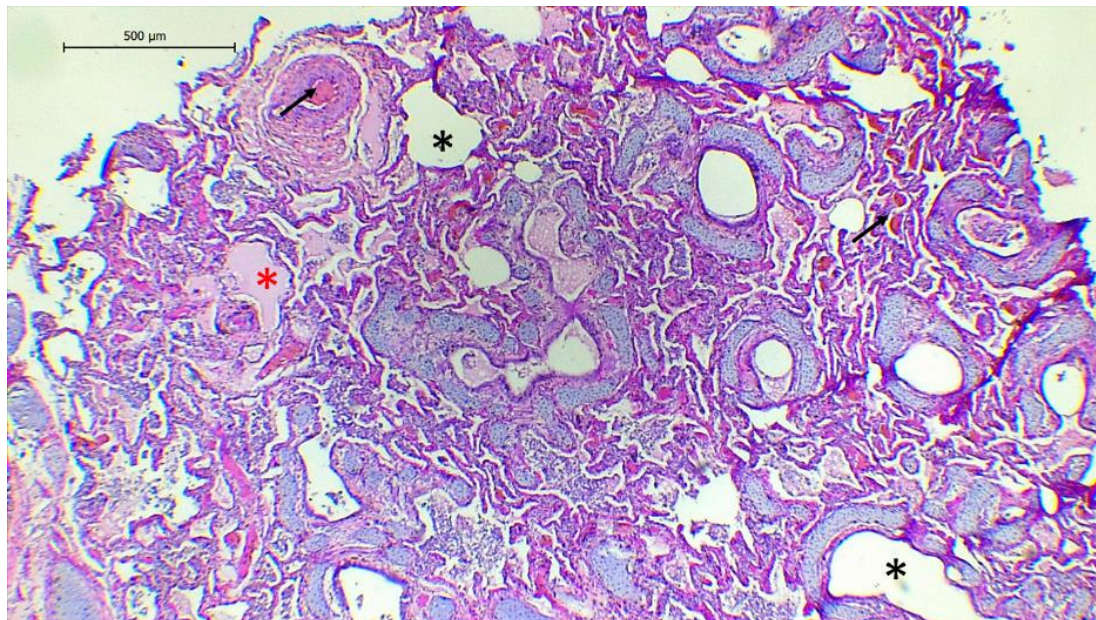
Figura 5: Percentual de diagnósticos macroscópicos para toninhas ao longo das fases de monitoramento, com predominância em média 49,5% em código de decomposição avançado (IV)



Para toninhas os diagnósticos conclusivos também evidenciaram predominância de emalhe, sendo as proporções mais altas, com média em torno de 58% entre as fases de estudo. No Ano 4 esse diagnóstico de emalhe bateu recorde chegando a 67%. Os processos infecciosos constituíram a segunda principal causa de óbitos, contudo foram observadas mais nas fases Ano 1 e 2. As demais causas de óbitos como traumatismos e causas naturais estiveram abaixo de 15%.

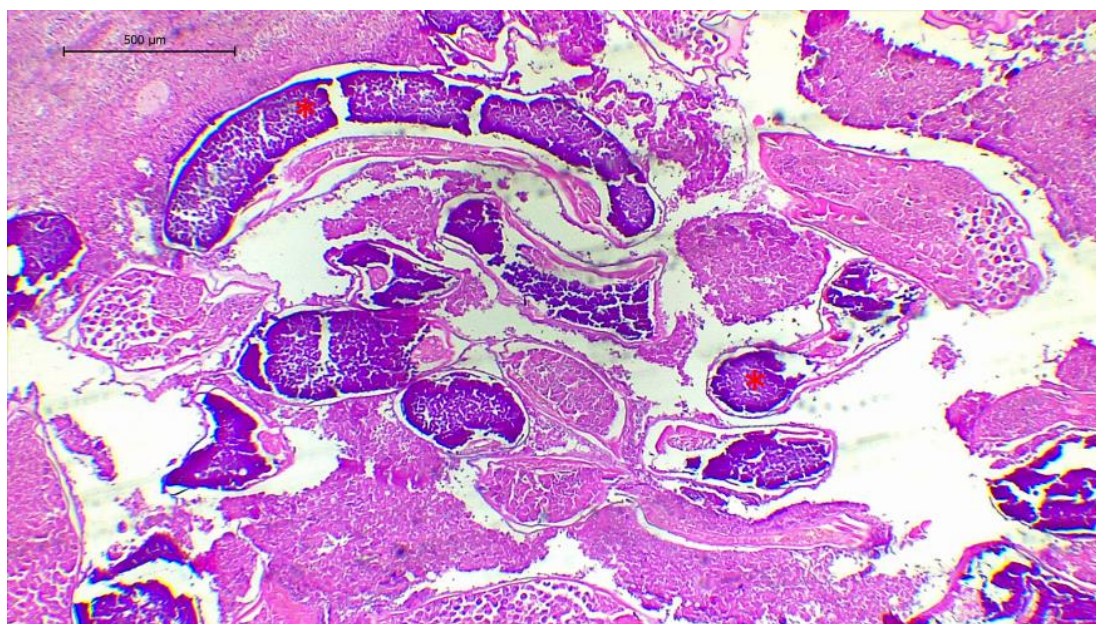
### 3.4 SAÚDE DOS CETÁCEOS

Figura 6: Fotomicrografia de Pulmão: Pneumonia, edema (asterisco vermelho), enfisema (asterisco preto), atelectasia, congestão (seta preta), processo inflamatório misto difuso moderado, espessamento de septo. *Sotalia guianensis*, EAE\_N154, fêmea, filhote. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 4 PMBA/Fest



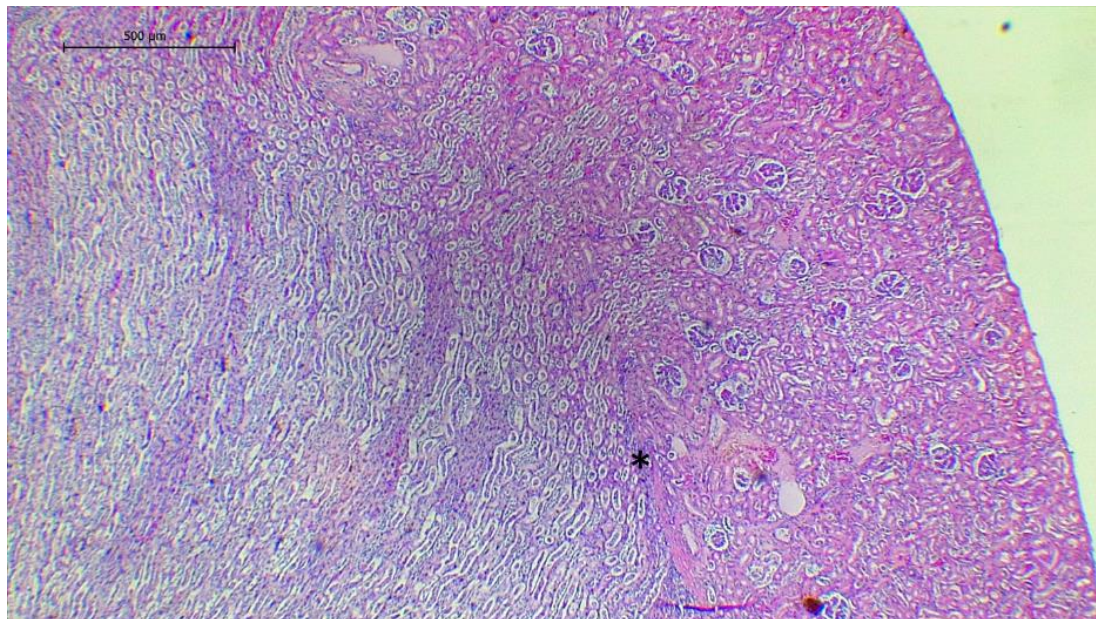
Os achados histopatológicos evidenciam o sistema respiratório do espécime acometido de várias patologias que comprometem a saúde geral do cetáceo.

Figura 7: Fotomicrografia de Pulmão: Resquícios de parasito (asterisco vermelho). *Sotalia guianensis*, EAE\_N137, fêmea, juvenil. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 4 PMBA/Fest



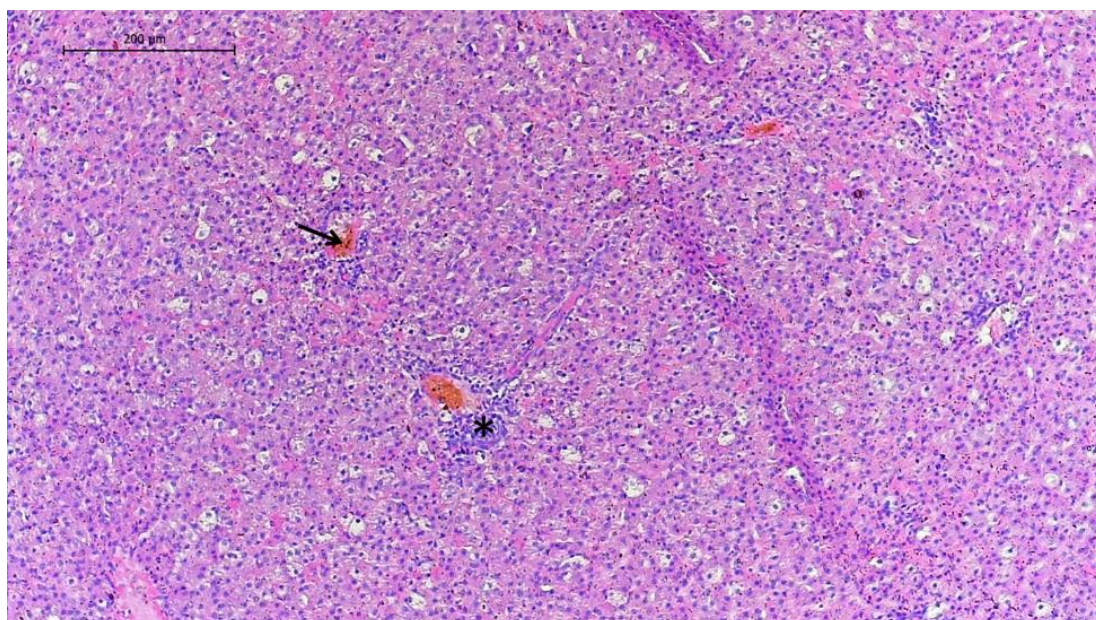
Parasitos encontrados dentro de órgãos vitais, como no sistema respiratório do espécime, evidencia que a saúde do cetáceo estava comprometida, com provável baixa na imunidade. Associado a outros fatores podem agravar ainda mais a saúde do espécime.

Figura 8: Fotomicrografia de Rim: Infiltrado inflamatório leve de mononucleares na região cortico-medular (asterisco preto). *Sotalia guianensis*, EAE\_S153, fêmea, juvenil. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 4 PMBA/Fest



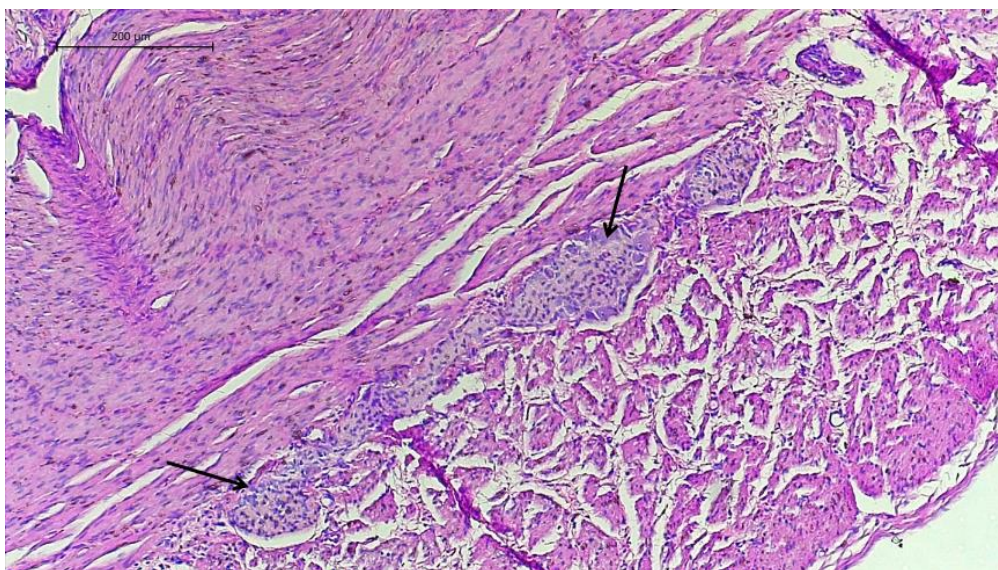
Os achados, embora leves, com um agravamento poderiam causar a insuficiência renal, comprometendo a saúde do espécime e podendo até levar a óbito.

Figura 9: Fotomicrografia de Fígado: Congestão (seta preta), leve edema, focos de processo inflamatório perivascular (asterisco preto), início de tumefação turva. *Sotalia guianensis*, EAE\_N154, fêmea, filhote. Coloração: HE. Aumento: 10X. Ano 4 PMBA/Fest



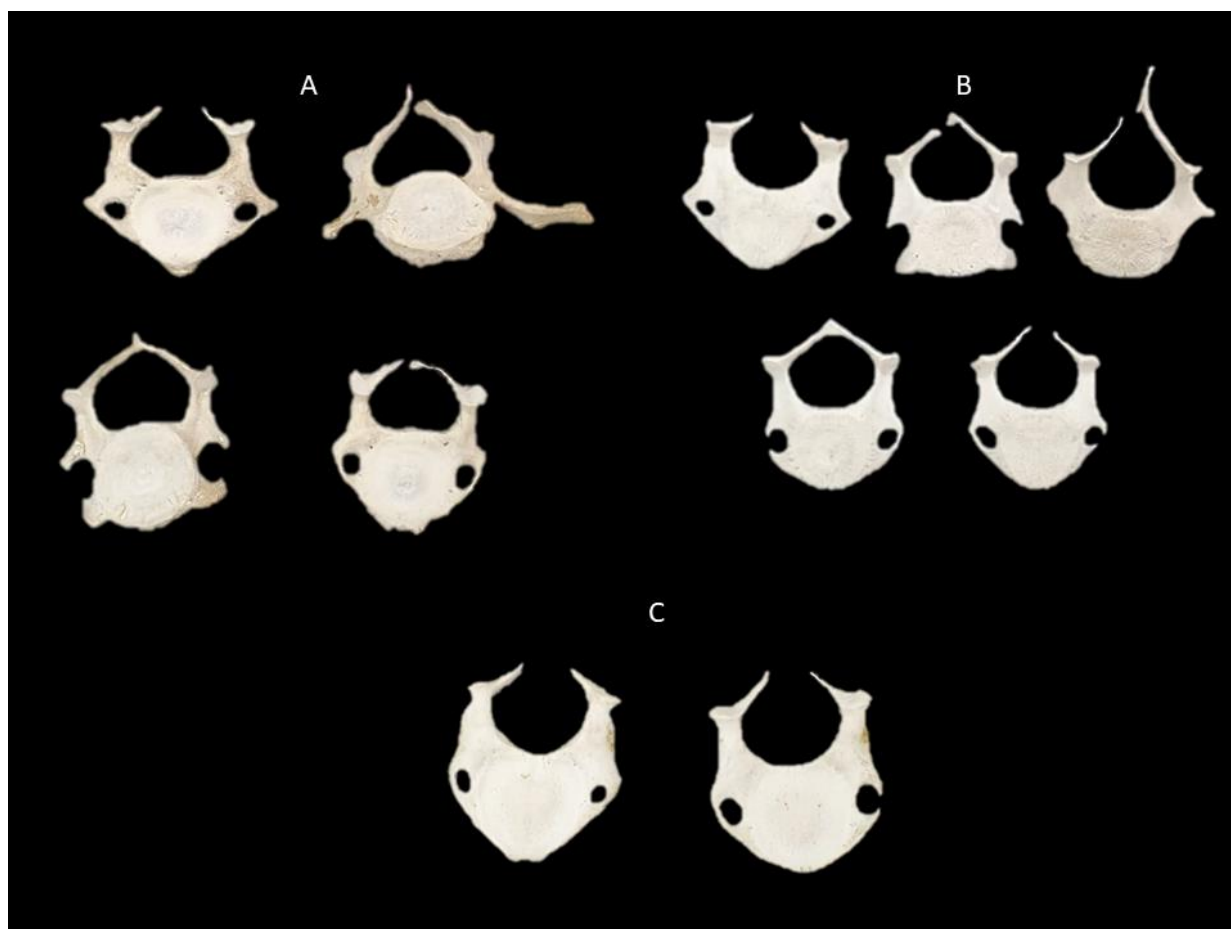
Com os achados pode-se evidenciar o início do comprometimento do órgão e se tratando de um órgão de metabolização pode afetar de forma grave outros sistemas.

Figura 10: Fotomicrografia de Intestino: Processo inflamatório leve difuso, mais evidente entre muscular e mucosa (seta preta). *Sotalia guianensis*, EAE\_N154, fêmea, filhote. Coloração: HE. Aumento: 10X. Ano 4 PMBA/Fest



O agravamento do quadro pode comprometer a absorção de nutrientes importantes para a saúde do espécime, causando debilidade e afetando outros sistemas.

Figura 11: Abertura do arco neural em vértebra cervical. A: *Sotalia guianensis*, fêmea, adulto (EAE\_N140); B: *Sotalia guianensis*, fêmea, juvenil (EAE\_N141); C: *Sotalia guianensis*, fêmea, juvenil (EAE\_S153). Ano 4 PMBA/Fest



A abertura do arco neural em pequenos cetáceos é considerada uma anomalia congênita. De acordo com a literatura, em populações de *S. guianensis* de regiões distintas, a frequência desta alteração se mostrou menor. Já para os espécimes avaliados pelo PMBA/Fest, a frequência de abertura do arco neural é considerada maior que em outras populações estudadas, e pode ser uma característica desta população, contudo, os resultados precisam ainda ser analisados a longo prazo.

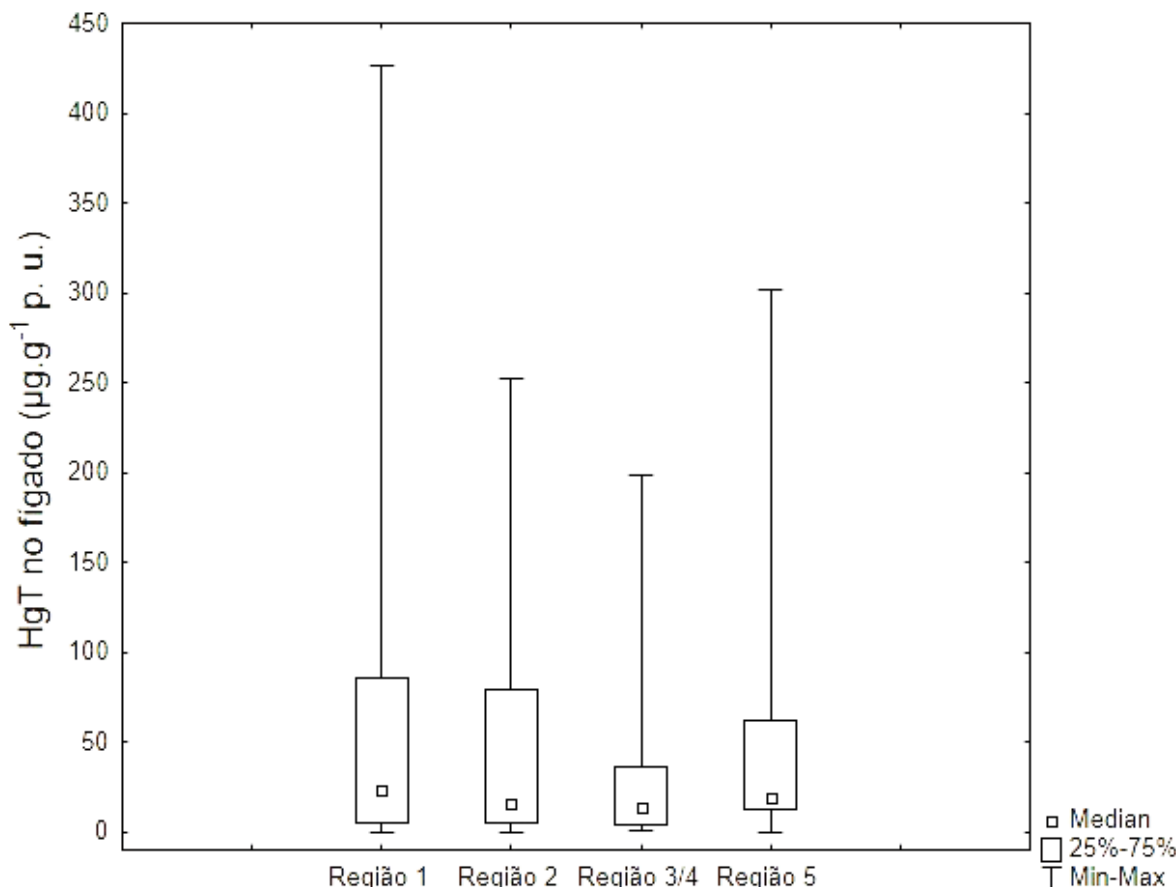
Quadro 14: Gêneros de bactérias e fungos encontrados nos cetáceos do PMBA/Fest. No Ano 1 e Ano 2 as bactérias encontradas diferiram. No Ano 3 as bactérias encontradas haviam sido descritas nos anos anteriores, bem como o gênero fúngico *Candida*.

Ano de amostragem	Gêneros de bactérias e fungos encontrados nos cetáceos do PMBA/Fest
Ano 1	<i>Actinomyces</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Candida</i>
Ano 2	<i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Kluyvera</i> <i>Pantoea</i> <i>Providencia</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i>
Ano 3	<i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Candida</i>
Ano 4	<i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Koserella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Candida</i>

No ano 4, diversos gêneros de bactérias e um gênero de fungo, já descritos nos anos anteriores, contudo, também foi identificada uma espécie inédita: *Koserella trabulsii* e um gênero inédito: *Streptococcus*. A variação dos microrganismos que estão acometendo os cetáceos pode indicar mudanças ambientais e interferir na saúde dos espécimes, pois muitos são patogênicos, podendo causar debilidade e até levar até a óbito.

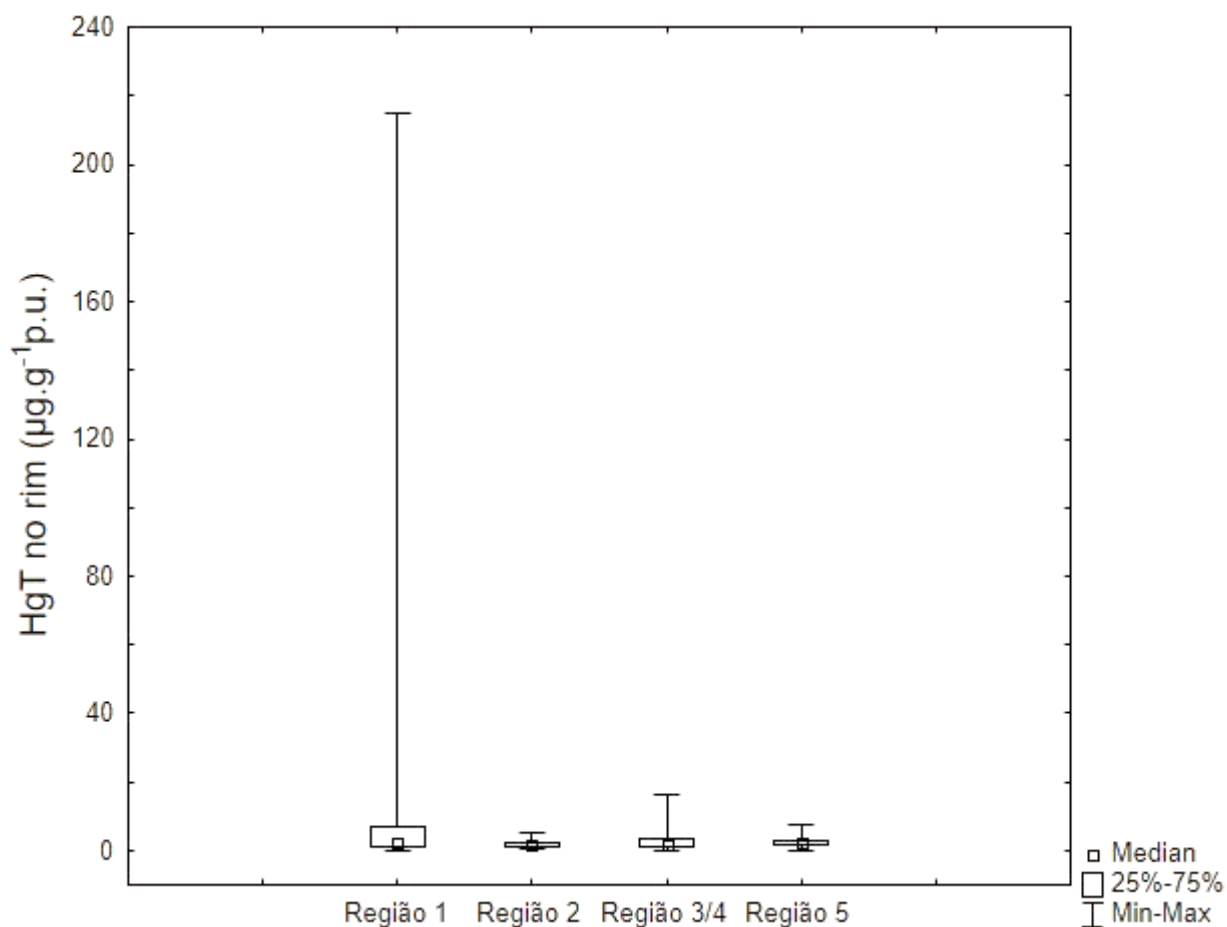
### 3.5 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*

Figura 12: Concentrações de HgT ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) no fígado de *Sotalia guianensis* coletados nas diferentes regiões da costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3 e Ano 4 do PMBA/Fest



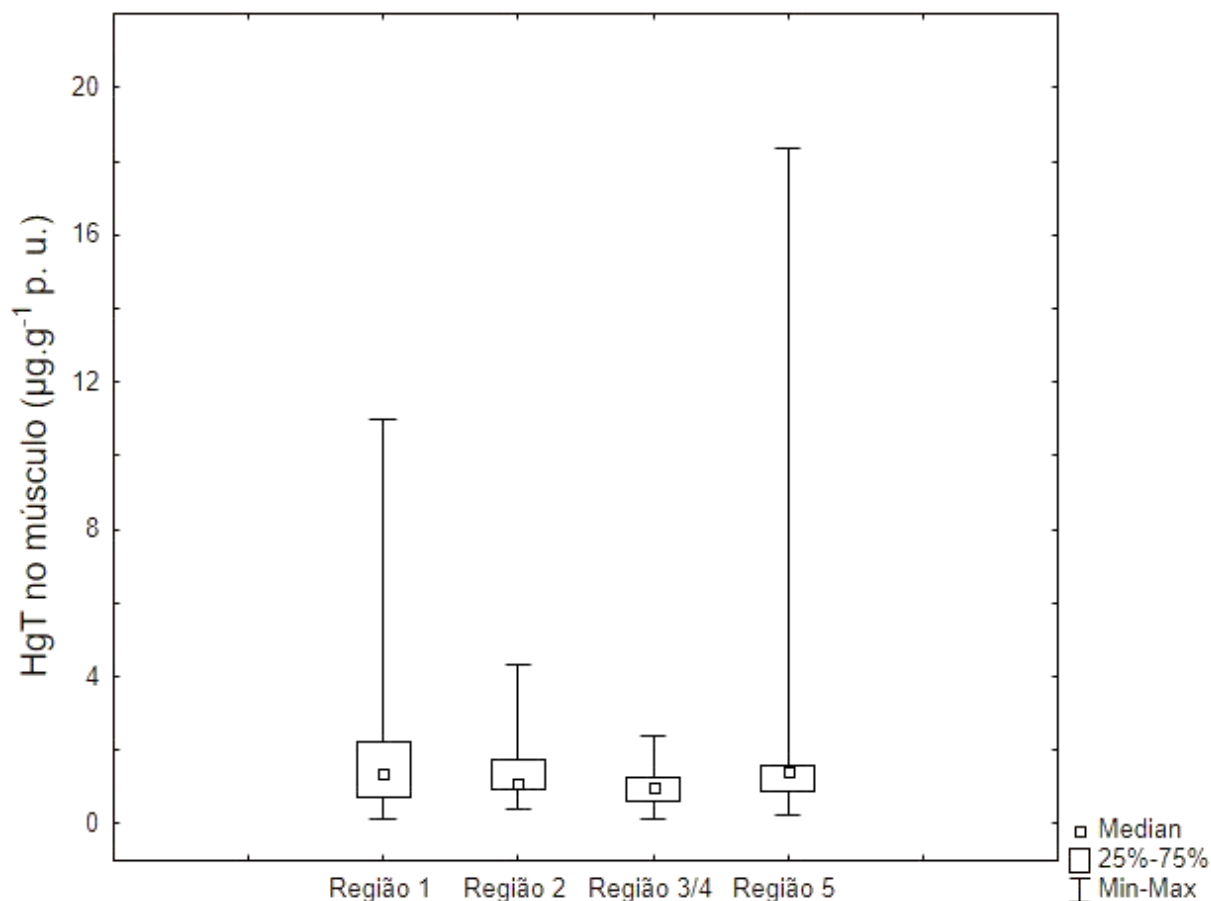
Vale destacar que as concentrações máximas de HgT em fígado de botos-cinza estão acima do limite de tolerância estabelecido na literatura que pode causar danos hepáticos nos mamíferos marinhos ( $100$  a  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ , p. u.) para todas as regiões de estudo. Em relação à variação espacial, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em fígado de botos-cinza das regiões analisadas. Em relação à variação temporal, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no fígado de botos-cinza ao longo dos anos de monitoramento. Entretanto, vale destacar a concentração hepática mediana mais elevada em botos-cinza coletados no período Pré-PMBA.

Figura 13 : Concentrações de HgT ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) no rim de *Sotalia guianensis* coletados nas diferentes regiões da costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; ; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3 e Ano 4 do PMBA/Fest



Em relação à variação espacial, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em rim de botos-cinza das regiões analisadas. Em relação à variação temporal, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no rim de botos- cinza ao longo dos anos de monitoramento.

Figura 14: Concentrações de HgT ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) no músculo de *Sotalia guianensis* coletados nas diferentes regiões da costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3 e Ano 4 do PMBA/Fest



Em relação à variação espacial, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em músculo de botos-cinza das regiões analisadas. Em relação à variação temporal, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no músculo de botos- cinza ao longo dos anos de monitoramento.

Tabela 1: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de HgT no fígado, músculo e rim de *Sotalia guianensis* coletados nas diferentes regiões da costa do Espírito Santo, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3= Barra do Riacho; 4= Região Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados durante o Ano 1, Ano 2, Ano 3 e Ano 4 do PMBA/Fest.

Região	N	Tecido	Média $\pm$ DP	Mediana	Mín-Máx
1	66	Músculo	2,02 $\pm$ 2,2	1,36	0,12-10,98
	48	Rim	9,04 $\pm$ 30,8	2,48	0,12-214,91
	64	Fígado	64,93 $\pm$ 96,1	23,31	0,11-426,23
2	19	Músculo	1,42 $\pm$ 0,9	1,11	0,42-4,31
	16	Rim	2,00 $\pm$ 1,3	1,74	0,53-5,09
	18	Fígado	51,05 $\pm$ 74,8	15,72	0,29-252,65
3/4	60	Músculo	1,01 $\pm$ 0,5	0,99	0,15-2,39
	55	Rim	2,63 $\pm$ 2,9	1,50	0,20-16,52
	57	Fígado	34,29 $\pm$ 50,2	13,45	0,64-198,47
5	37	Músculo	1,76 $\pm$ 2,8	1,40	0,24-18,35
	33	Rim	2,53 $\pm$ 1,6	2,21	0,24- 7,67
	33	Fígado	48,36 $\pm$ 64,1	19,63	0,22- 301,90

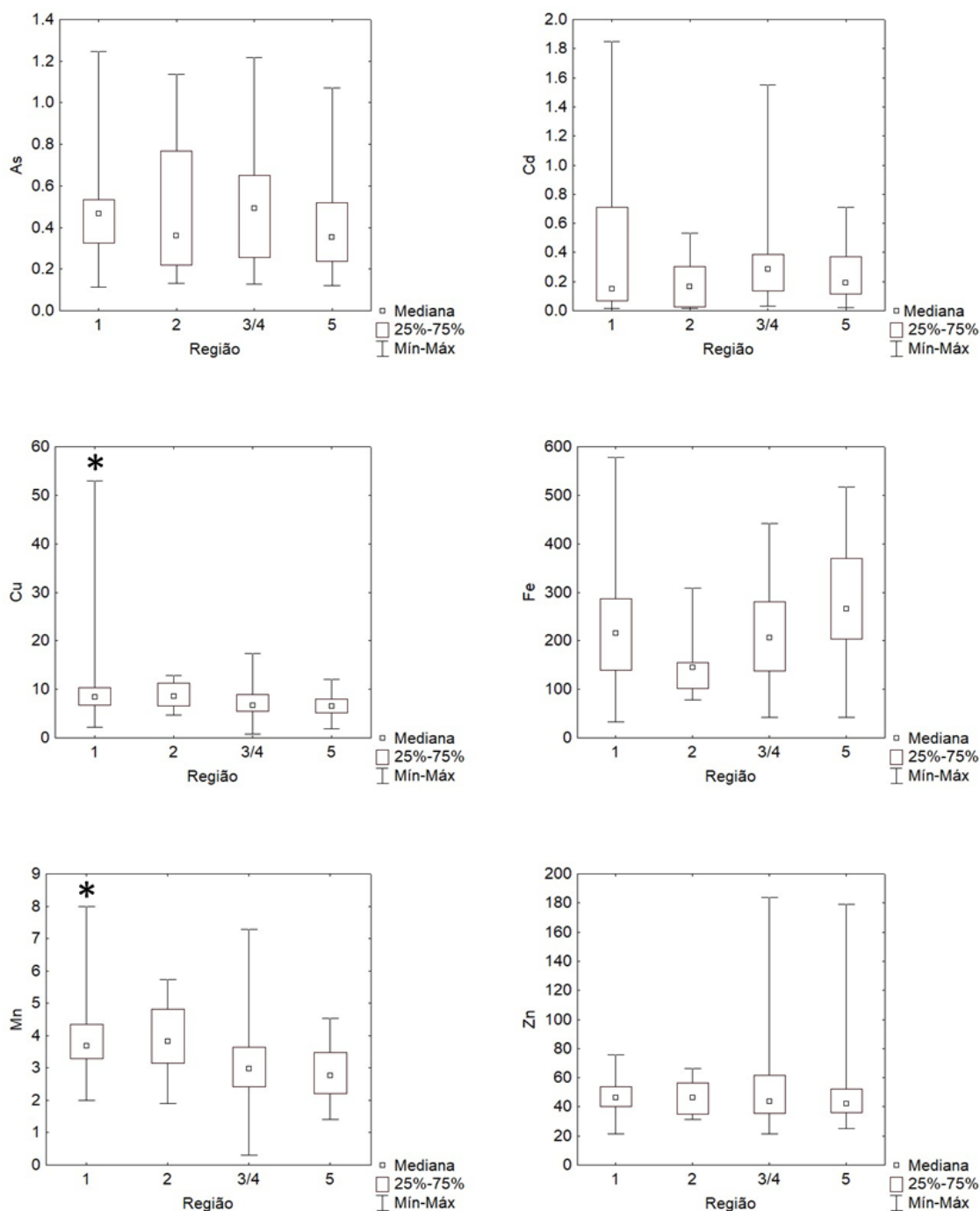
Podemos destacar as concentrações mais elevadas no fígado, seguido do rim e do músculo nos botos-cinza analisados. As concentrações hepáticas médias dos indivíduos de botos-cinza analisados (n=175) durante os anos monitoramento do PMBA/Fest encontram-se na mesma ordem de grandeza que as médias mais elevadas do Brasil, como em botos-cinza da costa do Rio de Janeiro. Esses dados corroboram os resultados obtidos no último relatório (RSE2022).

Tabela 2: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de HgT no fígado, músculo e rim de *Pontoporia blainvillei*. coletados da costa do Espírito Santo, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido analisados durante o Ano 2, Ano 3 e Ano 4 do PMBA/Fest

N	Tecido	Média $\pm$ DP	Mediana	Mín-Máx
17	Músculo	0,64 $\pm$ 0,3	0,65	0,13-1,32
12	Rim	0,53 $\pm$ 0,3	0,51	0,07-1,05
14	Fígado	1,46 $\pm$ 1,8	0,95	0,25 -7,00

Vale ressaltar que as concentrações encontradas no presente RA2022 encontram-se na mesma ordem de grandeza que estudos prévios realizados na costa Sudeste do Brasil. Considerando dados pretéritos, os indivíduos do presente RA2022 apresentaram concentrações de HgT similares a estudos prévios na costa do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Porém estes dados devem ser analisados com cautela, visto que, as consequências do rompimento da barragem ainda vêm sendo investigadas e têm apontado diferenças temporais (Manhães et al., 2022).

Figura 15: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido) no fígado de *Sotalia guianensis* das diferentes regiões da costa do Espírito Santo analisados até o Ano 4 do PMBA/Fest

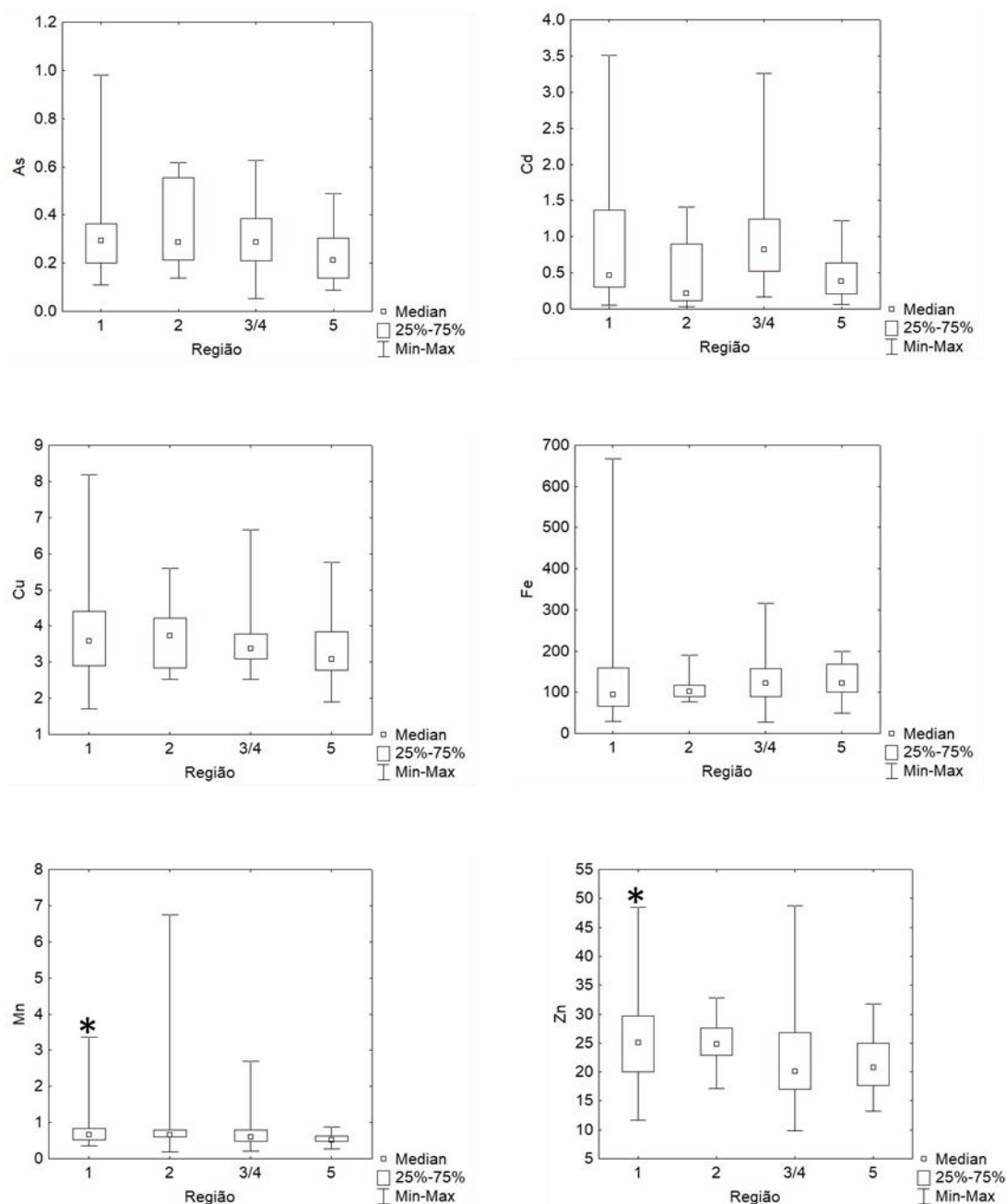


Todas as regiões apresentam concentrações medianas de As maiores que as reportadas na literatura para a espécie. Com exceção do As, as medianas das concentrações dos elementos-traço estão na mesma ordem de magnitude daquelas reportadas na literatura. Entretanto, a literatura abrange diferentes estados da costa brasileira, inclusive áreas mais urbanizadas e industrializadas que a costa do ES. A região de São Mateus

apresentou concentrações hepáticas de Cu e Mn significativamente maiores que as da região Barra do Riacho/Metropolitana e do Extremo sul (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ )

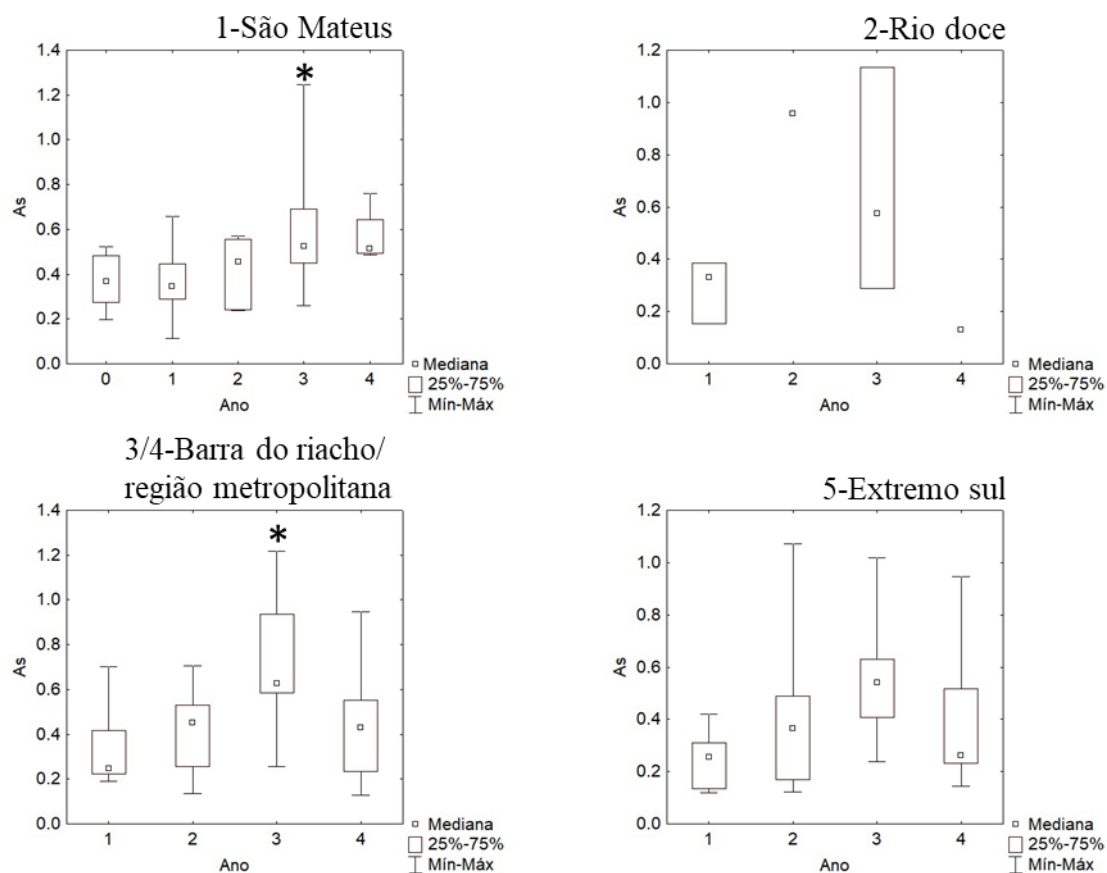
Figura 16: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso úmido) no rim de *Sotalia guianensis* das diferentes regiões da costa do Espírito Santo analisados até o

Ano 4 do PMBA/Fest



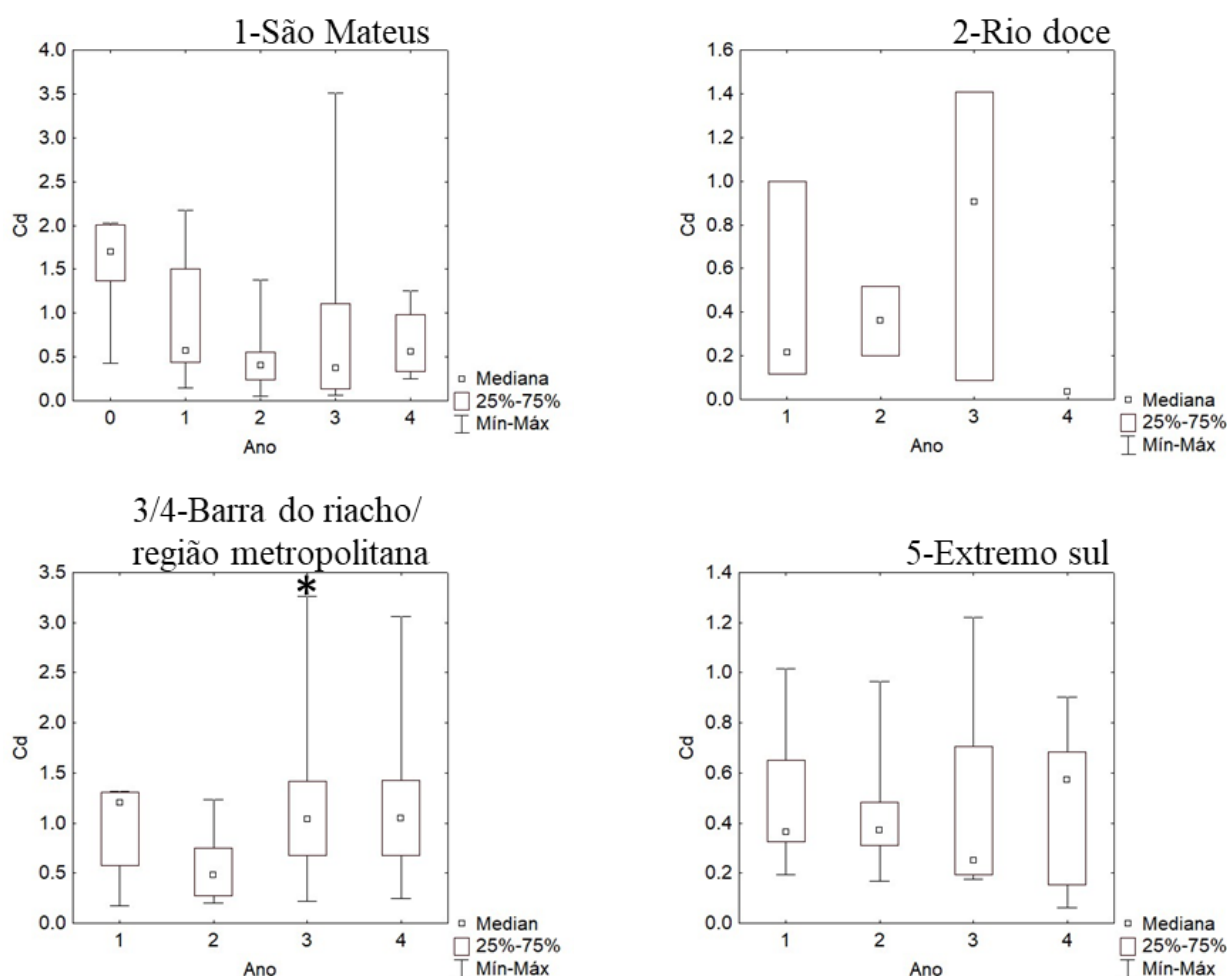
As concentrações medianas de Cd no rim estão maiores que as reportadas na literatura para a espécie, com destaque para a região Barra do Riacho/Metropolitana. A região de São Mateus apresentou concentrações renais significativamente maiores de Mn e Zn do que no Extremo sul (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Figura 17: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido) no fígado de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, separados por região



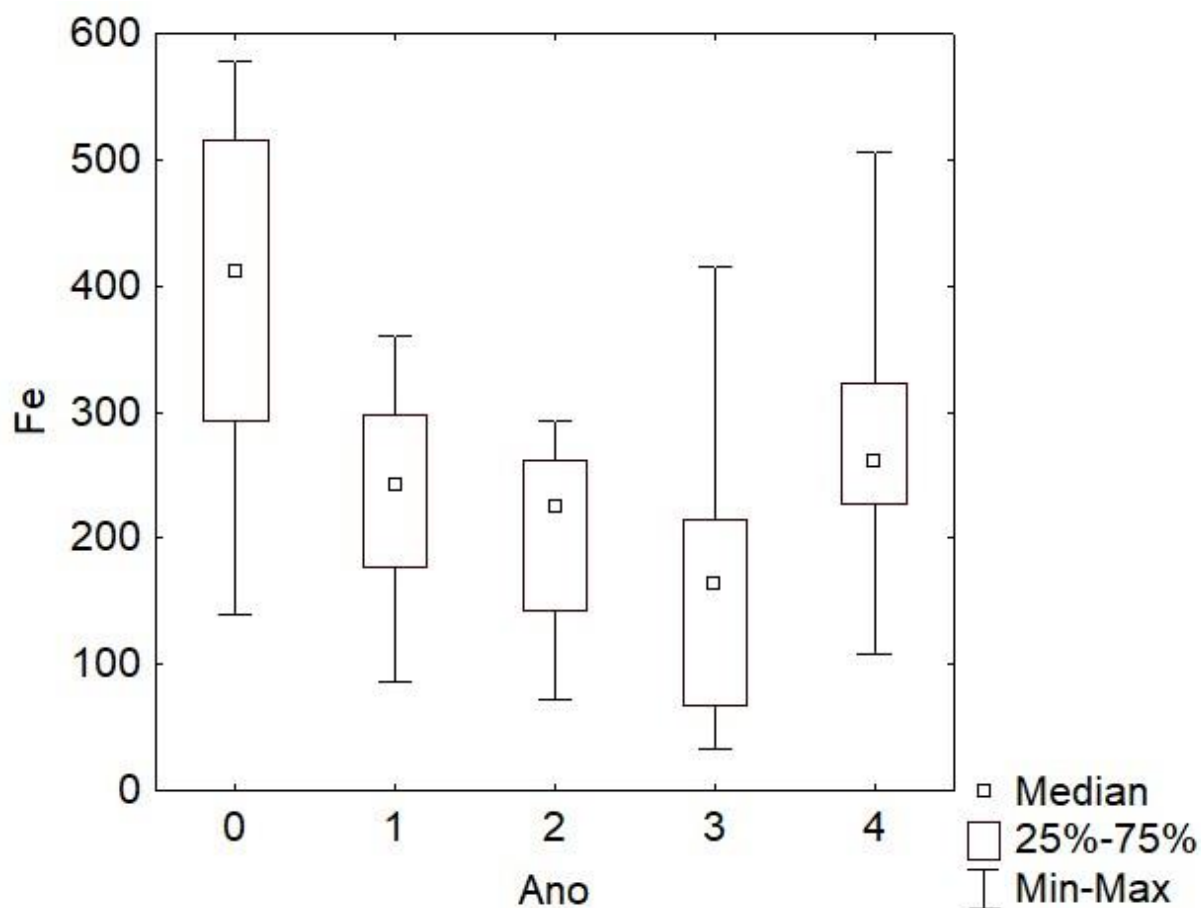
Foi observado um aumento significativo nas concentrações durante o Ano 3 para as regiões 1 e 3/4. Na região 5, apesar de não significativo, o Ano 3 também apresentou a maior mediana. A região 2-Rio Doce não possui número amostral suficiente para análise estatística. Para os demais tecidos, as maiores medianas também foram observadas no Ano 3. As elevadas concentrações de As reportadas no presente relatório reforçam os riscos aos quais os cetáceos estão expostos na região afetada pelo rompimento da barragem de Fundão.

Figura 18: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Cd ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido) no rim de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, separados por região



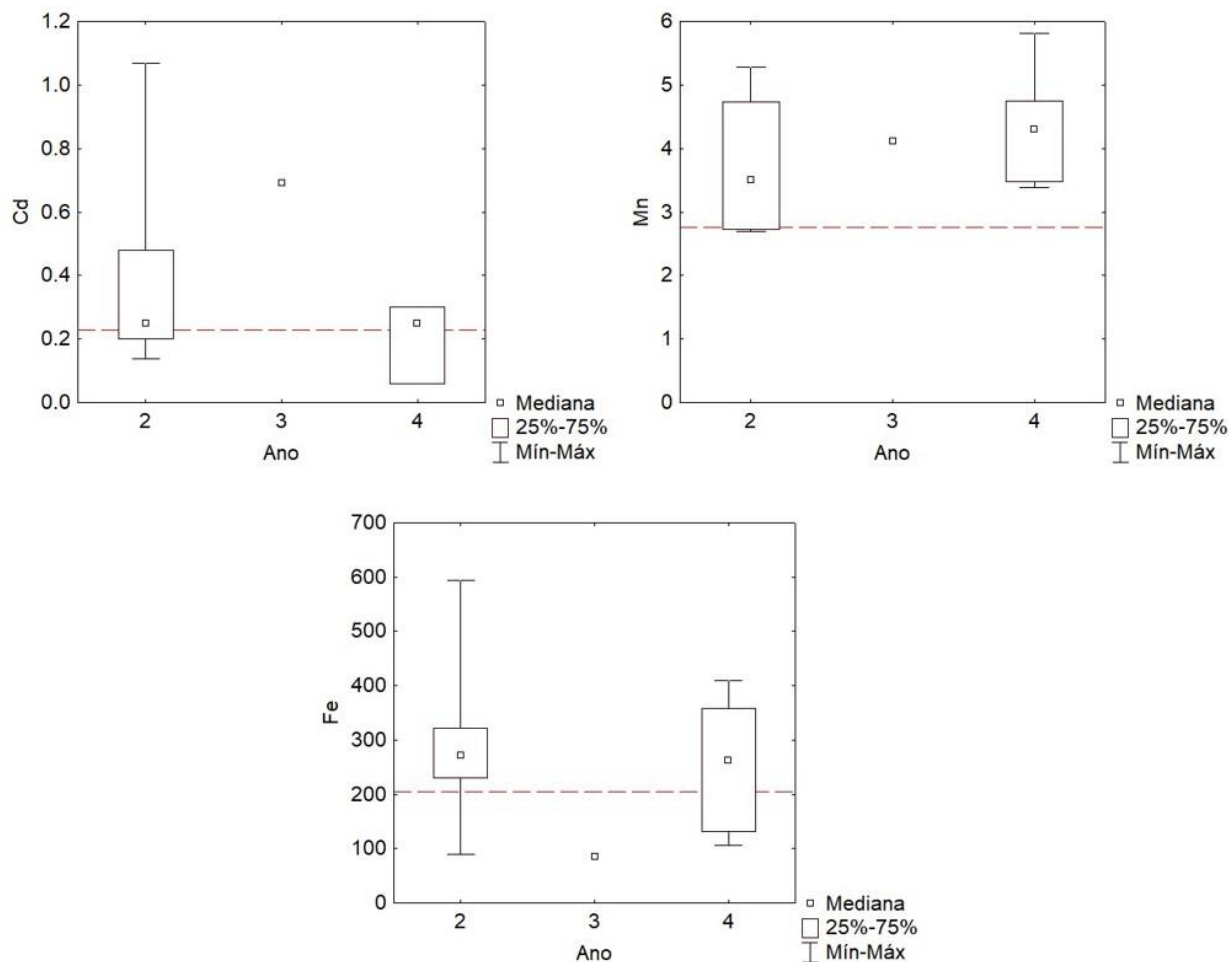
Foi observado uma diminuição significativa nas concentrações durante o Ano 2 na região 3/4-Barra do Riacho/Metropolitana. Na região 1-São Mateus é possível observar uma tendência a diminuição da concentração ao longo do tempo, porém sem significância estatística. Na região 3/4 a diferença observada entre o Ano 2 e o Ano 3 se dá principalmente por um indivíduo que se destaca como uma das maiores concentrações reportadas ao longo do monitoramento (EAE\_S117:  $3,3 \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido). As elevadas concentrações de Cd reportadas no presente relatório reforçam os riscos aos quais os cetáceos estão expostos na região afetada pelo rompimento da barragem de Fundão.

Figura 19: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Fe ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido) no fígado de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, região 1-São Mateus



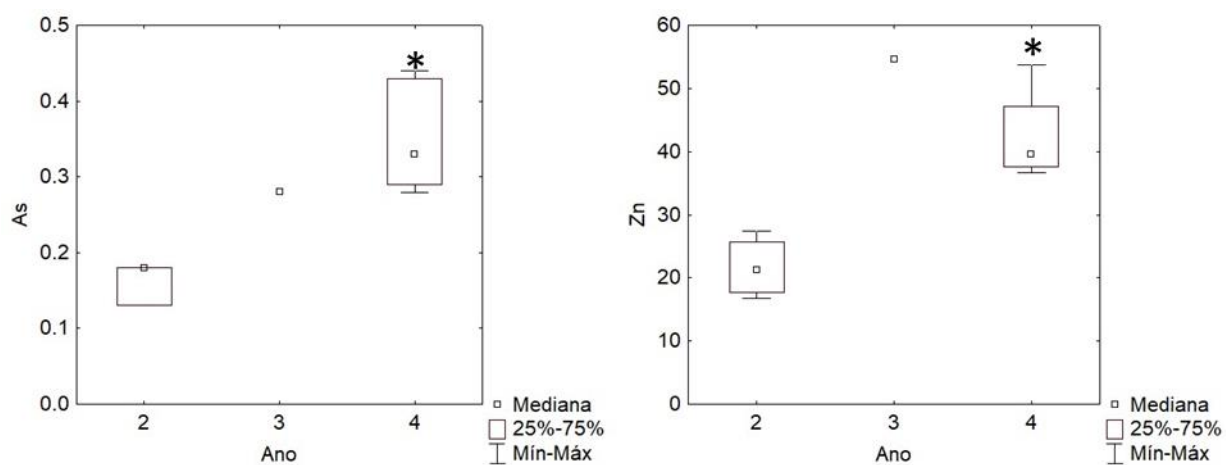
Destacam-se as elevadas concentrações de Fe no período pré-monitoramento (Ano 0, período entre 2015 e 2018).

Figura 20: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Cd no rim; e Mn e Fe no fígado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso úmido) de *Pontoporia blainvillei* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, em comparação com dados pretéritos (Manhães et al., 2022)



As concentrações medianas de Cd no rim dos animais analisados durante o PMBA/Fest estão similares aos valores pretéritos reportados no trabalho de Manhães et al. (2022). Já as medianas das concentrações de Mn e Fe no fígado dos animais analisados neste PMBA/Fest permanecem maiores que as dos animais pré e pós-rompimento da barragem de Fundão (período entre 2015 a 2019; Manhães et al., 2022)

Figura 21: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As no músculo e Zn no fígado ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido) de *Pontoporia blainvillei* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest



As concentrações musculares de As e as concentrações hepáticas de Zn obtidas em animais do Ano 4 foram significativamente maiores do que aquelas do Ano 2 do PMBA/Fest (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Tabela 3: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn no fígado, músculo e rim de *Sotalia guianensis* na costa do Espírito Santo 450885 analisados durante os 4 anos do PMBA/Fest, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido.

Regiões: 1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho/Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES.

Região	Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
1	Fígado	61	Média $\pm$ DP	0,38 $\pm$ 0,44	12,0 $\pm$ 12,8	222 $\pm$ 121	3,9 $\pm$ 1,5	49 $\pm$ 20	0,49 $\pm$ 0,23
			Mediana	0,15	8,8	216	3,7	46	0,46
			Mín. - Máx.	<0,01-1,85	2,2-87,0	33-578	2,0-8,0	15-175	0,11-1,25
	Músculo	61	Média $\pm$ DP	0,06 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,4	93 $\pm$ 41	0,2 $\pm$ 0,1	19 $\pm$ 5	0,23 $\pm$ 0,08
			Mediana	0,02	0,8	86	0,14	19	0,22
			Mín. - Máx.	<0,01-0,16	0,3-2,4	25-266	0,02-0,68	11-36	<0,11-0,47
	Rim	47	Média	0,86 $\pm$ 0,84	3,8 $\pm$ 1,4	128 $\pm$ 107	0,7 $\pm$ 0,5	25 $\pm$ 7	0,33 $\pm$ 0,19
			Mediana	0,46	3,6	94	0,7	25	0,29
			Mín. - Máx.	0,06-3,51	1,7-8,2	29-668	0,4-3,35	12-48	0,11-0,98
2	Fígado	9	Média $\pm$ DP	0,19 $\pm$ 0,19	8,8 $\pm$ 3,0	152 $\pm$ 73	3,9 $\pm$ 1,3	48 $\pm$ 13	0,49 $\pm$ 0,37
			Mediana	0,16	8,5	144	3,8	46	0,36
			Mín. - Máx.	<0,01-0,53	4,8-12,9	78-308	1,9-5,7	31-66	0,13-1,13
	Músculo	10	Média $\pm$ DP	-	1,0 $\pm$ 0,6	79 $\pm$ 28	0,16 $\pm$ 0,12	20 $\pm$ 4	0,27 $\pm$ 0,09
			Mediana	-	0,8	87	0,12	19	0,27
			Mín. - Máx.	<0,01-0,006	0,4-2,2	26-118	<0,02-0,33	15-28	0,14-0,41
	Rim	9	Média	0,50 $\pm$ 0,49	3,7 $\pm$ 1,0	115 $\pm$ 38	1,3 $\pm$ 2,0	25 $\pm$ 5	0,35 $\pm$ 0,18
			Mediana	0,21	37	101	0,7	25	0,28
			Mín. - Máx.	0,03-1,41	2,5-5,6	76-191	0,2-6,7	17-33	0,14-0,62
3/4	Fígado	54	Média $\pm$ DP	0,32 $\pm$ 0,28	13 $\pm$ 31	222 $\pm$ 107	3,4 $\pm$ 1,6	59 $\pm$ 22	0,50 $\pm$ 0,27
			Mediana	0,29	6,8	206	3,0	46	0,49
			Mín. - Máx.	<0,01-1,55	0,8-231	41,3-442	0,3-7,3	22-288	0,14-1,19
	Músculo	57	Média $\pm$ DP	0,01 $\pm$ 0,007	0,9 $\pm$ 0,4	90 $\pm$ 40	0,23 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 6	0,25 $\pm$ 0,03
			Mediana	0,006	0,85	77	0,15	18	0,24
			Mín. - Máx.	0,004-0,02	0,2-3,4	25,5-206	0,03-2,7	5,5-45	0,03-0,48
	Rim	52	Média $\pm$ DP	0,96 $\pm$ 0,68	4,0 $\pm$ 1,6	126 $\pm$ 57	0,72 $\pm$ 0,47	24 $\pm$ 9	0,31 $\pm$ 0,13
			Mediana	0,81	3,5	121	0,6	21	0,29
			Mín. - Máx.	0,17-3,26	2,4-12	27-317	0,2-2,7	9,9-49	0,05-0,63
5	Fígado	32	Média $\pm$ DP	0,24 $\pm$ 0,16	6,7 $\pm$ 2,2	283 $\pm$ 112	3,0 $\pm$ 0,8	48 $\pm$ 26	0,42 $\pm$ 0,26
			Mediana	0,19	6,5	265	2,8	42	0,35
			Mín. - Máx.	<0,01-0,71	1,8-12	42-518	1,4-4,5	25-179	0,12-1,07
	Músculo	33	Média $\pm$ DP	0,008 $\pm$ 0,009	0,8 $\pm$ 0,4	88 $\pm$ 46	0,16 $\pm$ 0,16	20 $\pm$ 5	0,22 $\pm$ 0,08
			Mediana	0,005	0,73	78	0,12	19	0,21
			Mín. - Máx.	0,003-0,03	0,14 $\pm$ 1,8	40-257	<0,02-0,70	13-37	0,10-0,40
	Rim	29	Média	0,47 $\pm$ 0,30	3,3 $\pm$ 0,9	130 $\pm$ 42	0,5 $\pm$ 0,1	21 $\pm$ 5	0,24 $\pm$ 0,12
			Mediana	0,38	3,1	122	0,5	21	0,21
			Mín. - Máx.	0,06-1,22	1,9-5,7	49-199	0,3-0,9	13-32	0,10-0,48

As concentrações medianas de As no fígado de *S. guianensis* em toda área de estudo estão maiores do que aquelas reportadas na literatura. Com exceção deste caso, as medianas das concentrações dos elementos-traço estão na mesma ordem de magnitude daquelas reportadas na literatura. Entretanto, a literatura abrange diferentes estados da costa brasileira, inclusive áreas mais urbanizadas e industrializadas que a costa do ESAs concentrações medianas de Cd no rim de *S. guianensis* em toda área de estudo estão maiores do que aquelas reportadas na literatura, assim como as concentrações medianas de Cd no rim, com destaque para a região Barra do Riacho/Metropolitana ( $0,82 \mu\text{g.g}^{-1}$ ).

Tabela 4: Média, mediana, mínimo e máximo das concentrações de As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn no fígado, músculo e rim de *Pontoporia blainvillei* na costa do Espírito Santo analisados durante os 4 anos do PMBA/Fest, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de peso úmido.

Espécie	Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Fígado	14	Média $\pm$ DP	$0,12 \pm 0,15$	$4,2 \pm 1,3$	$261 \pm 143$	$4,0 \pm 0,9$	$33 \pm 12,4$	$0,48 \pm 0,23$
			Mediana	0,03	4,06	262	3,8	33	0,48
			Mín. - Máx.	0,01-0,48	2,0-7,0	84-593	2,7-5,8	17-55	0,17-0,84
	Músculo	17	Média $\pm$ DP	$0,01 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,52$	$76 \pm 35$	$0,28 \pm 0,26$	$13 \pm 4,3$	$0,28 \pm 0,11$
			Mediana	0,006	0,54	79	0,17	11	0,28
			Mín. - Máx.	0,005-0,02	0,17-1,8	19-141	0,03-0,9	5,9-25	0,13-0,44
	Rim	11	Média	$0,37 \pm 0,30$	$2,9 \pm 0,6$	$116 \pm 48$	$0,9 \pm 0,4$	$19 \pm 5,5$	$0,33 \pm 0,10$
			Mediana	0,27	2,7	116	0,7	18	0,31
			Mín. - Máx.	0,05-1,1	2,2-3,9	56-209	0,6-1,9	11-28	0,23-0,46

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

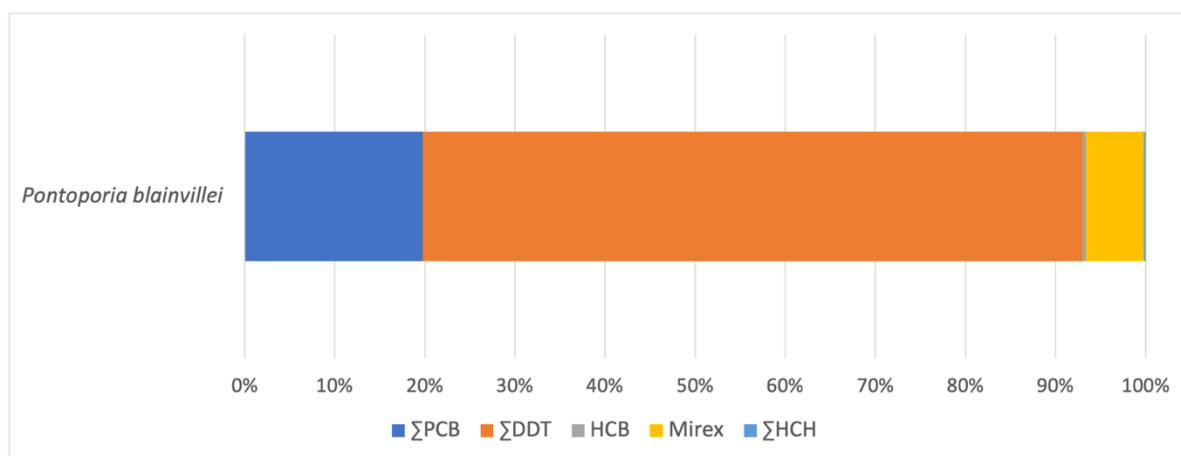
Tabela 5: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organoclorados  $\Sigma\text{PCB}$ ,  $\Sigma\text{DDT}$ , HCB, mirex e  $\Sigma\text{HCH}$ , expressas em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  peso lipídico, em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.

		$\Sigma\text{PCB}$	$\Sigma\text{DDT}$	HCB	Mirex	$\Sigma\text{HCH}$
<b><i>Pontoporia blainvillei</i></b>						
N= 17	Mediana	3,03	11,2	0,1	1,0	0,03
	Média $\pm$ Desvio Padrão	$5,80 \pm 6,5$	$20,6 \pm 26,1$	$0,3 \pm 0,5$	$2,7 \pm 4,0$	0,03
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 25,08	0,2 - 80,6	<0,002 - 2,0	<0,001 - 14,9	<0,002 - 0,03
<b><i>Sotalia guianensis</i></b>						
Região 1 N= 58	Mediana	10,6	6,5	0,1	1,6	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	$24,1 \pm 38,9$	$47,2 \pm 95,6$	$51,5 \pm 117,9$	$43,6 \pm 113,1$	-
	Mínimo - Máximo	0,3 - 210,8	0,1 - 414,3	<0,002 - 1,6	0,1 - 82,6	-
Região 2	Mediana	19,3	6,9	0,1	1,6	0,05

		$\Sigma$ PCB	$\Sigma$ DDT	HCB	Mirex	$\Sigma$ HCH
N= 16	Média $\pm$ Desvio Padrão	19,3 $\pm$ 12,8	44,6 $\pm$ 83,3	0,2 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 8,4	0,05 $\pm$ 0,04
	Mínimo - Máximo	1,0 - 47,6	2,1 - 265,1	<0,002 - 0,9	0,6 - 56,2	<0,002 - 0,1
Região 3/4 N= 57	Mediana	20,2	6,7	0,1	1,6	0,1
	Média $\pm$ Desvio Padrão	41,7 $\pm$ 52,1	51,5 $\pm$ 117,9	0,3 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 21,4	0,1 $\pm$ 0,04
	Mínimo - Máximo	0,6 - 238,8	0,2 - 651,0	<0,001 - 1,9	<0,001 - 75,1	<0,002 - 0,1
Região 5 N= 37	Mediana	23,9	6,2	0,1	1,0	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	33,2 $\pm$ 47,7	43,6 $\pm$ 113,1	0,2 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 24,3	-
	Mínimo - Máximo	1,2 - 273,7	0,2 - 530,7	<0,002 - 1,6	0,1 - 97,1	-

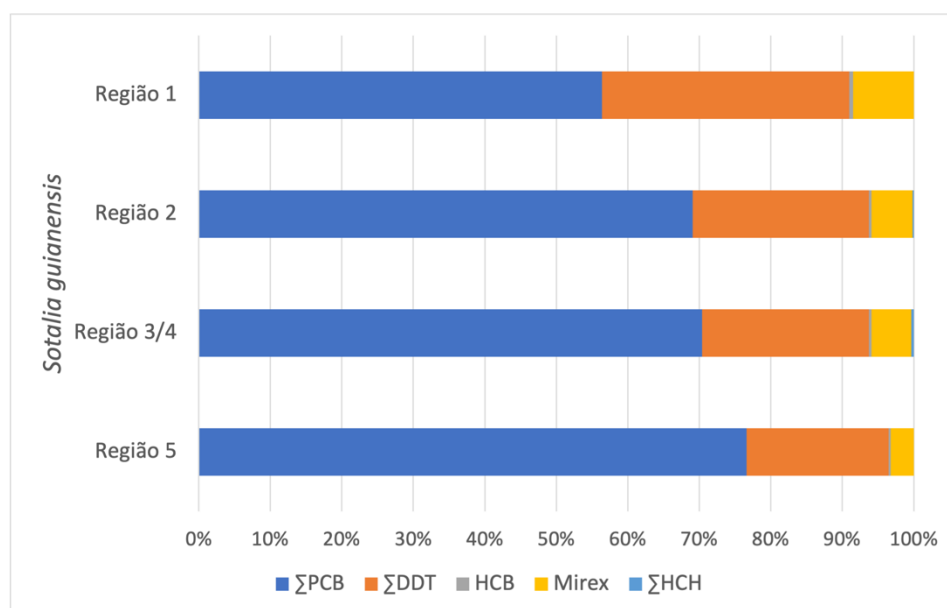
Foram encontradas altas concentrações de  $\Sigma$ PCB em botos-cinza de todas as regiões monitoradas, e no indivíduo macho de golfinho-de-dentes-rugosos, que excedem os valores de 17  $\mu\text{g.g}^{-1}$  lip sugeridos para desencadear efeitos deletérios em mamíferos marinhos. Com o aumento do número amostral de toninhas (n=17) foi possível observar uma elevação nas concentrações de DDT no presente RA2022. As medianas das concentrações de bifenilas policloradas (PCBs) no tecido adiposo subcutâneo de botos-cinza (n=168) coletados no ES aumentaram gradativamente da região 1 (norte) para a região 5 (sul), sendo observada diferença significativa entre a região 1 e as regiões 3/4 e 5. Em relação aos pesticidas organoclorados (DDT, HCB, HCH e Mirex), as concentrações foram similares entre as regiões. Quanto a variação temporal, os pesticidas organoclorados (DDT, Mirex e HCB) apresentaram concentrações significativamente mais elevadas no decorrer dos anos de coleta, sendo as maiores concentrações observadas nos indivíduos coletados nos Anos 3 e 4 do PMBA/Fest.

Figura 22: Perfil de contribuição de compostos organoclorados  $\Sigma$ PCB,  $\Sigma$ DDT, HCB, mirex e  $\Sigma$ HCH em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletadas na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



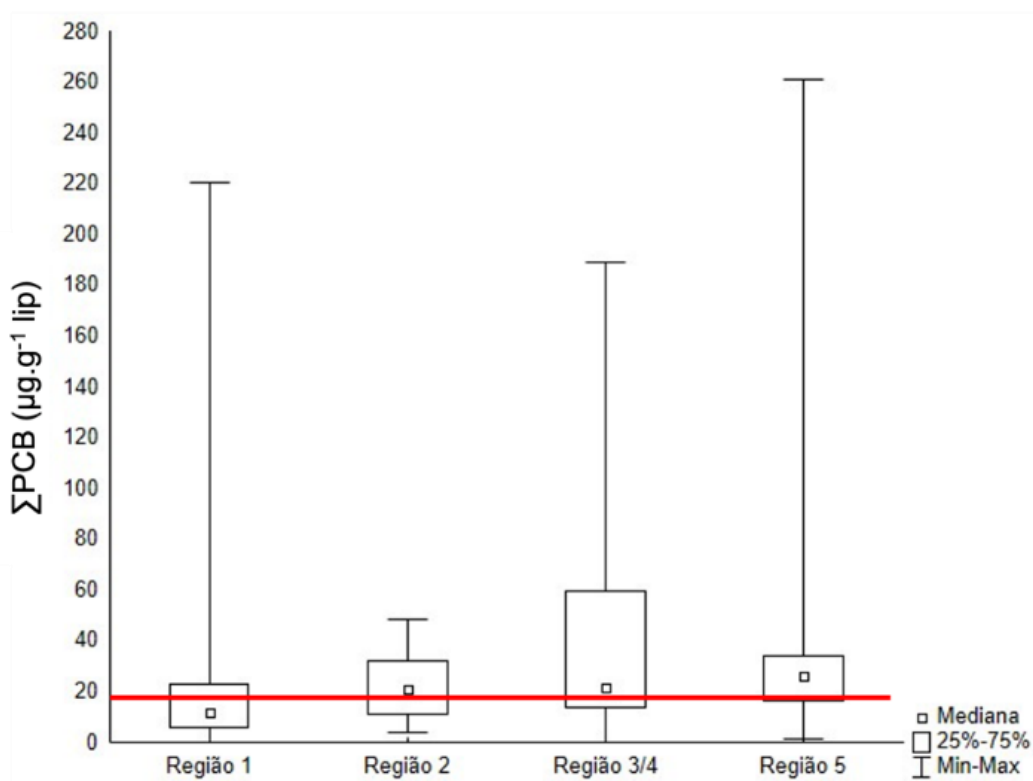
Diferentemente do observado na outra espécie, o perfil de contaminação das toninhas é dominado por DDTs, seguido de PCBs, mirex, HCB e HCHs.

Figura 23: Perfil de contribuição de compostos organoclorados  $\Sigma$ PCB,  $\Sigma$ DDT, HCB, mirex e  $\Sigma$ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



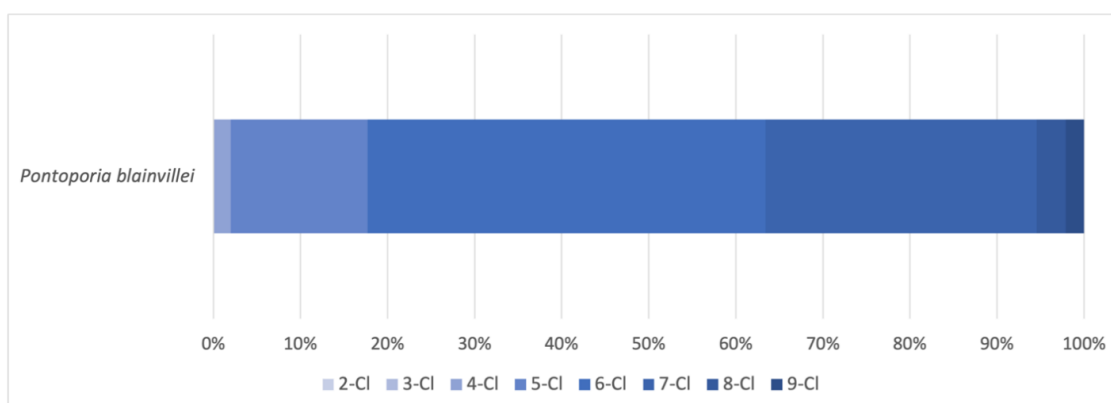
O perfil de contaminação semelhante entre as regiões, com predomínio de PCBs, seguido por DDTs, mirex, HCB e HCHs. No entanto, nota-se uma contribuição um pouco maior de DDTs na região 1 quando comparada às outras regiões.

Figura 24: Concentração de  $\Sigma$ PCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest



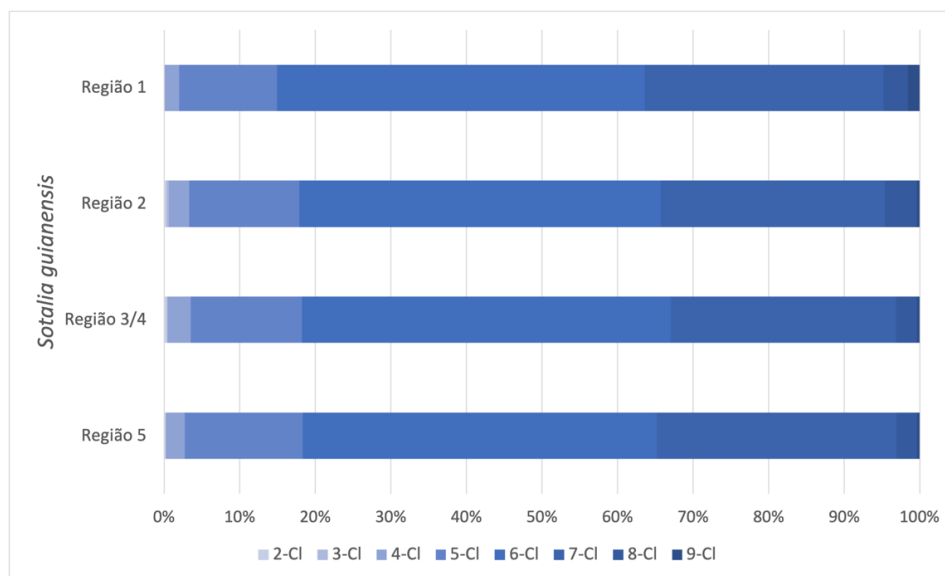
A concentração de  $\Sigma$ PCB em botos-cinza da região 1 é menor que nas regiões 3/4 e 5, sendo as últimas consideradas regiões metropolitanas, de alta impacto urbano. Vale ressaltar que as concentrações medianas em botos-cinza das regiões 2, 3/4 e 5 ultrapassam o limite de  $17 \mu\text{g.g}^{-1}$  (marcado pela linha vermelha) estabelecido para efeitos adversos na saúde de cetáceos. E, apesar de a mediana da região 1 encontrar-se abaixo deste limite, cerca de 31% dos indivíduos analisados nesta região apresentam concentrações superiores a esta. As concentrações de  $\Sigma$ PCB são similares às reportadas para populações que residem em áreas que sofrem com a alta pressão antrópica. Tais concentrações observadas podem ter consequências para a manutenção das populações e devem ser monitoradas.

Figura 25: Perfil de contribuição de PCBs por grau de cloração em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



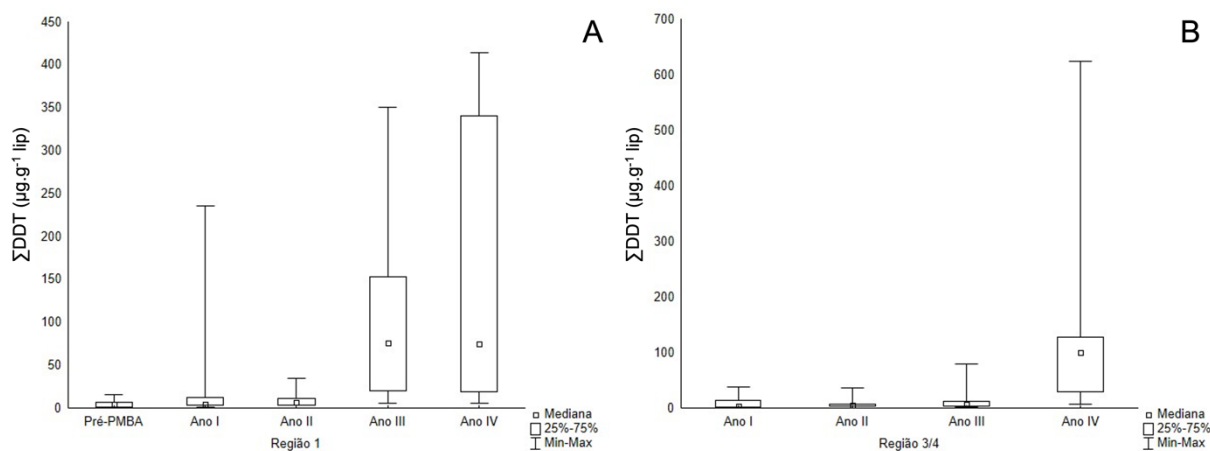
Assim como observado para o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), o perfil de PCBs por grau de cloração reflete a maior disponibilidade e baixa taxa de degradação dos congêneres contendo, 5, 6 e 7 átomos de cloro em sua composição.

Figura 26: Perfil de contribuição de PCBs por grau de cloração em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do estado do Espírito Santo (ES) durante os quatro anos de PMBA/Fest.



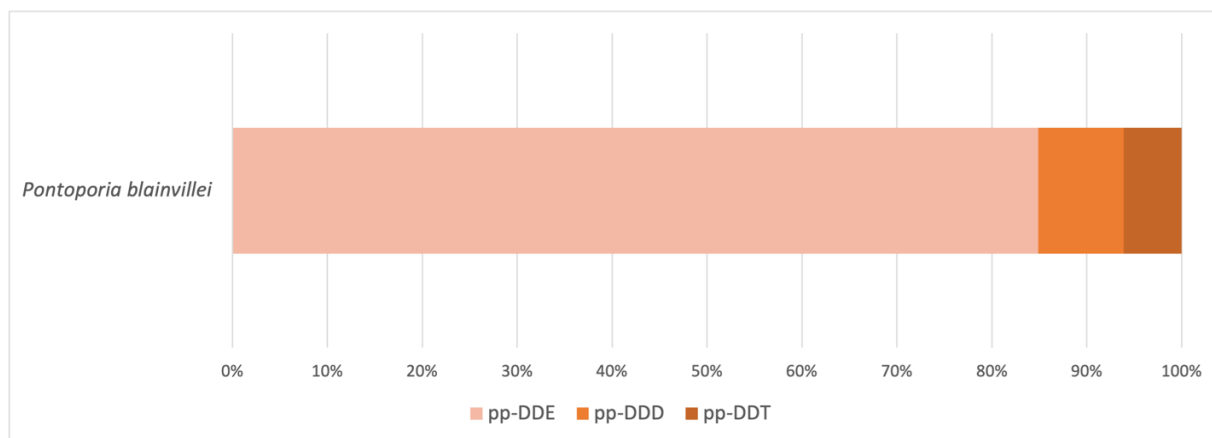
De modo geral, não são observadas diferenças no perfil de PCBs relacionados ao grau de cloração em botos-cinza ao longo da costa do ES, sendo este semelhante ao observado em golfinhos-de-dentes-rugosos e toninhas também coletadas ao longo da costa.

Figura 27: Concentração de  $\Sigma$ DDT em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1 (A) e 3/4 (B) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante no período pré-PMBA/Fest e durante os anos 1-4 de PMBA/Fest.



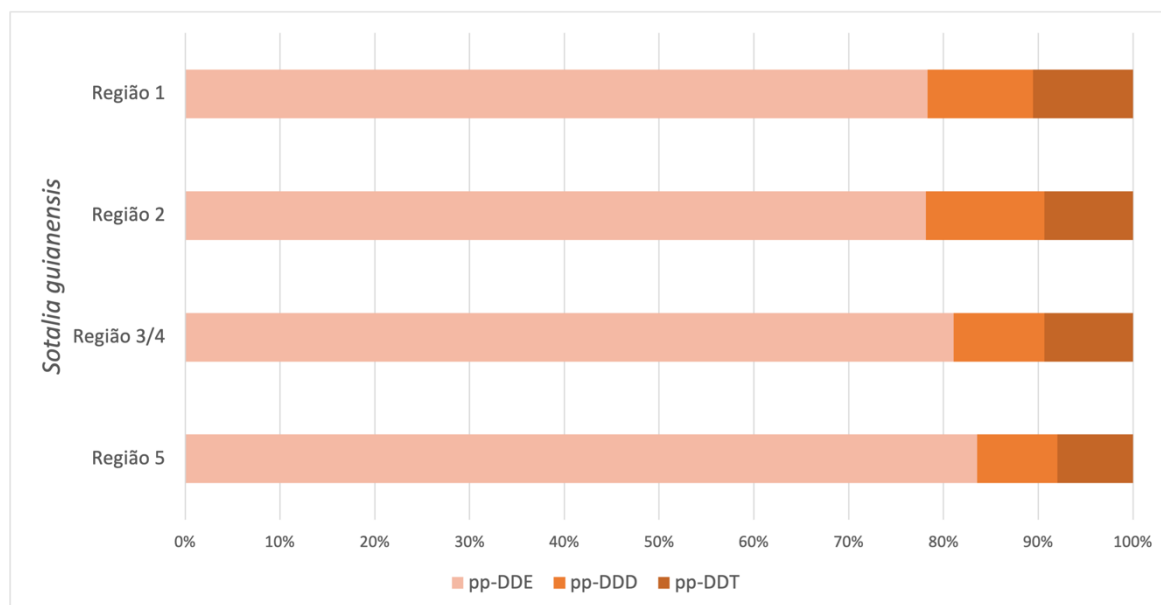
Em ambas as regiões, as concentrações de DDT em botos-cinza aumentaram gradativamente desde o período pré-monitoramento até o Ano 4.

Figura 28: Perfil de contribuição de *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDT em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest



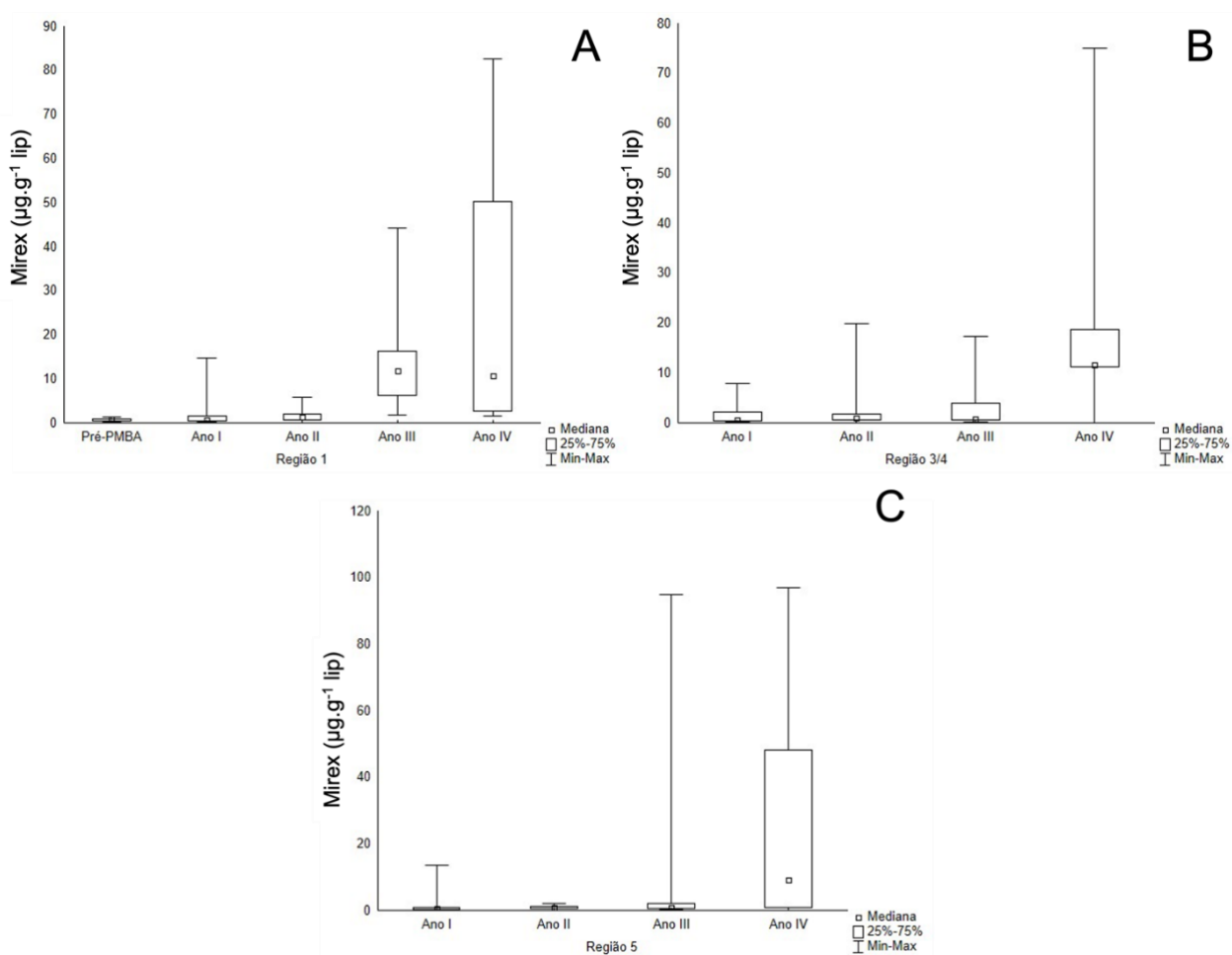
O predomínio do metabólito *p,p'*-DDE em toninhas, sugere que não disponibilização recente de DDT na teia trófica deste cetáceo residente. Em toninhas, foi observado um aumento das concentrações de pesticidas organoclorados foi reportado recentemente em toninhas dessa região após o rompimento da barragem de Fundão (Oliveira-Ferreira et al., 2022) e, atualmente, as concentrações de DDTs em toninhas são maiores que as concentrações de PCBs, diferentemente do observado para botos-cinza da mesma região, e, ainda, em contraste também do que é observado em cetáceos costeiros do sudeste do Brasil.

Figura 29: Perfil de contribuição de *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDT em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



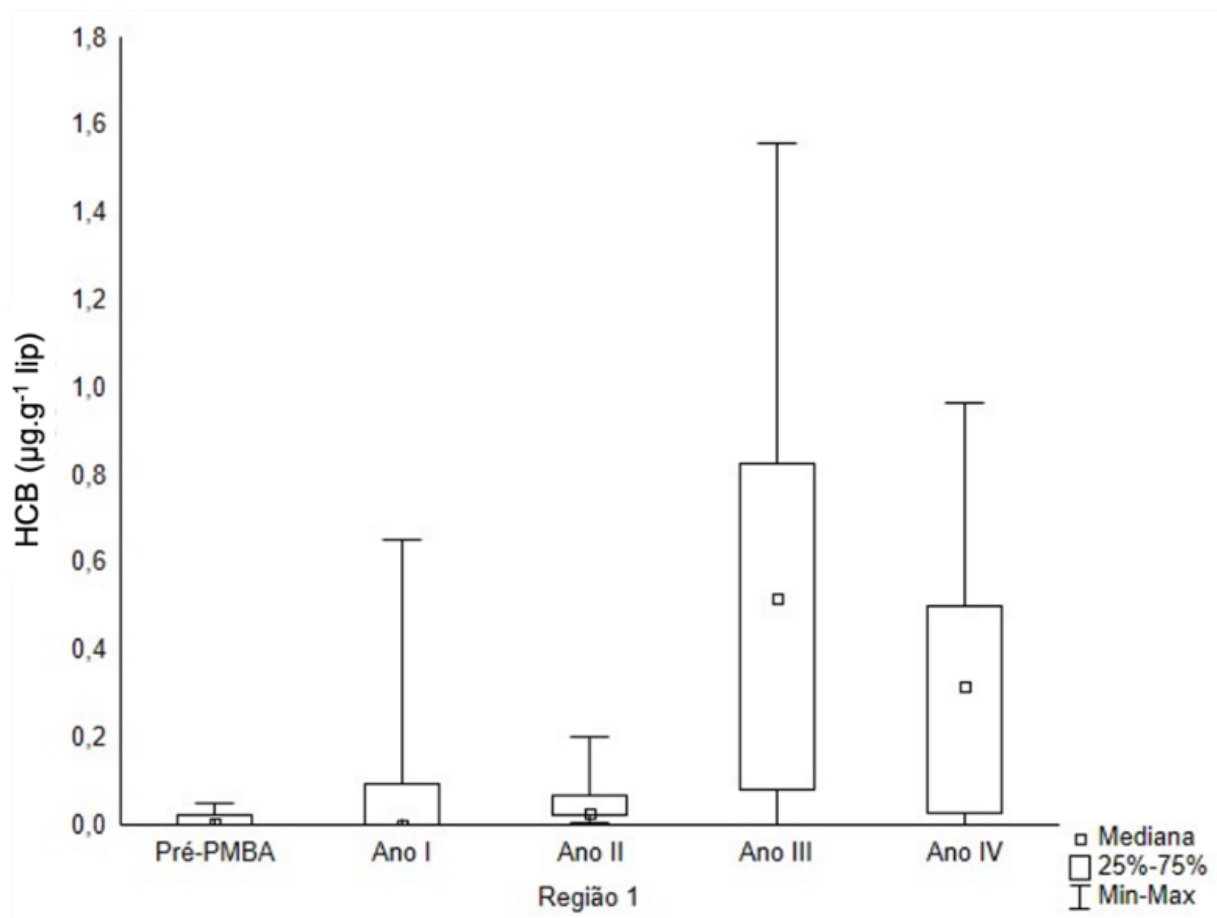
Assim como observado em toninhas (*Pontoporia blainvillei*), há dominância de *p,p'*-DDE no perfil, indicando uma contaminação histórica e não recente no local.

Figura 30: Concentração de Mirex em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (A), 3/4 (B) e 5 (C) coletados na costa do estado do Espírito Santo (ES) durante os quatro anos de PMBA/Fest.



As concentrações de mirex em botos-cinza sofreram um aumento gradativo na costa do ES ao longo dos quatro anos de monitoramento deste composto.

Figura 31: Concentração de HCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



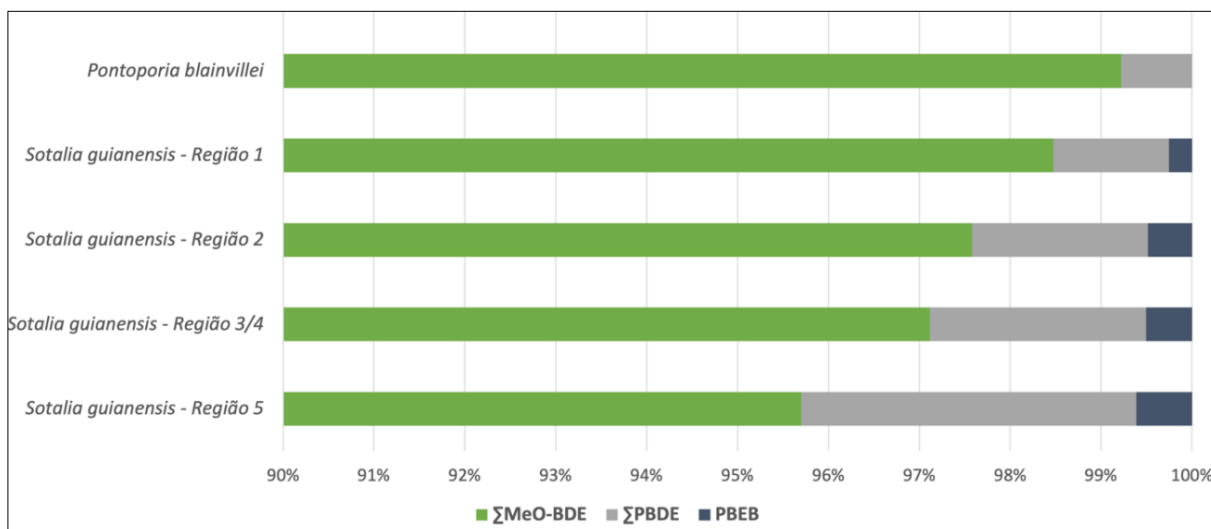
As concentrações de HCB foram maiores no Ano 3 que no Ano 1, sugerindo também uma remobilização de pesticidas organoclorados ao longo do período de monitoramento dos botos-cinza.

Tabela 6: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organobromados de origem natural,  $\Sigma$ MeO-BDE, e de origem antrópica,  $\Sigma$ PBDE, PBEB e HBBZ, expressas em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  peso lipídico, toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.

		$\Sigma$ MeO-BDE	$\Sigma$ PBDE	PBEB	HBBZ
<b><i>Pontoporia blainvillei</i></b>					
N= 14	Mediana	3,8	0,03	-	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	3,7 $\pm$ 1,9	0,05 $\pm$ 0,07	-	-
	Mínimo - Máximo	1,2 - 8,2	0,005 - 0,27	-	-
<b><i>Sotalia guianensis</i></b>					
Região 1 (N= 46)	Mediana	3,9	0,05	0,01	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	12,7 $\pm$ 28,0	0,19 $\pm$ 0,40	0,03 $\pm$ 0,04	-
	Mínimo - Máximo	0,2 - 184,3	<0,0001 - 2,1	<0,0002 - 0,09	-
Região 2 (N= 13)	Mediana	4,0	0,08	0,02	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	6,2 $\pm$ 4,8	0,26 $\pm$ 0,53	0,02	-
	Mínimo - Máximo	1,5 - 17,0	<0,0001 - 1,8	<0,0002 - 0,02	-
Região 3/4 (N= 49)	Mediana	4,81	0,12	0,03	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	8,1 $\pm$ 6,8	0,26 $\pm$ 0,31	0,03 $\pm$ 0,03	-
	Mínimo - Máximo	0,4 - 27,8	<0,0001 - 1,2	<0,0002 - 0,08	-
Região 5 (N= 27)	Mediana	3,1	0,12	0,02	-
	Média $\pm$ Desvio Padrão	6,9 $\pm$ 11,6	0,32 $\pm$ 0,71	0,02 $\pm$ 0,02	-
	Mínimo - Máximo	0,5 - 57,8	<0,0001 - 3,4	<0,0002 - 0,05	-

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

Figura 32: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural,  $\Sigma$ MeO-BDE, e de origem antrópica,  $\Sigma$ PBDE e PBEB, em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.



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

Figura 33: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural,  $\Sigma$ MeO-BDE, , toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.

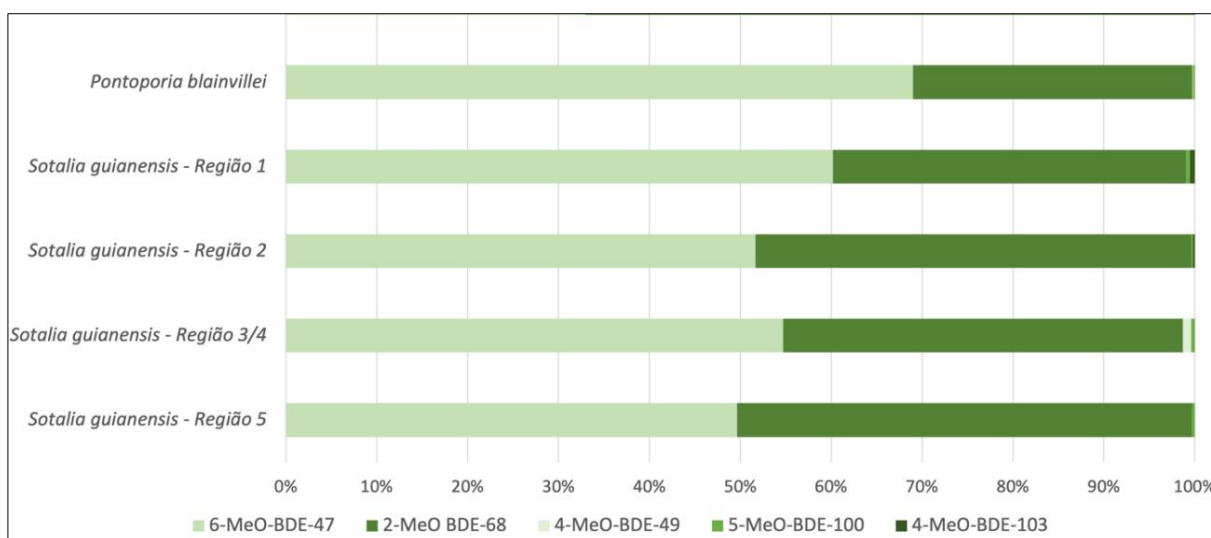
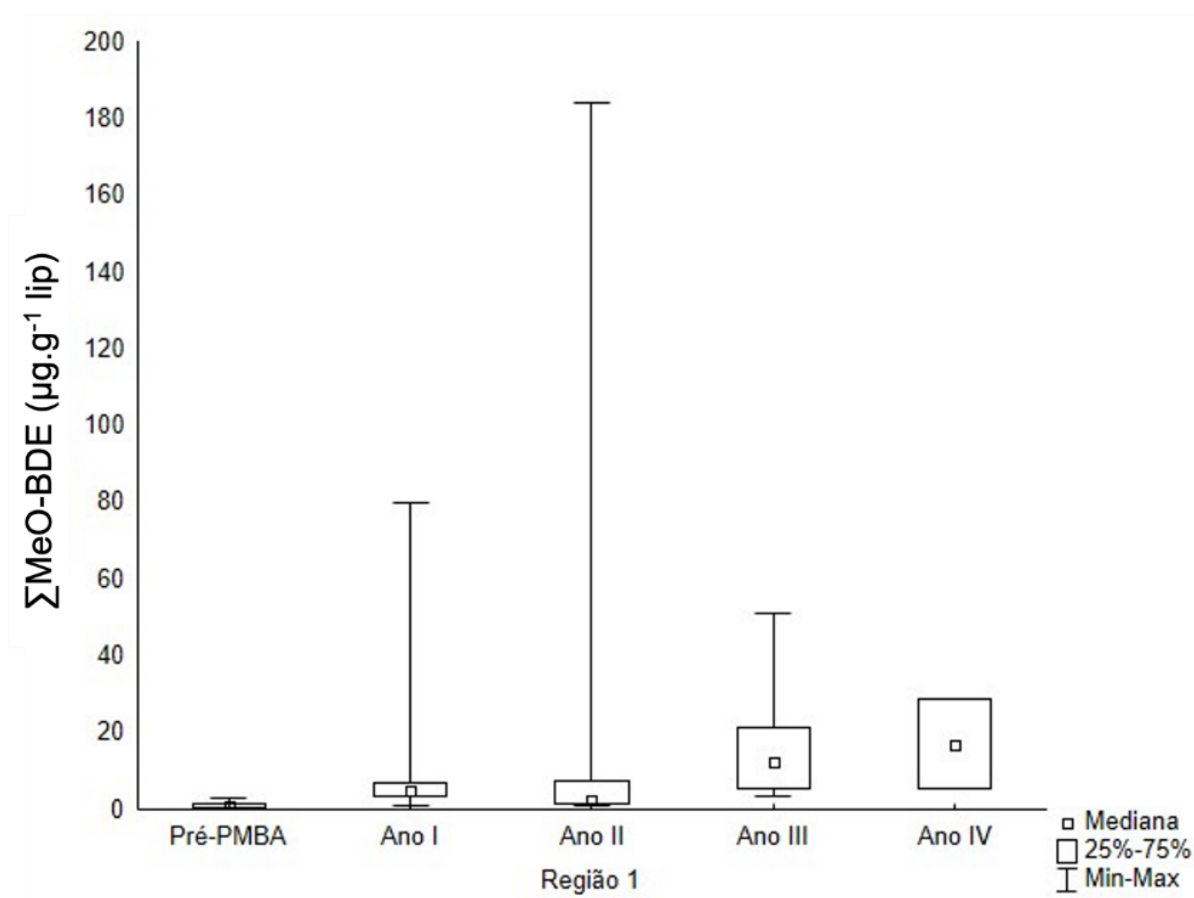


Figura 34: Concentração de  $\Sigma$ MeO-BDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 coletados na costa do estado do Espírito Santo por ano durante os quatro anos de PMBA/Fest.



Foi observado um aumento gradual das concentrações de compostos orgânicos naturais em botos-cinza e as diferenças foram significativas entre o período pré-PMBA/Fest e os anos 1, 3 e 4. Especialmente para os botos-cinza, as elevadas concentrações de compostos metoxilados podem refletir a influência do Banco de Abrolhos na costa do Espírito Santo.

Figura 35: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem antrópica convencionais (por congênere de PBDE) e emergente (PBEB) em golfinhos-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*), toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os quatro anos de PMBA/Fest.

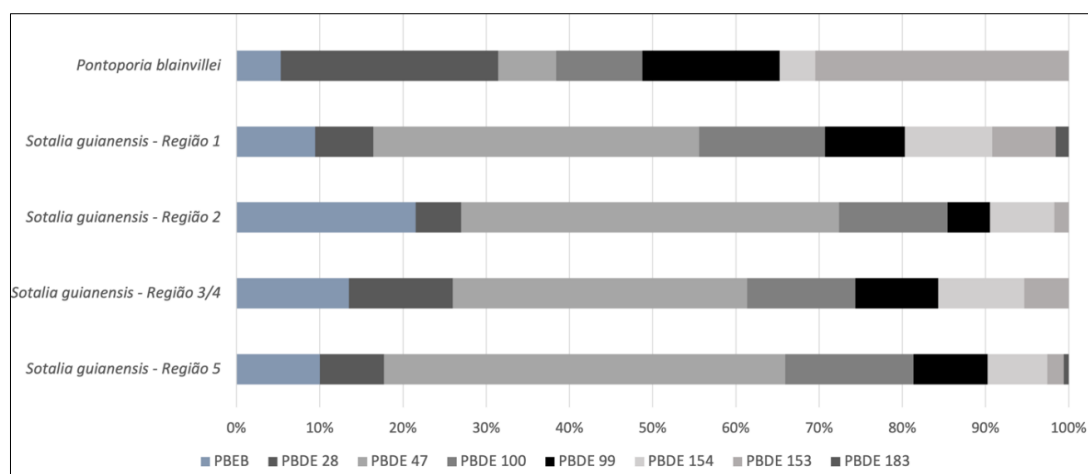
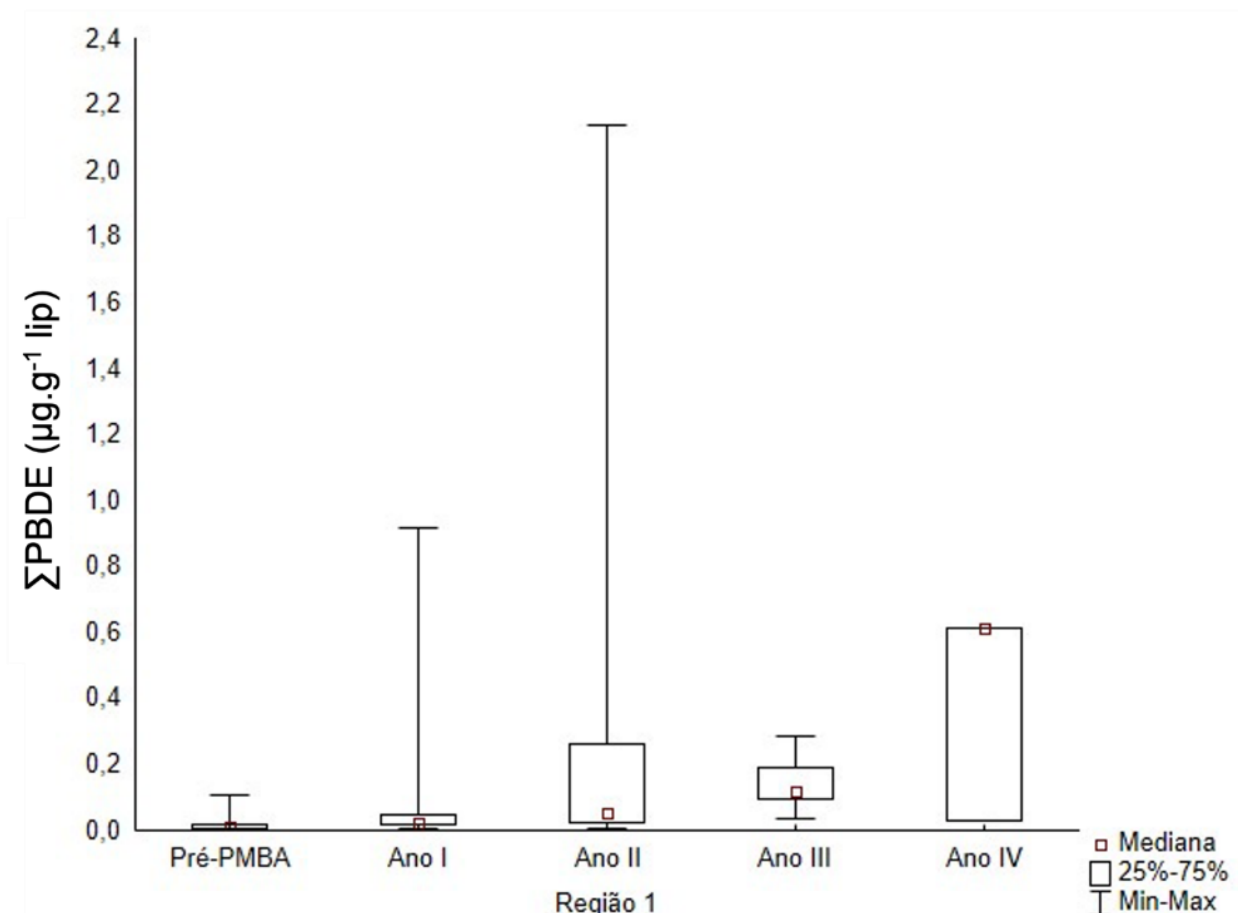


Figura 36: Concentração de  $\Sigma$ PBDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 coletados na costa do estado do Espírito Santo por ano durante os quatro anos de PMBA/Fest.



As concentrações de PBDEs aumentaram entre o período pré-PMBA/Fest e o ano 3 de monitoramento em botos-cinza da região 1. As concentrações de compostos antropicos encontradas nessas regiões são semelhantes às observadas em locais altamente impactados na costa do Brasil, como a Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. Em relação às toninhas, as concentrações de compostos organobromados de origem natural e antrópica se assemelham às do boto-cinza da mesma região.

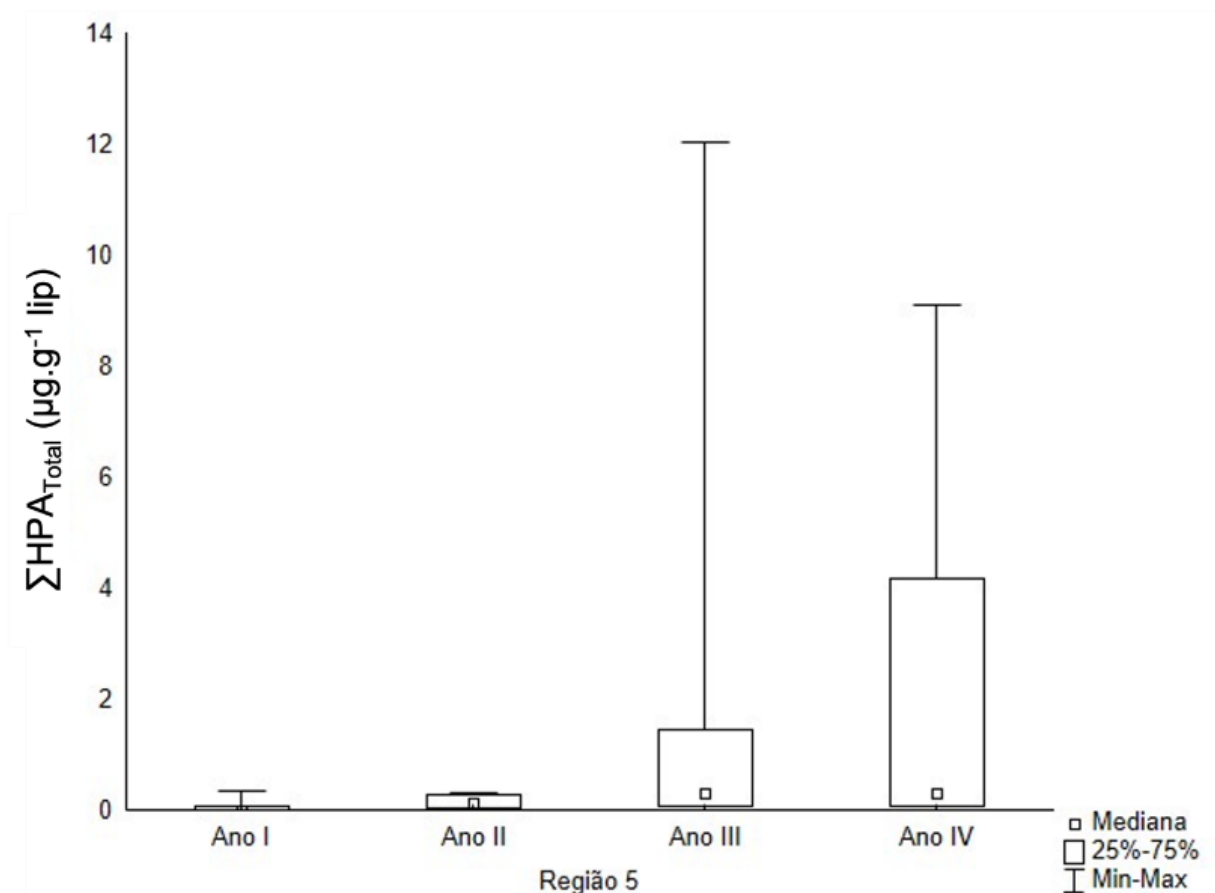
Tabela 7: Concentrações mediana, médias, desvio padrão, mínimas e máximas de  $\Sigma$ HPAs<sub>Total</sub>,  $\Sigma$ HPAs<sub>USEPA</sub>,  $\Sigma$ HPAs<sub>2-3</sub> anéis,  $\Sigma$ HPAs<sub>4-6</sub> anéis, expressas em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  peso lipídico, em tecido hepático de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados durante os 4 anos de PMBA/Fest.

		$\Sigma$ HPAs <sub>Total</sub>	$\Sigma$ HPAs <sub>USEPA</sub>	$\Sigma$ HPAs <sub>2-3</sub> anéis	$\Sigma$ HPAs <sub>4-6</sub> anéis
<b><i>Pontoporia blainvillei</i></b>					
N= 14	Mediana	0,188	0,058	0,030	0,017
	Média ± Desvio Padrão	0,586 ± 0,719	0,438 ± 0,659	0,240 ± 0,517	0,220 ± 0,326
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 2,119	<0,001 - 2,084	<0,001 - 1,661	<0,001 - 0,963
<b><i>Sotalia guianensis</i></b>					
Região 1	Mediana	0,179	0,172	0,043	0,316
(N= 58)	Média ± Desvio Padrão	3,220 ± 7,720	3,265 ± 7,766	0,863 ± 3,710	3,053 ± 6,381

		$\Sigma \text{HPAs}_{\text{Total}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{\text{USEPA}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 37,272	<0,001 - 37,272	<0,001 - 25,149	<0,001 - 26,050
Região 2 (N= 17)	Mediana	0,784	0,725	0,328	0,507
	Média $\pm$ Desvio Padrão	6,631 $\pm$ 18,939	6,832 $\pm$ 18,721	0,666 $\pm$ 0,760	6,048 $\pm$ 18,482
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 82,476	<0,001 - 79,607	<0,001 - 16,663	<0,001 - 74,608
Região 3/4 (N= 57)	Mediana	0,095	0,118	0,053	0,182
	Média $\pm$ Desvio Padrão	2,979 $\pm$ 12,048	3,052 $\pm$ 11,961	0,849 $\pm$ 2,778	3,002 $\pm$ 11,105
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 82,476	<0,001 - 79,607	<0,001 - 16,663	<0,001 - 65,814
Região 5 (N= 36)	Mediana	0,191	0,181	0,054	0,149
	Média $\pm$ Desvio Padrão	1,446 $\pm$ 2,891	1,436 $\pm$ 2,888	0,230 $\pm$ 0,395	1,501 $\pm$ 2,904
	Mínimo - Máximo	<0,001 - 12,032	<0,001 - 12,032	<0,001 - 1,708	<0,001 - 11,703

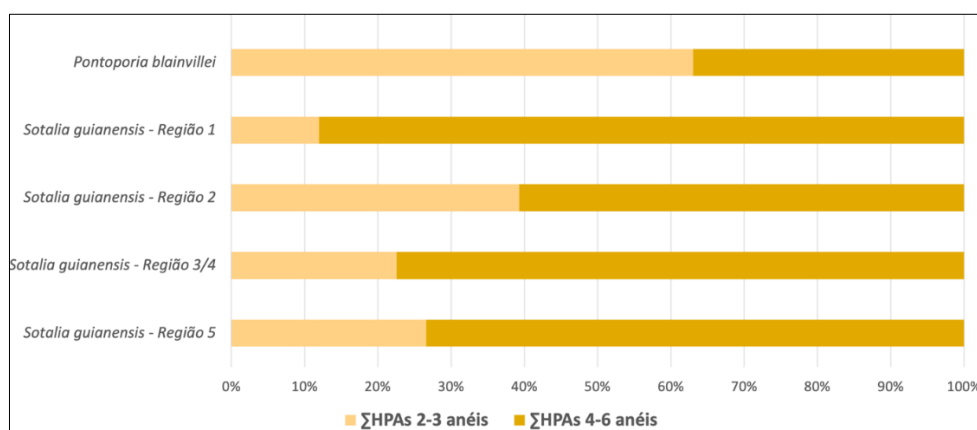
As concentrações medianas encontradas em golfinhos-de-dentes-rugosos são maiores que as observadas em botos-cinza e toninhas. Em botos-cinza, considerando a variação espacial, não foram observadas diferenças significativas entre as regiões.

Figura 37: Concentração de  $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$  em tecido hepático de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados na região 5 por ano, na costa do Espírito Santo, durante os quatro anos de PMBA/Fest.



A variação temporal das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, foram investigadas nas amostras de botos-cinza coletadas nas regiões 1, 3/4 e 5, devido ao maior n amostral. Foi observado um aumento nas concentrações de  $\Sigma\text{HPAs}_{\text{Total}}$  na região 5 entre o primeiro ano de monitoramento e o último. Tal aumento pode estar relacionado à redistribuição de compostos por conta de perturbações ambientais, remobilizando-os para as teias tróficas dos botos-cinza.

Figura 38: Perfil de HPAs de baixo (2-3 anéis) e alto (4-6 anéis) peso molecular em tecido hepático de golfinhos-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*), toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados na costa do Espírito Santo, durante os quatro anos de PMBA/Fest.

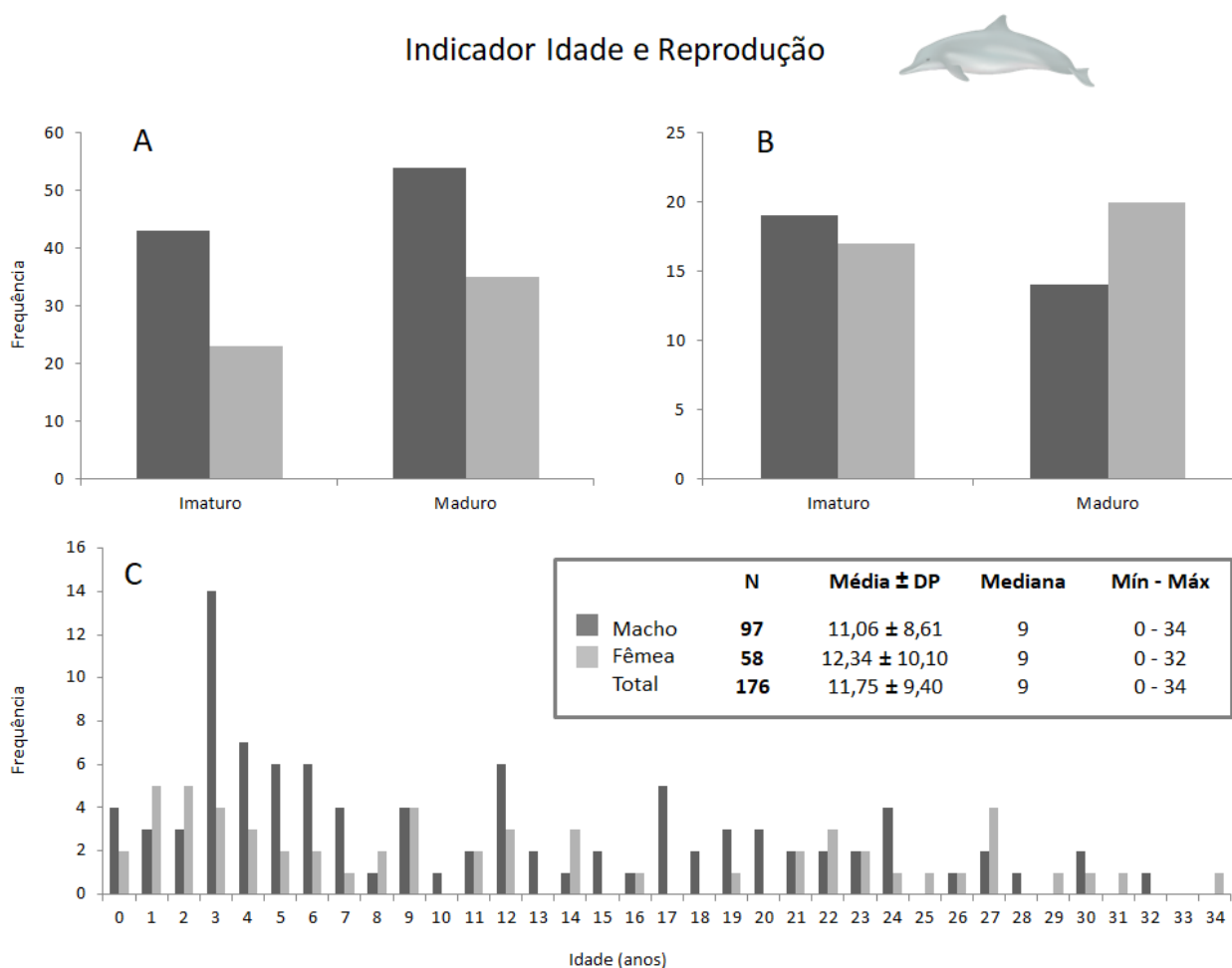


O perfil de HPAs de baixo e alto peso molecular variou entre as espécies. O golfinho-de-dentes-rugosos apresentou um perfil majoritariamente de compostos de alto peso molecular, assim como os botos-cinza. No entanto, chama a atenção a contribuição de HPAs de baixo peso molecular em botos-cinza da região 2. Apesar das sutis discrepâncias no perfil, não foram encontradas diferenças significativas entre botos-cinza das regiões 1, 2, 3/4 e 5. Já as toninhas apresentam um perfil com dominância de compostos de baixo peso molecular.

As concentrações de HPAs encontradas na área de estudo são maiores ou estão na mesma ordem de grandeza que as concentrações de HPAs em outras regiões que sofrem altos impactos ambiental.

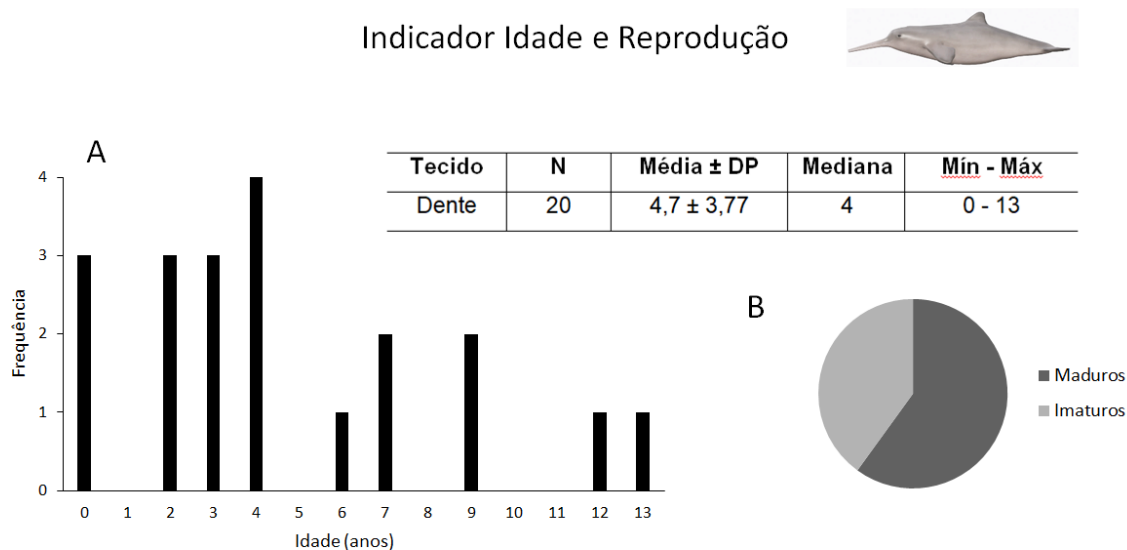
### 3.6 ESTRUTURA ETÁRIA E SEXUAL DAS POPULAÇÕES DE *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*

Figura 39: Distribuição dos indivíduos machos e fêmeas de boto-cinza (*S. guianensis*) coletados no Espírito Santo nos Anos 1, 2, 3 e 4 do PMBA/Fest em relação às classes de maturidade reprodutiva, conforme determinado por A) idade e B) maturidade gonadal. Observa-se maior frequência de indivíduos maduros, com idade média de 12,34 anos para fêmeas e 11,06 anos para machos (em B a maior frequência de imaturos machos possivelmente se deve a um artefato de amostragem, pois o conjunto de dados obtidos de gônadas é cerca de 50% menor em relação ao de dentes). C) As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 6 anos (imaturos).



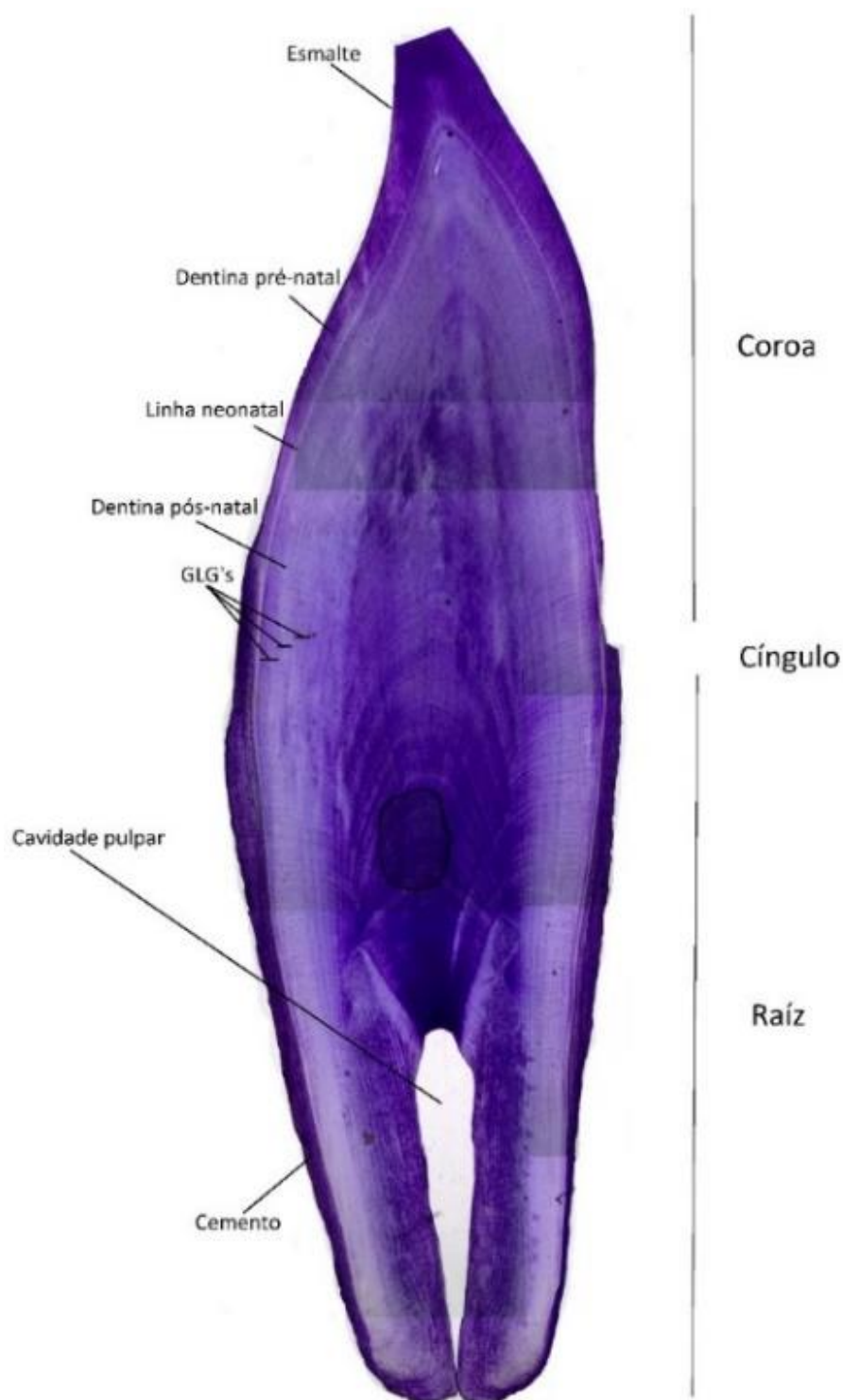
Os dados indicam um aumento da idade média dos indivíduos encalhados em relação à literatura (Tabela 1). Assim, a continuidade do monitoramento e das análises é necessária para avaliar se houve mudança temporal nos padrões e se eventuais divergências seriam resultado da amostragem (que é cerca de 50% menor no caso das gônadas em relação aos dentes). De qualquer forma, os resultados são preocupantes por indicar que a população de botos-cinza da região tem maior mortalidade de indivíduos com alta capacidade reprodutiva, potencialmente afetando a persistência desta espécie na área.

Figura 40: Indicador IDADE E REPRODUÇÃO. Distribuição dos indivíduos de toninha (*P. blainvillei*) coletados no Espírito Santo nos Anos 2, 3 e 4 do PMBA/Fest em relação às classes de maturidade reprodutiva, conforme determinado pela idade (A). Observa-se maior frequência de indivíduos maduros (B), com idade média de 4,7 anos.



As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 4 anos (imaturos). Os dados de idade não foram separados por sexo e não são apresentados gráficos para dados de gônadas, devido ao baixo N amostral (N = 20 e 6, respectivamente). Dessa forma, a compreensão da estrutura etária e da maturidade sexual no componente removido da população de toninhas do Espírito Santo, assim como do impacto na sua persistência, depende da continuidade do monitoramento e do aumento da amostragem para as análises de dentes e de gônadas.

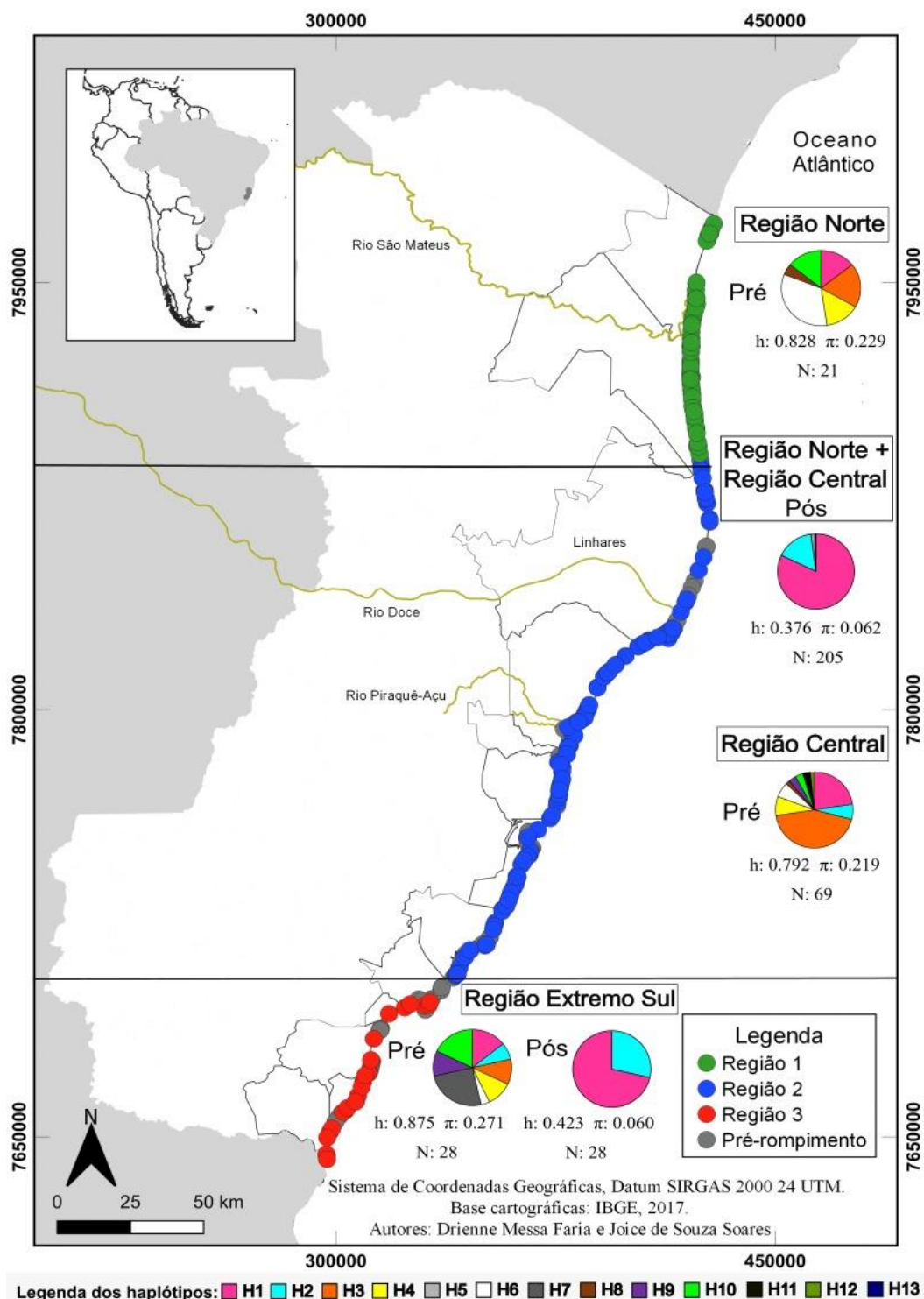
Figura 41: Corte histológico bucal-lingual do dente de *Sotalia guianensis* (SOT 346 - 20 anos), identificando suas estruturas.



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

### 3.7 ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS

Figura 42: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop (409p) de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo. Amostras analisadas dessa espécie são indicados por círculos. Os círculos coloridos, plotados ao longo da costa do Espírito Santo (verde para a Região Norte; vermelho para a Região Central; e azul para a Região Extremo Sul) referem-se a amostras de tecido muscular coletadas após o rompimento da barragem (Pós-rompimento), as amostras coletadas antes ao rompimento estão em cinza (Pré-rompimento).



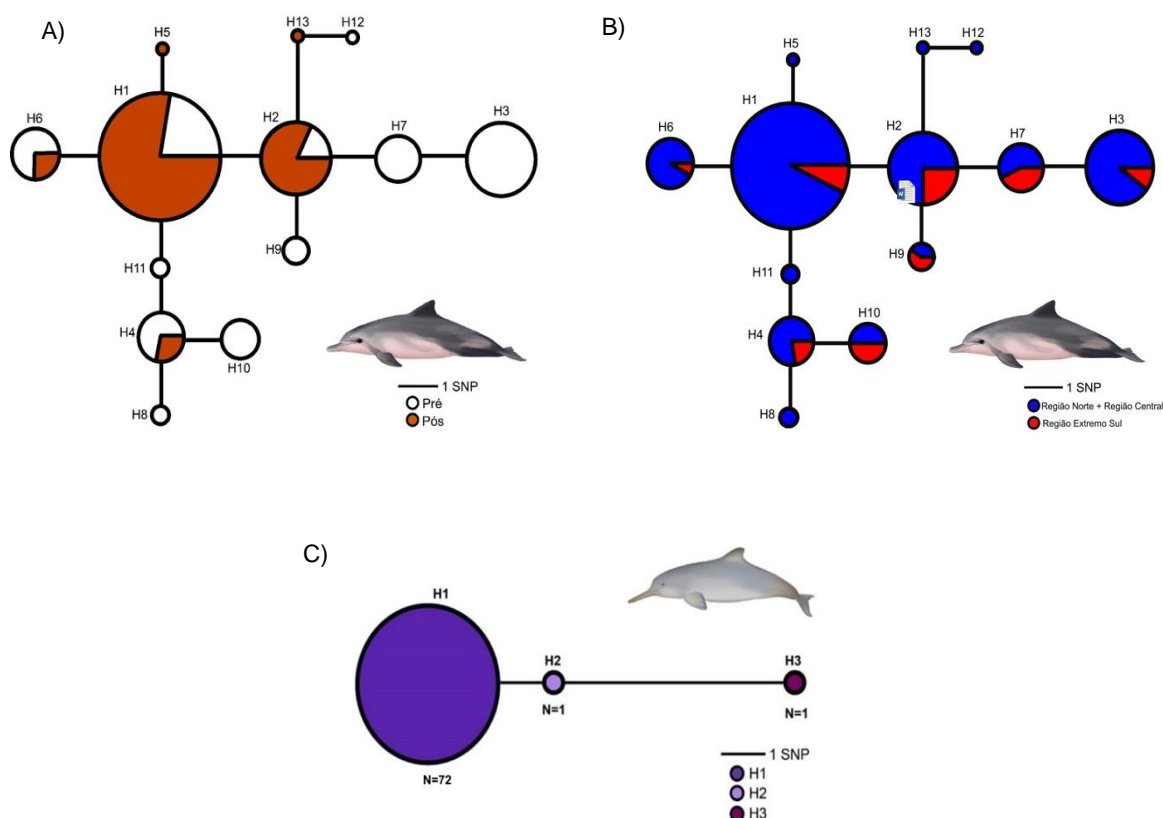
No total foram avaliados 351 indivíduos da espécie *Sotalia guianensis*. Os gráficos de pizza representam a proporção de haplótipos do DNA mitocondrial referente a estruturação espaço-temporal, cada cor refere-se a um haplótipo diferente. Para o período Pré-rompimento é possível observar três gráficos: um para a Região Norte, um para a Região Central e um para a Região Extremo Sul. Já para o período Pós-rompimento é possível observar somente dois gráficos de pizzas: um para Região Norte + Região Central Pós, e um para a Região Extremo Sul, conforme resultados de estruturação populacional temporal (Pré e Pós-rompimento) e espacial (Região Norte + Região Central, Região Extremo Sul). Os gráficos de pizza evidenciam presença de maior quantidade de haplótipos para todas as regiões avaliadas no período Pré-rompimento da barragem e uma perda no número de haplótipos no período Pós-rompimento, com somente três haplótipos para a região Norte+Região Central representados pelas cores azul claro, rosa e cinza e dois haplótipos para a Região Extremo Sul representados pelas cores rosa e azul claro. N = número de indivíduos; h = diversidade de haplotípica;  $\pi$  = diversidade nucleotídica.

Tabela 8: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop (409p) de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em diferentes períodos e regiões avaliados: Número de indivíduos (N); n° de haplótipos (Nh); diversidade haplotípica (h); diversidade nucleotídica ( $\pi$ ); D de Tajima, Fs de Fu. Valores entre parênteses são valores de p. Para D de Tajima foi considerado  $P < 0,05$  e para Fs de Fu  $P < 0,02$ . Valores destacados em cinza são os valores significativos.

Índices de diversidade e de neutralidade – Espacial (Região Norte/Região Central, Região Extremo Sul)						
	N	Nh	h	$\pi$	Tajima's D	Fu's FS
Região Norte + Região Central	295	13	0,615	0,133	-0,333 (0,365)	-5,833 (0,034)
Região Extremo Sul	56	8	0,781	0,192	1,212 (0,861)	-1,667 (0,200)
Índices de diversidade e de neutralidade - Temporal (Pré-rompimento e Pós-rompimento)						
	N	Nh	h	$\pi$	Tajima's D	Fu's FS
Pré	118	11	0,847	0,253	0,809 (0,7160)	-1,754 (0,284)
Pós	233	6	0,435	0,071	-0,753 (0,272)	-1,929 (0,220)
Índices de diversidade e de neutralidade - Espaço-temporal						
	N	Nh	h	$\pi$	Tajima's D	Fu's FS
Região Norte Pré	21	6	0,828	0,229	0,476 (0,678)	-0,793 (0,338)
Região Central Pré	69	11	0,792	0,219	0,133 (0,522)	-3,415 (0,060)
Região Norte + Região Central Pós	205	6	0,376	0,062	-0,919 (0,187)	-2,425 (0,172)
Região Extremo Sul Pré	28	8	0,875	0,271	2,225 (0,979)	-1,598 (0,203)
Região Extremo Sul Pós	28	2	0,423	0,06	1,032 (0,890)	1,281 (0,636)

Para a espécie *Sotalia guianensis*, os valores de diversidade genética foram moderados para as regiões avaliadas. Os menores valores foram encontrados para a região sob maior influência do Rio Doce e que recebeu o maior aporte do rejeito de minério após o rompimento da barragem (Região Norte + Região Central, Pós (N=205; Nh=6; h=0,376;  $\pi$ =0,062). Os menores valores foram encontrados também para a região sob influência do Rio Doce (Região Norte + Região Central, N=295; Nh=13; h=0,615;  $\pi$ =0,133) quando comparados com a Região Extremo Sul (N=56; Nh=8; h=0,781;  $\pi$ =0,192). Para o período Pós-rompimento (N=233; Nh=6; h=0,435;  $\pi$ =0,071) os valores de diversidade genética encontrados são considerados baixos e foram menores do que os encontrados para o período Pré-rompimento (N=118; Nh=11; h=0,847;  $\pi$ =0,253). Os menores valores estão em cinza na tabela. Para essa espécie continua sendo observada uma baixa diversidade genética mitocondrial mesmo com maior número amostral (N=72; Nh=3; h=0,055;  $\pi$ =0,032), com um haplótipo principal, observado em 97% da população do litoral do Espírito Santo.

Figura 43: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop. Rede de haplótipos baseada na análise de Median-Joining da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) das espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* no litoral do Espírito Santo. Cada círculo corresponde a um haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência na população. Cores diferentes representam os diferentes haplótipos encontrados. 1 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) significa um passo mutacional entre os haplótipos. A) Rede de haplótipos da espécie *Sotalia guianensis* entre os períodos avaliados (Pré e Pós – Rompimento); B) Rede de haplótipos da espécie *Sotalia guianensis* entre as regiões avaliadas (Região Norte + Região Central e Região 3); C) Rede de haplótipos da espécie *Pontoporia blainvillei*.



Para a espécie *Sotalia guianensis* foram encontrados 13 haplótipos, sendo possível observar compartilhamento de haplótipos, tanto entre os períodos avaliados quanto para as regiões. Para essa espécie são apresentadas duas redes de haplótipos uma vez que, ficou constatada estruturação genética entre os períodos avaliados (Pré e Pós-rompimento) e as regiões avaliadas (Região Norte+Região Central e Região Extremo Sul). Os haplótipos exclusivos (círculos de apenas uma cor) apareceram majoritariamente para o período pré-rompimento e Região Norte/Central. Para a espécie *Pontoporia blainvillei* não foi constatada estruturação genética entre os períodos e regiões avaliadas sendo constatada a presença de somente uma população para essa espécie no litoral do Espírito Santo. Para essa espécie continua sendo observada uma baixa diversidade genética mitocondrial mesmo com maior número amostral ( $N=72$ ;  $N_h=3$ ;  $h=0,055$ ;  $\pi=0,032$ ), com um haplótipo principal, observado em 97% da população do litoral do Espírito Santo.

Tabela 9: Índices de estruturação genética mitocondrial do marcador D-loop (409p) de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) (351 seqüências, 409 bp). A) Valores de Fst par-a-par; B) Análise de Variância Molecular (AMOVA). Valores estatisticamente significativos estão destacados em cinza. Valores de P podem ser observados entre parênteses,  $P < 0,05$ .

#### A) Fst par-a-par

##### Estruturação Espacial (Região Norte/Região Central x Região Extremo Sul)

	Região Norte + Região Central	Região Extremo Sul
Região Norte + Região Central (N=295)	-	
Região Extremo Sul (N=56)	0,145 (0,000)	-

##### Estruturação Temporal (Pré-rompimento e Pós-rompimento)

	Pré	Pós
Pré (N=118)	-	
Pós (N=233)	0,274 (0,000)	-

##### Estruturação Espaço-temporal

	1	2	3	4	5
1) Região Norte Pré (N=21)	-				
2) Região Central Pré (N=69)	0,061 (0,000)	-			
3) Região Norte + Região Central Pós (N=205)	0,409 (0,000)	0,341 (0,000)	-		
4) Região Extremo Sul Pré (N=28)	0,059 (0,018)	0,056 (0,009)	0,371 (0,000)	-	
5) Região Extremo Sul Pós (N=28)	0,360 (0,000)	0,296 (0,000)	0,400 (0,000)	0,284 (0,000)	-

#### B) AMOVA

##### Estruturação Espacial (Região Norte + Região Central x Região Extremo Sul)

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	5,452	0,05451 Va	14,52
Dentro das populações	349	111,984	0,32087 Vb	85,48
Total	350	117,436	0,37538	
Fst	0,145			
P-value	0			

##### Estruturação Temporal (Pré-rompimento e Pós-rompimento)

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	17,314	0,10869 Va	27,48
Dentro das populações	349	100,122	0,28688 Vb	72,52
Total	350	117,436	0,39557	
Fst	0,274			
P-value	0			

##### Estruturação Espaço-temporal

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	4	26,321	0,11920 Va	31,16
Dentro das populações	346	91,115	0,26334 Vb	68,84
Total	350	117,436	0,38253	
Fst	0,311			
P-value	0			

Os valores encontrados indicam estruturação genética em duas populações Região Norte + Região Central e Região Extremo Sul estruturação temporal em Pré-rompimento e Pós-rompimento. É possível observar estruturação espaço-temporal também em Região Norte Pré, Região Central Pré, Região Norte + Região

Central Pós, Região Extremo Sul Pré, Região Extremo Sul Pós. Os valores significativos estão destacados em cinza.

Tabela 10: Índices de diversidade genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em 10 locos microssatélites, número de alelos (K), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS). \*Valores estatisticamente significativos do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg com correção de Bonferroni para FIS (alfa = 0,005).

Loco	K	Ho	He	PIC	Ra	FIS
Sgui-002	5	0,00000	0,44167	0,442	1,898	1,000 (0,000) *
Sgui003	7	0,08889	0,73184	0,732	2,707	1,000 (0,000) *
Sgui005	3	0,00000	0,31594	0,316	1,632	1,000 (0,000) *
Sgui006	6	0,50000	0,83333	0,833	3,104	0,9979(0,023)
Sgui011	2	0,00000	0,66667	0,856	2,000	1,000 (0,327)
Sgui016	5	0,00000	0,44967	0,450	1,909	1,000 (0,000) *
Sgui017	4	0,00000	0,45141	0,451	1,909	1,000 (0,000) *
GATA98	10	0,81395	0,67924	0,694	2,504	0,0002 (0,999)
PPHO142	9	0,00667	0,39266	0,373	1,832	1,000 (0,000) *
MK6	4	0,01515	0,55182	0,478	2,119	1,000 (0,000) *
Média	5	0,00000	0,44167	0,442	1,898	1,000 (0,000) *

Foram avaliados 251 indivíduos (Pré e Pós-rompimento da barragem de Fundão). Os valores encontrados evidenciam índices de diversidade genética baixos (heterozigosidade observada média= 0,129; heterozigosidade esperada média= 0,541, Riqueza alélica média=2,137; Número de alelos médio=5,45).

Tabela 11: Índices de estruturação genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em 10 locos microssatélites. Valores de Fst par-a-par (a) e Análise de Variância Molecular (AMOVA) (b) para os testes de estruturação genética realizados para 10 locos microssatélites para espécie *Sotalia guianensis*. Foram avaliados 251 indivíduos (Pré e Pós-rompimento da barragem de Fundão). Valores de P podem ser observados entre parênteses, P<0,05.

a) Fst par-a-par		
Estruturação Espacial (Região Norte + Região Central, N= 202 X Região Extremo Sul, N= 49)		
10 locos (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6)		
	Região Norte + Região Central	Região Extremo Sul
Região Norte + Região Central (N=202)	-	
Região Extremo Sul (N=49)	0,043 (0,01)	-
Estruturação Temporal (Pré-rompimento, N= 88 X Pós-rompimento, N=163)		
10 locos (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6)		
	Pré - rompimento	Pós - rompimento
Pré - rompimento (N=88)	-	
Pós - rompimento (N=163)	0,578 (0,000)	-
5 locos (Sgui 003, Sgui 006, Sgui 017, GATA98, MK6)		
	Pré - rompimento	Pós - rompimento
Pré - rompimento (N=88)	-	
Pós - rompimento (N=163)	0,000 (0,999)	-

**b) AMOVA**

***Estruturação Espacial (Região Norte + Região Central, N= 202 X Região Extremo Sul, N= 49)***

**10 locos (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6)**

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	2.556	0.01423 Va	4.36
Dentro das populações	500	156.002	0.31200 Vb	95.64
<b>Total</b>	<b>501</b>	<b>158.558</b>	<b>0.32623</b>	
<b>Fst</b>	<b>0, 043</b>			
<b>P-value</b>	<b>0,010</b>			

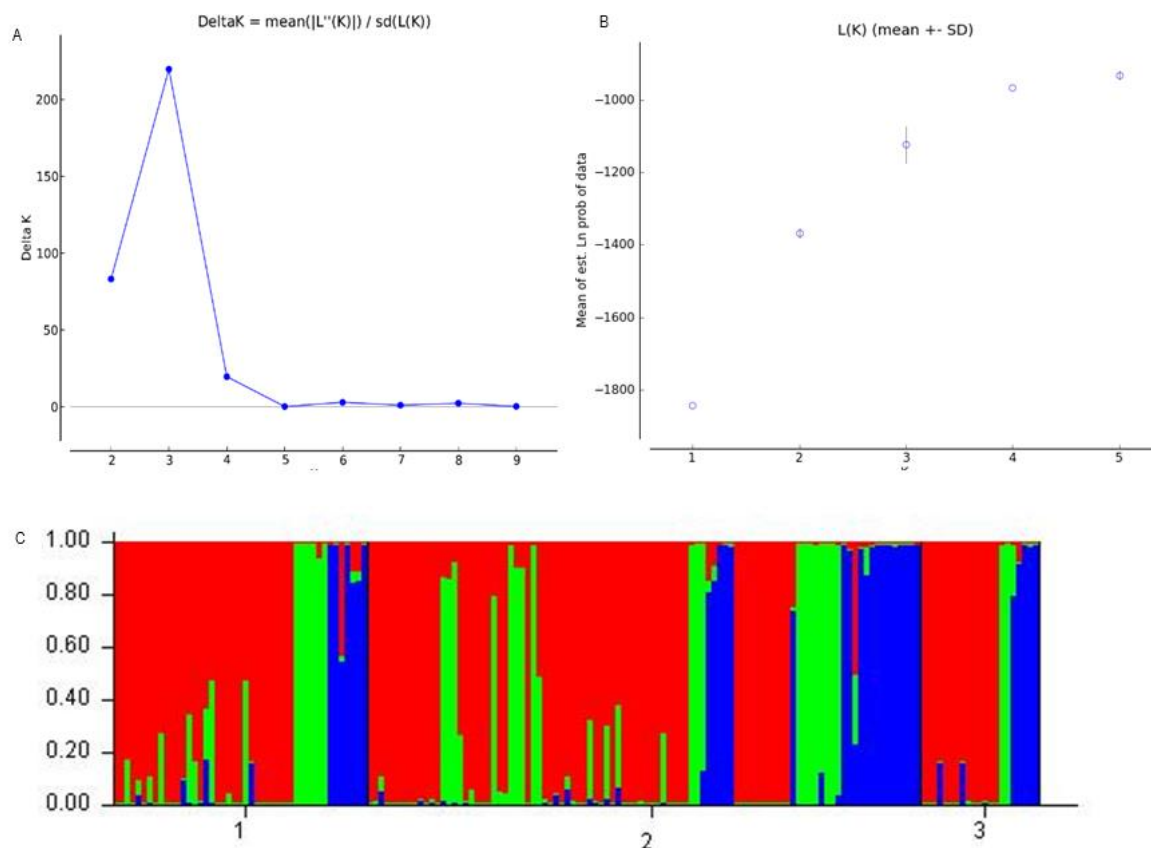
***Estruturação Temporal (Pré-rompimento, N= 88 X Pós-rompimento, N=163)***

**10 locos (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6)**

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	61,194	0,26685 Va	57,81
Dentro das populações	500	97,364	0,19473 Vb	42,19
<b>Total</b>	<b>501</b>	<b>158,558</b>	<b>0,46158</b>	
<b>Fst</b>	<b>0,57813</b>			
<b>P-value</b>	<b>0,000</b>			

Os valores encontrados indicam estruturação genética entre a Região Norte + Região Central e Região Extremo Sul, indicando serem duas populações distintas, e estruturação temporal em Pré-rompimento (N=88) e Pós-rompimento (N=163). No relatório anterior a estruturação espacial em duas populações não havia sido detectada, nesse relatório essa estruturação foi encontrada, no entanto, com valores baixos indicando que ainda há fluxo gênico entre essas populações. Os valores significativos estão destacados em cinza.

Figura 44: Índices de estruturação genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em 10 locos microssatélites. Análise de agrupamento bayesiana inferida com o programa Structure 2,3,2 para três regiões (1: Região Norte; 2: Região Central; 3: Região Extremo Sul) para *Sotalia guianensis* com indivíduos do período Pós-rompimento da barragem de Fundão da costa do Espírito Santo: (A) Delta K do método de Evanno é mostrado entre valores K sucessivos, (B) média a probabilidade log (Lk) é dada para cada K testado, e (C) as probabilidades de atribuição (Q) de indivíduos a agrupamentos de população putativos em K = 3 de acordo com populações de amostragem putativas. Cada cor corresponde a um agrupamento genético distinto, K de 1 a 5, Burning= 2500000 e Cadeias de Markov = 500000.



Apesar do o K indicar três possíveis cluster o gráfico da média a probabilidade log (Lk) indica a presença de somente uma população.

Tabela 12: Índices de estruturação genética mitocondrial para as 72 sequências de D-loop da espécie *Pontoporia blainvillei* (350 bp). Valores de Fst (acima da diagonal) par-a-par (a) e Análise de Variância Molecular (AMOVA) (b). Valores de P podem ser observados entre parênteses, P<0,05.

a) Fst par-a-par				
Estruturação Espacial				
	1. Região Norte	2. Região Central		
1. Região Norte (N=34)	-			
2. Região Central (N=38)	-0,013 (0,999)	-		
Estruturação Temporal				
	1. Pré - rompimento	2. Pós - rompimento		
1. Pré-rompimento (N=29)	-			
2. Pós-rompimento (N=43)	0,035 (0,156)	-		

**b) AMOVA**

**Estruturação Espacial (Região Norte x Região Central)**

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	0,014	-0,00038 Va	-1,40
Dentro das populações	70	1,944	0,02778 Vb	101,4
Total	71	1,958	0,02739	
Fst	-0,013			
P-value	1			

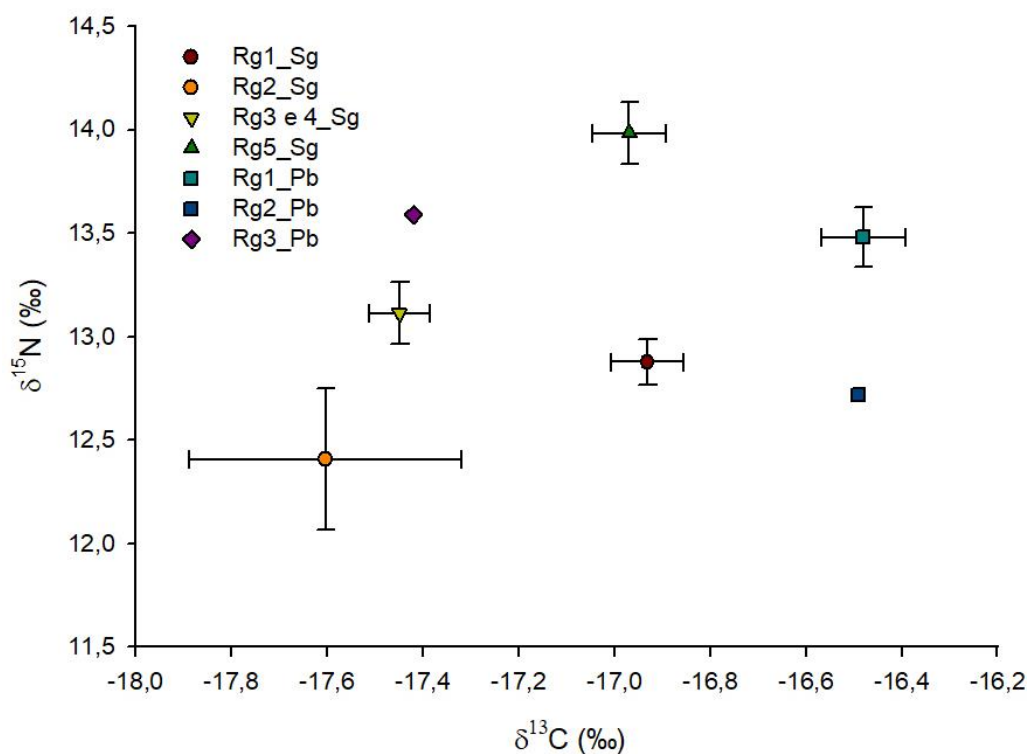
**Estruturação Temporal (Pré X Pós)**

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	0,062	0,00100 Va	3,56
Dentro das populações	70	1,897	0,02709 Vb	96,44
Total	71	1,958	0,0281	
Fst	0,035			
P-value	0,153			

Os valores encontrados foram não significativos indicando ausência de estruturação, ou seja, presença de somente uma população.

### 3.8 RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*

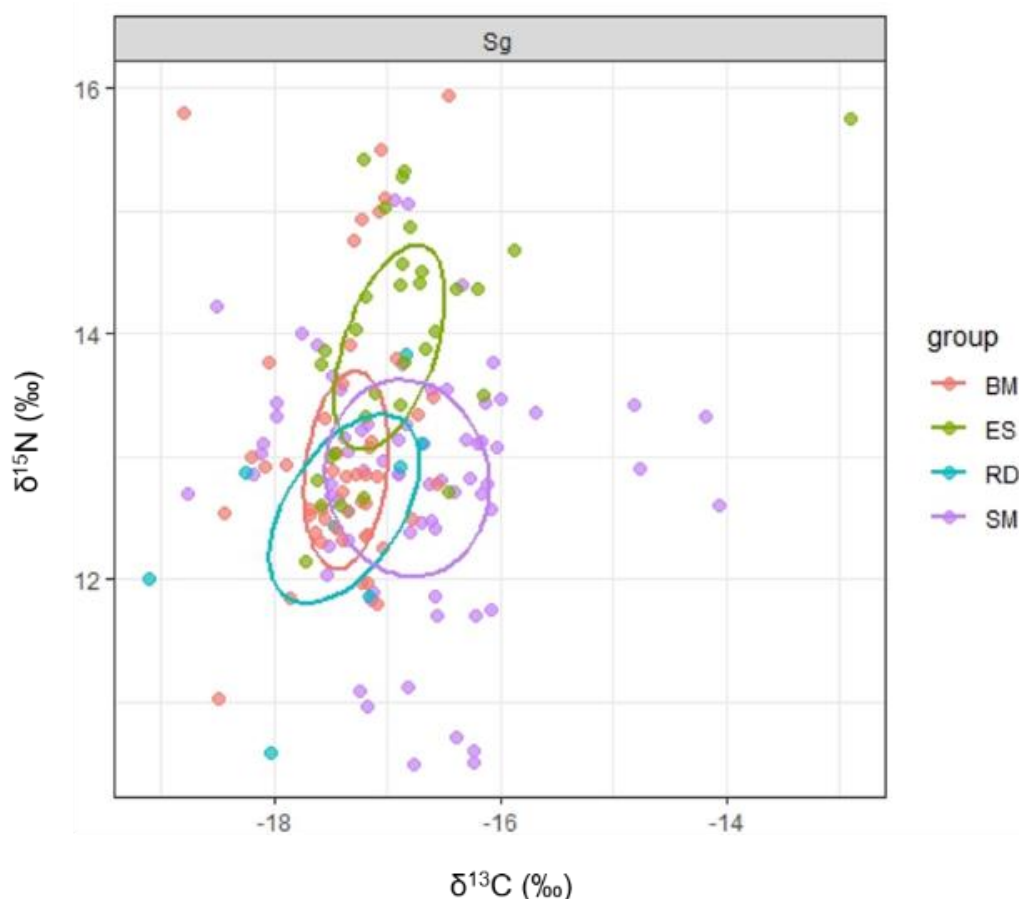
Figura 45: Média e erro padrão das razões isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados ao longo da costa do Espírito Santo ao longo dos quatros anos do monitoramento, agrupados em quatro (1, 2, 3/4 e 5) e três regiões amostrais (1, 2 e 3), respectivamente.



Foram usados apenas os resultados dos indivíduos adultos e juvenis, com base na maturação sexual e idade dentária, e excluindo-se os filhotes, resultando em 159 espécimes de boto-cinza e 15 de toninhas. O gráfico mostra a separação em possíveis grupos ecológicos distintos do boto-cinza. Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  no

boto-cinza foram distintos entre as regiões (ANOVA,  $p < 0,05$ ). O valor  $\delta^{13}\text{C}$  na região 3/4 foi menor do que na região 1 (teste HSD para  $n$  desiguais,  $p = 0,00004$ ), enquanto que o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  na região 5 foi maior em relação à todas as demais (teste HSD para  $n$  desiguais,  $p < 0,005$ .) Para a toninha, foi analisando apenas um indivíduo nas regiões 2 e 3, o que limita a análise da ecologia alimentar da espécie. Os resultados de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das presas em cada local de coleta sugerem que os espécimes de boto-cinza das regiões 1 e 2 tem área de forrageio distinta. Os botos-cinza da região 1 apresentam valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  associados as presas coletadas na região do Rio São Mateus e Rio Ipiranga, enquanto os resultados apontam que os indivíduos da região 2 se alimentam na área sob influência do Rio Doce. Esses resultados sugerem ecologia alimentar e/ou área de forrageamento distintos para o boto-cinza na costa do Espírito Santo, e é possível que essa separação esteja associada, pelo menos em parte da distribuição, a desembocadura e/ou entorno dos rios, com certa fidelidade de sítio dos indivíduos.

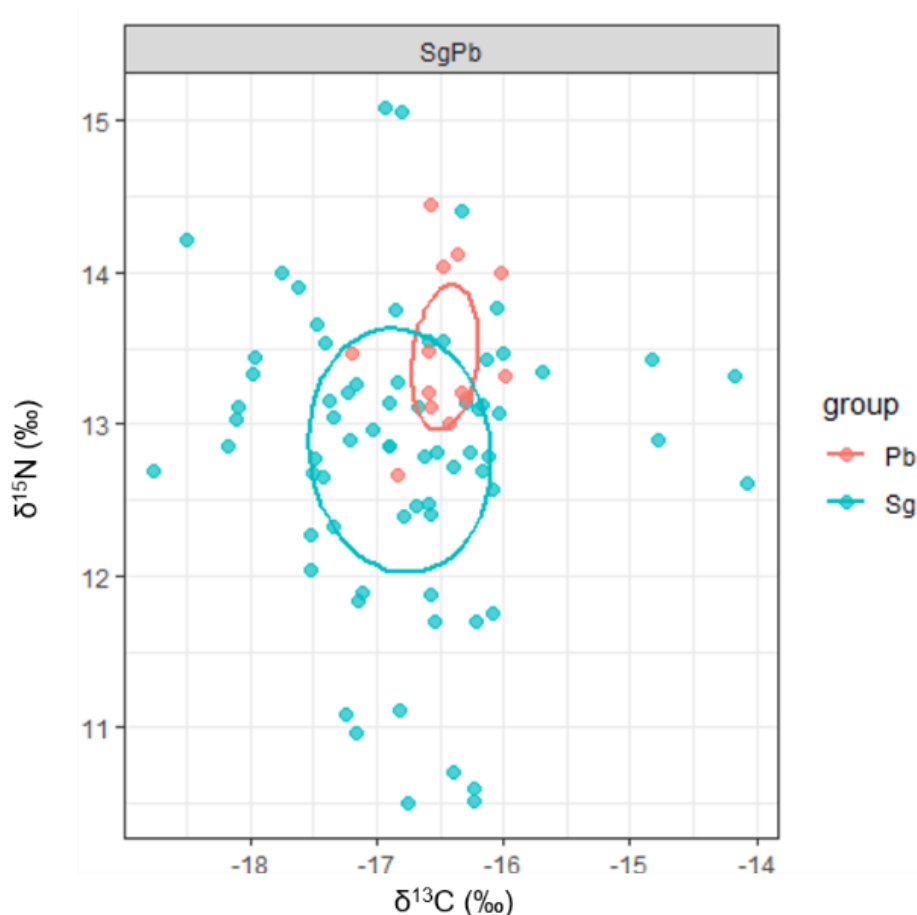
Figura 46: Elipses isotópicas padrão de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  dos botos-cinza coletados ao longo dos quatros anos de monitoramento em cada região amostral.



O nicho isotópico dos animais de cada região, estimado pela SEAc (área da elipse padrão corrigida, utilizando-se 40% dos dados) variou de  $2,7\text{‰}^2$  para a Região 1 – São Mateus (SM);  $2,3\text{‰}^2$  para a região 2 – Rio Doce (RD);  $1,6\text{‰}^2$  para a Região 3/4 – Barra do Riacho e Metropolitana (BM) e  $2,2\text{‰}^2$  para a Região 5 - Extremo Sul (ES). Os resultados sugerem que os indivíduos da região amostral 1 ocupam um nicho ecológico maior em relação aos demais regiões. Houve sobreposição de nicho isotópico entre todas as regiões, com os valores variando entre 7% (entre as regiões 2 e 5) e 37% (entre as regiões 2 e 3/4). Os animais da região 5

(Extremo sul) foram os que apresentaram a menor sobreposição de nicho isotópico em relação as demais áreas. A maior sobreposição de nicho isotópico entre as regiões 2 e 3/4 sugerem que há um compartilhamento na ecologia alimentar e/ou área de forrageamento dos botos-cinza, ainda que parcial. A região 2 é a que possui o menor tamanho amostral ( $n=8$ ), sendo necessário mais amostras para melhor compreensão da ecologia alimentar da espécie na região. Os indivíduos da região 1 apresentaram valor de sobreposição de nicho ecológico de apenas 28 % e 26 % com as regiões 2 e 3/4, respectivamente, sugerindo um certo grau distinção no uso do habitat da espécie na referida região. Os resultados evidenciam possíveis grupos ecológicos distintos na área de estudo, mas com certo grau de compartilhamento na área de forrageio e/ou das espécies de presas que se alimentam. O aumento do número de amostras tem possibilitado o entendimento cada vez mais preciso acerca de como esses animais utilizam a costa do estado do Espírito Santo para alimentação, e a continuidade do estudo é necessário para conhecer o grau de conectividade e fidelidade de sítio em cada região.

Figura 47: Elipses isotópicas padrão de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  dos botos-cinza (Sg) e das toninhas (Pb) coletados na região 1 ao longo dos quatros anos de monitoramento.



As outras regiões não foram consideradas na análise devido ao baixo  $n$  amostral das toninhas ( $n=1$  na região 2 e na região 3). As espécies apresentaram nicho isotópico distinto, com baixa sobreposição (13 %), evidenciando segregação trófica entre o boto-cinza e a toninha na região 1. O boto-cinza apresentou uma maior amplitude e largura de nicho isotópico, enquanto a toninha teve área de nicho isotópico reduzido, evidenciando uma ecologia alimentar mais especialista.

Tabela 13: Valores médio  $\pm$  desvio padrão de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  nos botos-cinza coletados nos quatros anos de monitoramento em cada região amostral ao longo da costa do Espírito Santo.

	ANO 1			ANO 2			ANO 3			ANO 4		
	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Região 1	23	$-17,1 \pm 0,7$	$12,6 \pm 1,1$	13	$-16,7 \pm 0,6$	$13,1 \pm 0,7$	20	$-16,8 \pm 0,6$	$13,0 \pm 1,0$	14	$-17,1 \pm 0,5$	$13,1 \pm 0,6$
Região 2	4	$-18,2 \pm 0,7$	$12,0 \pm 1,0$	1	$-17,5$	$12,4$	3	$-16,2 \pm 0,2$	$12,9 \pm 1,0$	6	$-17,8 \pm 0,5$	$13,2 \pm 1,3$
Região 3/4	6	$-17,4 \pm 0,4$	$13,1 \pm 0,6$	15	$-17,4 \pm 0,5$	$13,2 \pm 1,2$	11	$-17,2 \pm 0,3$	$12,0 \pm 1,1$	9	$-17,5 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,8$
Região 5	7	$-17,1 \pm 0,4$	$13,8 \pm 0,7$	8	$-17,1 \pm 0,4$	$14,1 \pm 0,9$	8	$-16,4 \pm 0,3$	$14,3 \pm 0,8$	11	$-17,2 \pm 0,3$	$13,8 \pm 1,0$
Todos	40	$-17,3 \pm 0,7$	$12,8 \pm 1,1$	37	$-17,1 \pm 0,6$	$13,3 \pm 1,0$	42	$-16,8 \pm 0,6$	$13,2 \pm 1,1$	40	$-17,3 \pm 0,5$	$13,3 \pm 0,9$

Na análise temporal, considerando todas as regiões juntas, foi observada variação significativa na razão isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  entre os valores dos espécimes coletados no Ano 1 ( $-17,3 \pm 0,7 \text{ ‰}$ ) e aqueles no Ano 3 ( $-16,8 \pm 0,6 \text{ ‰}$ ; teste HSD para n desiguais,  $p = 0,004$ ) e, também, entre o Ano 3 ( $-16,8 \pm 0,6 \text{ ‰}$ ) e o Ano 4 ( $-17,3 \pm 0,5 \text{ ‰}$ ; teste HSD para n desiguais,  $p = 0,0006$ ). Essa diferença entre os anos de coleta pode estar associada a variação encontrada nos resultados dos indivíduos coletados na região 5, conforme detalhado a seguir. Não foram encontradas variações nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre os anos. Considerando a análise temporal por região, não foi encontrada variação nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  ao longo dos quatros anos nas regiões 1 e 3/4 (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Já a região 5 apresentou um menor valor de  $\delta^{13}\text{C}$  no Ano 3 ( $-16,4 \pm 0,3 \text{ ‰}$ ) em relação aos demais anos de monitoramento (Teste HSD para n desiguais,  $p < 0,005$ ). Não foi possível testar os espécimes da região 2 devido ao baixo número amostral entre os anos. Para a toninha não foi possível a comparação entre os anos devido ao baixo n amostral.

#### 4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todas as metas previstas no Plano de trabalho foram cumpridas.

#### 5 REFERÊNCIAS

ALONSO, M. B. et al. Natural and anthropogenically-produced brominated compounds in endemic dolphins from Western South Atlantic: Another risk to a vulnerable species. *Environmental Pollution*, v. 170, p. 152–160, 1 nov. 2012.

AZEVEDO, A. F., A. M. OLIVEIRA, S. C. VIANA E M. VAN SLUYS., 2007. Habitat Use by Marine Tucuxis (*Sotalia Guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) In Guanabara Bay, South-Eastern Brazil. *Journal of The Marine*

Biological Association Of The United Kingdom 87:201-205.

AZEVEDO-SILVA, C. E. DE et al. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 2, p. 294–298, 1 fev. 2009.

BANDELT, HJ.; Foster, P.; Rohl, A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p 37-48, 1999.

BARROS, I.P. 2014. Caracterização da contaminação do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) da baía de Guanabara por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2014. 92f. Monografia (Bacharelado em Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Riode Janeiro

BASTOS, W. R. et al. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brasil. *Ciência e Cultura*, v. 50, n. 4, p. 255-260, 1998.

BECAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. *Nobel*, 1976.

BÉRUBÉ, M.; PASBØLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, v. 5, n. 2, p. 283-287, 1996.

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

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

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

COVACI, A.; KOPPEN, G.; Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 yearsold women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. *Chemosphere*, v. 48, p.827-832, 2002.

CREMER M. J., PINHEIRO, P. C., SIMOES-LOPES, P. C., 2012. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 102 (2), 131-137.

DAURA-JORGE, F. G., L. L. WEDEKIN, V. Q. PIACENTINI E P. C. SIMÕES-LOPES., 2005. Seasonal and Daily Patterns Of Group Size, Cohesion And Activity Of The Estuarine Dolphin,

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

- DI BENEDITTO, A. P. M., SANTOS, M. V. B., VIDAL, JR M. V., 2009. Comparison between the diet of two dolphins from south-eastern Brazil: proximate-composition and caloric value of preyspecies. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 89, 903-905.
- DORNELES, P. R. et al. Cadmium concentration in Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from South Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, n. 3, p. 179–186, 2007.
- ELLISON, A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letter* 7:509–520. Environmental Protection Agency (EPA).
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p.564-567, 2010.
- FÉLIX, G.B.V. *Ocorrência e captura accidental de golfinhos no extremo norte do litoral do Espírito Santo*. 2011. 54 p. Dissertação de monografia em Ciências Biológicas Bacharel, Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES. 2011.
- GERACI, J. R., AND V. J. LOUNSBURY. 2005. Marine mammals ashore: A field guide for strandings. *Texas A&M Sea Grant Publication*, Galveston, TX.
- GERACI, J.R. and LOUNSBURY, V.J. Marine mammals ashore: a field guide for strandings. National Aquarium in Baltimore, 2005.
- GHISOLFI, R. D., DA SILVA, M. P., DOS SANTOS, F. T., SERVINO, R. N., CIRANO, M., & THOMPSON, F. L. Physical forcing mechanisms controlling the variability of chlorophyll-a over the Royal-Charlotte and Abrolhos Banks—Eastern Brazilian Shelf. *PloS one*, 10(2), e0117082. <https://doi.org/10.1371/journal.p>, 2015.
- GIRUNDI, I. S., *Dieta de Sotalia guianensis (VAN BÉNÉDEN, 1864) (Cetácea, Delphinidae), no estado do Espírito Santo, Brasil*. Monografia de graduação. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- GOUDET, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.
- Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from southeastern Brazil: new items and a knowledge review. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 92, 1723-1733, 2012.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T. AND RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9 pp, 2001.
- HOHN, A.A.; CHIVERS, S.J.; BARLOW, J. Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins *Stenella attenuata*, in the eastern tropical pacific. *Marine Mammals Science*, v.1, n.4, p. 273-293, 1985.

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

KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 1099–1106, 2007.

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

LAILSON-BRITO, J. et al. Mercury-Selenium relationships in liver of Guiana Dolphin: The possible role of Kupffer cells in the detoxification process by Tiemannite formation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012

LAILSON-BRITO, J.; DORNELES, P.R.; AZEVEDO-SILVA, C.E.; AZEVEDO, A.F.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.; VIDAL, L.; MALM, O.; TORRES, J. PCB, DDT and HCB in blubber of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from southeastern brazilian coast. *Organohalogen Compounds*, v. 69, p. 1748-1750, 2007.

LOPES, X. M., SILVA, E., BASSOI, M., SANTOS, R. A.; SANTOS, M. C. O. Feeding habits of

MALM, O. Utilização do acessório de vapor frio para investigação de mercúrio em amostras ambientais por espectrofotometria de absorção atômica. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 41, p. 88-92, 1989.

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

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

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

PANSARD K. C. A., GURGEL H. C. B., ANDRADE L. D. A., YAMAMOTO M. E. Feeding

ecologyof the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) on the coast of the Rio Grande do Norte, Brazil. *Mar. Mamm. Sci.* 27, 673-687, 2010.

PARNELL, A.C., INGER, R., BEARHOP, S. & JACKSON, A.L. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS ONE* 5:e9672.

PERRIN, W. F.; G. P. DONOVAN. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth. 1984.

PERRIN, W.; MYRICK, A. C. *Age determination of toothed whales and sirenians*. Cambridge ([Red House Station Rd. Histon Cambridge CB4 4NP]): International Whaling Commission, 1980.

PETERSON, B. J.; FRY, B. *Stable Isotopes in Ecosystem studies*. Attn. Rev. Ecol. Syst. [s.l: s.n.].Disponível em: <[www.annualreviews.org/aronline](http://www.annualreviews.org/aronline)>.

PINEDO, M. C.; HOHN, A. A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for a precision in the age estimation. *Marine Mammal Science*, v. 16, n. 1, p. 1-27, 2000.

POST, D.M. et al. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152:179-189.

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

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

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248–249, 1995.

RODRIGUES, V. L. A., *Dieta e ecologia alimentar do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetartiodactyla: Delphinidae), na região do Banco dos Abrolhos, costa central do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for indowsand Linux. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 103-106, 2008.

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

SANTOS-NETO, E. B. et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. *Science of The Total Environment*, v. 472, p. 194–203, 15 fev. 2014.

SCHNEIDER, K., 1999. Behaviour and Ecology of Bottlenose Dolphins in Doubtful Sound,

Fiordland, New Zealand. PhD thesis. University of Otago, Dunedin, New Zealand.

*Sotalia Guianensis* (P.J. Van Bénédén) (Cetacea, Delphinidae), In Southern Brazil. *Revista Brasileira De Zoologia* 22:1014-1021.

TAMURA, K ET AL. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 535-538, 2004.

VOORSPOELS, S.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Polybrominated Diphenyl Ethers in Marine Species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, Profiles, and Distribution. *Environmental Science & Technology*, v.37, p. 4348-4357, 2003.

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