

**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- 44/ NOV 23

RSE2023 PMBA/Fest

Vitória,

Novembro de 2023

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL.....	3
2	RESULTADOS DOS INDICADORES.....	3
2.1	TAXA DE ENCALHE POR SAZONALIDADE DE OCORRÊNCIAS DE <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i>	4
2.2	TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i> NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO.....	5
2.3	TAXA DE ÓBITO PARA <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i> DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE	11
2.4	SAÚDE DOS CETÁCEOS.....	14
2.5	ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i>	19
2.6	ESTRUTURA ETÁRIA E SEXUAL DAS POPULAÇÕES DE <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i>	43
2.7	ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS.....	46
2.8	RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE <i>Sotalia guianensis</i> E <i>Pontoporia blainvillei</i>	59
3	REFERÊNCIAS.....	63

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 continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) **MS – Malha e Frequência amostral**, onde as diferentes malhas e frequências amostrais são apresentadas nas abas “Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Histórico Frequências” e 2) **MS – Mapas das malhas amostrais**, com a espacialização histórica referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais 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, à exceção do grupo da Ecotoxicologia, que iniciou a amostragem referente ao Novo Ciclo em janeiro de 2023.

2 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 – março/2023) na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte aos gestores ambientais. A partir destes indicadores, pode-se identificar os impactos com relação direta ou indireta ao rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

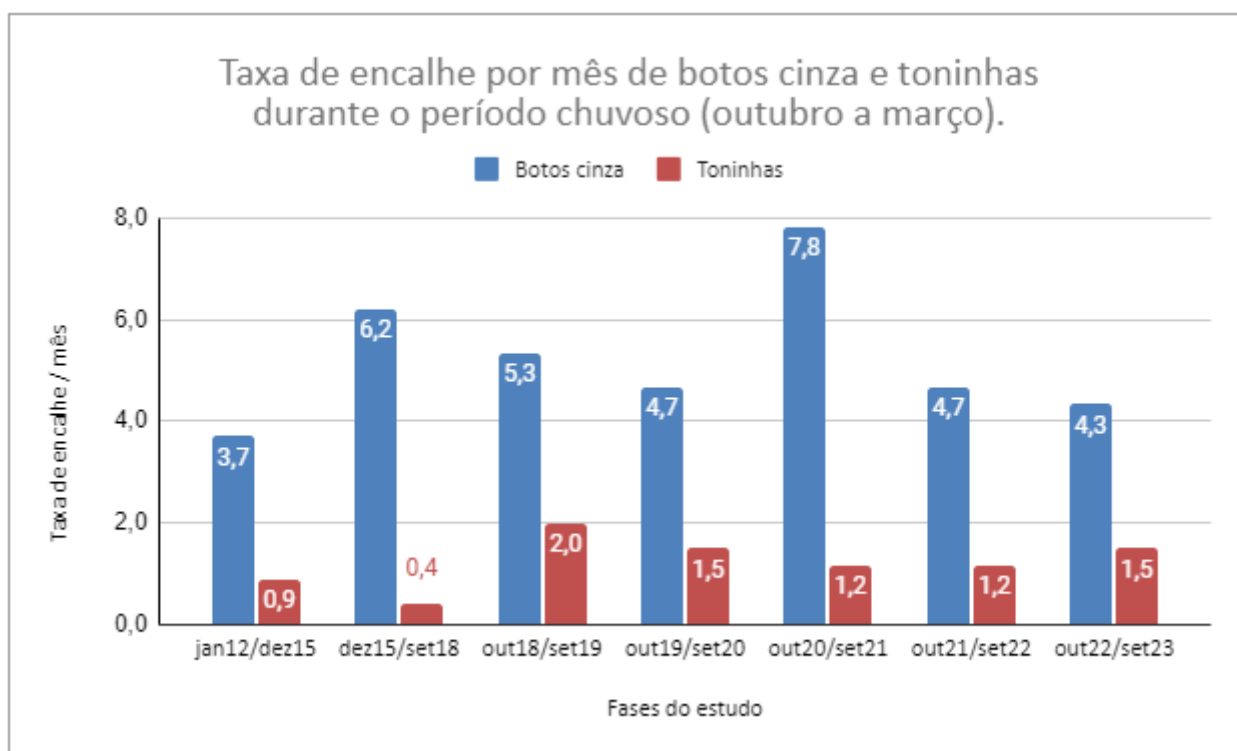
Desde o início do PMBA/Fest, para as análises de isótopos estáveis, idade e reprodução e de contaminantes em cetáceos, a área de coleta do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) foi subdividida em cinco regiões (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), com o intuito de investigar o uso do habitat e possível ocorrência de populações ecológicas distintas da espécie ao longo da costa do estado do Espírito Santo. Ao longo do monitoramento, não foi verificada diferença nos resultados entre os indivíduos coletados nas regiões 3 e 4 em relação a área de forrageamento e ecologia alimentar, apontando que eles pertencem a um mesmo grupo ecológico. Sendo assim, a partir do presente relatório, os dados dessas duas regiões serão tratados de forma conjunta, identificado como: “região 3/4” ou “Barra do Riacho e Metropolitana”.

Os indicadores do PMBA/Fest vêm se consolidando ao longo do monitoramento e, seguindo a proposta estabelecida desde o Relatório Anual de 2022 (RA2022), a apresentação dos resultados será exclusivamente

a partir da apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva como se segue:

2.1 TAXA DE ENCALHE POR SAZONALIDADE DE OCORRÊNCIAS DE *Sotalia guianensis* E *Pontoporia blainvillei*.

Figura 1: Taxa de encalhes/mês de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ao longo do período chuvoso. O período referente a fase pré-rompimento compreende dados desde primeiro de janeiro de 2022 até 22 de dezembro de 2015. A fase Pós-rompimento compreende dados desde 23 de dezembro de 2015 até 30 de setembro de 2018. Os demais períodos do monitoramento do PMBA compreendem a intervalos de seis meses correspondentes aos períodos chuvosos subsequentes



O número de encalhes de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*) durante o período chuvoso do Ano 5 não mostrou relevância estatística em comparação com a média observada nas fases anteriores ao PMBA (Anos 1 a 4), tampouco com as fases pré-rompimento e pré-PMBA.

Quadro 1: Lista de espécies com ocorrência de encalhe durante as fases de monitoramento (desde 01 de janeiro de 2012 a 31 de março de 2023), espécies-alvo estão destacadas em cinza

Espécies	Pré-rompimento	Pré- PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Balaenoptera acutorostrata			1					1
Balaenopterídeo			3					3
Delfínídeo							1	1
Kogia sp.				1				1
Megaptera novaeangliae			3		1		3	7
Orcinus orca							1	1
Peponocephala electra				1				1
Physeter macrocephalus				1				1

Espécies	Pré-rompimento	Pré- PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
<i>Pontoporia blainvillei</i>	26 [6.8]	7 [2.6]	12	9	7	7	9	77
<i>Sotalia guianensis</i>	101 [26.4]	115 [42.0]	32	28	47	28	26	377
<i>Steno bredanensis</i>	1 [0.3]		1				1	3
<i>Tursiops truncatus</i>							2	2
Total	128 [33.4]	122 [44.6]	52	40	55	35	43	475

As células destacadas em cinza na lista, identificam as espécies-chave de cetáceos costeiros que são consideradas mais suscetíveis aos impactos decorrentes do rompimento da barragem. Os valores inseridos entre colchetes representam as médias anuais correspondentes aos períodos chuvosos, servindo como indicativo para a análise desses eventos. Foram registradas 43 ocorrências de encalhes, com registros de sete espécies de cetáceos, sendo as mais comuns os botos-cinza (*Sotalia guianensis*) que representaram 60,5% (n=26) dos casos, e as toninhas (*Pontoporia blainvillei*) 20,9% (n=9).

2.2 TAXA DE DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE ENCALHES DE *Sotalia guianensis* E *Pontoporia blainvillei* NA COSTA DO ESPÍRITO SANTO

Quadro 2: Frequência da distribuição de encalhes de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) ao longo dos meses nas fases de monitoramento correspondente ao período chuvoso que vai de de 2022 a março de 2023. As células destacadas em cinza indicam os meses com maior frequência de registros de encalhes.

Botos-cinza	Pré rompimento	Pré PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Outubro	16,8%	20,9%	9,4%	14,3%	19,1%	17,9%	23,1%	18,0%
Novembro	23,8%	13,0%	3,1%	17,9%	10,6%	7,1%	7,7%	14,3%
Dezembro	8,9%	19,1%	18,8%	10,7%	8,5%	28,6%		13,8%
Janeiro	9,9%	13,9%	25,0%	17,9%	31,9%	7,1%	7,7%	15,4%
Fevereiro	21,8%	9,6%	15,6%	21,4%	12,8%	17,9%	30,8%	16,7%
Março	18,8%	23,5%	28,1%	17,9%	17,0%	21,4%	30,8%	21,8%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
N. amostral	101	115	32	28	47	28	26	377

No Ano 5, os meses com maior frequência de encalhes foram fevereiro e março, apresentando 30,8%, resultado similar aos anos anteriores. Porém, em dezembro não apresentou nenhum registro, sendo que no Ano 4 foi o mês de maior frequência, e nos anos anteriores uma média de 13,2% dos encalhes.

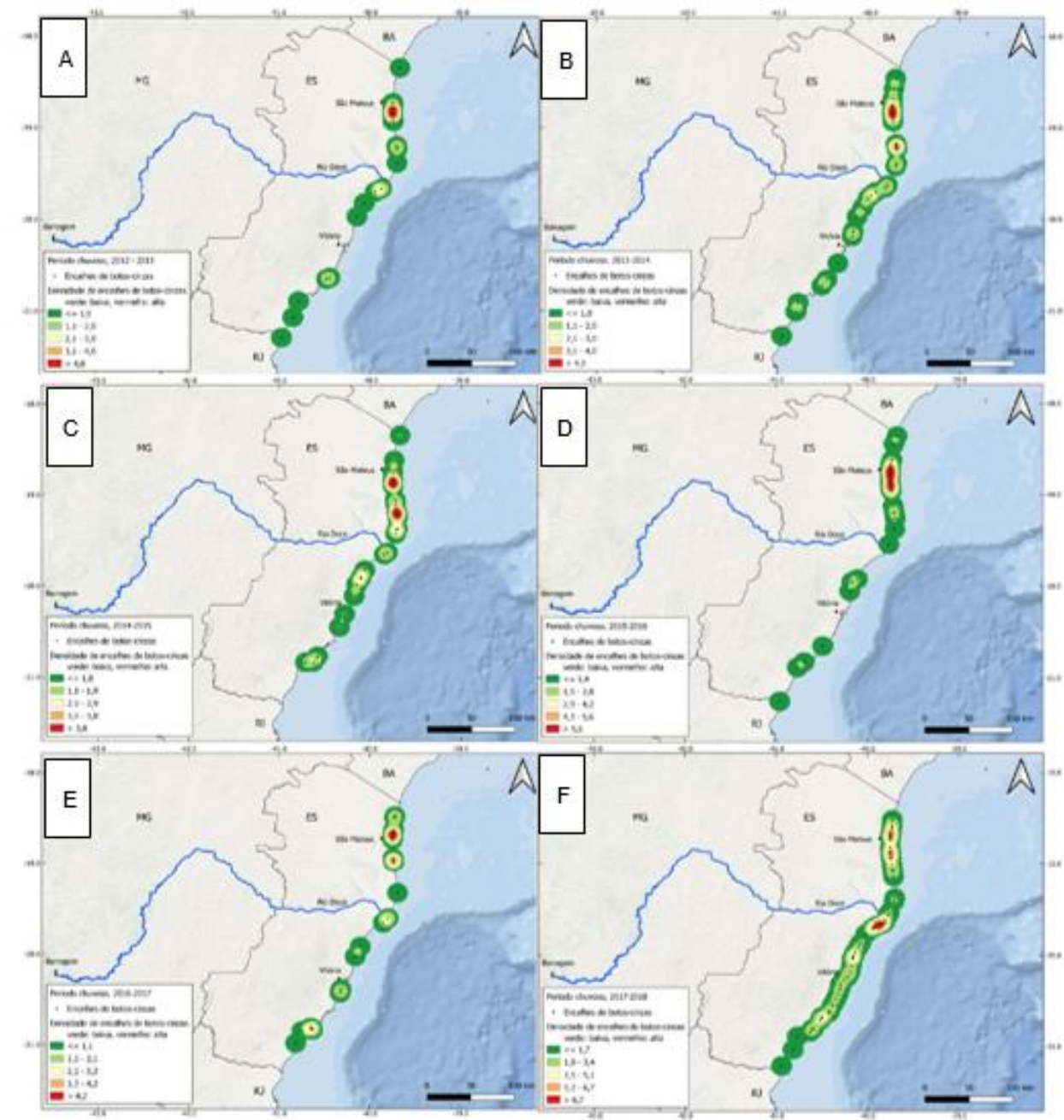
Quadro 3: Frequência da distribuição de encalhes de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ao longo dos meses nas fases de monitoramento correspondente ao período chuvoso que vai de outubro de 2022 a março de 2023. As células destacadas em cinza indicam os meses com maior frequência de registros de encalhes.

Toninhas	Pré rompimento	Pré PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Outubro	3,8%	42,9%		11,1%	14,3%	14,3%		9,1%
Novembro	11,5%		25,0%		14,3%	14,3%	22,2%	13,0%
Dezembro	3,8%	14,3%	16,7%	33,3%	14,3%	42,9%	11,1%	15,6%
Janeiro	38,5%	14,3%	33,3%	44,4%	42,9%		22,2%	31,2%

Toninhas	Pré rompimento	Pré PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Fevereiro	30,8%	14,3%	8,3%	11,1%		14,3%	22,2%	18,2%
Março	11,5%	14,3%	16,7%		14,3%	14,3%	22,2%	13,0%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
N. Amostras	26	7	12	9	7	7	9	77

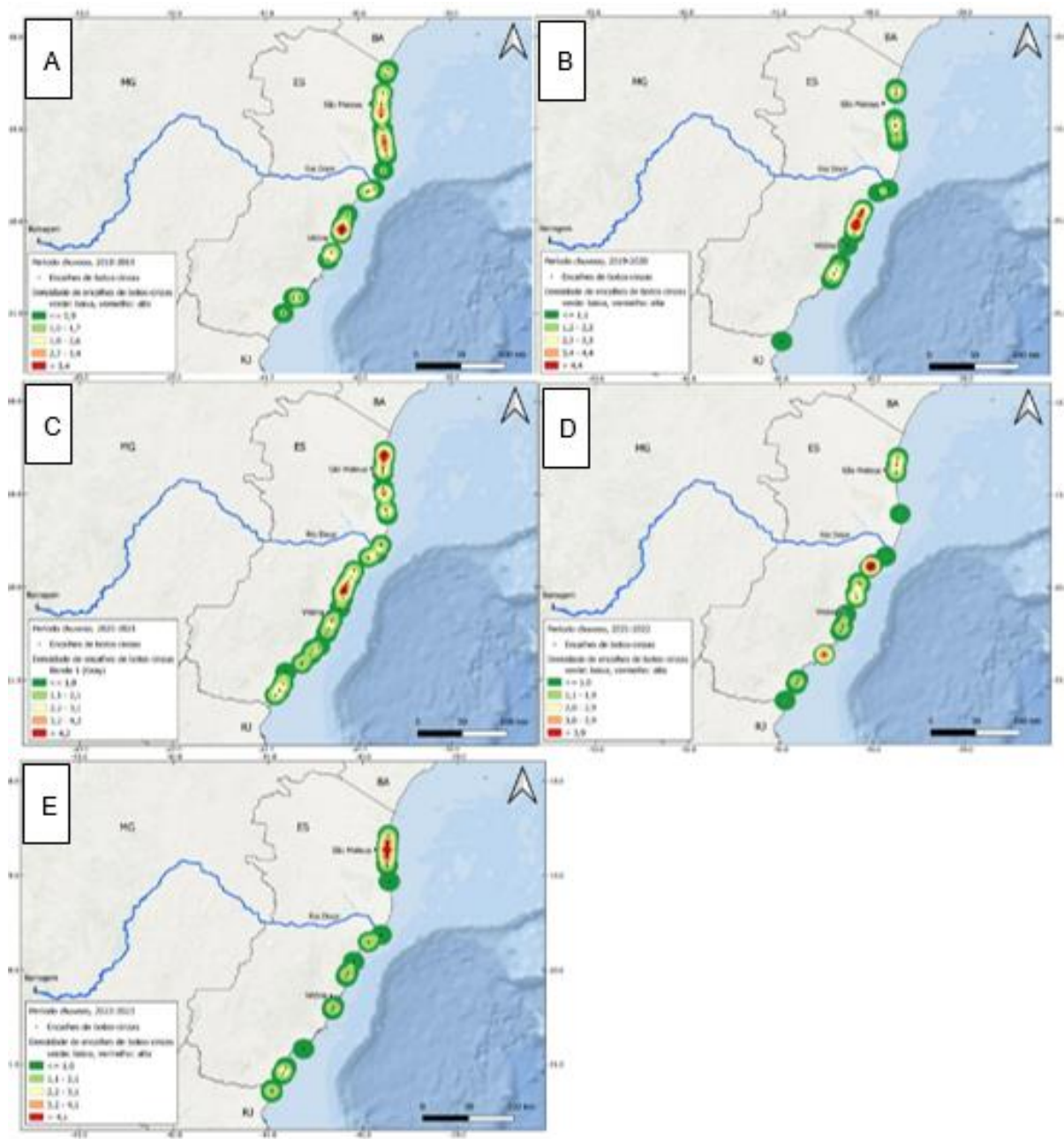
Os resultados do Ano 5 apresentaram uma distribuição homogênea (22,2%) ao longo dos meses, com exceção em outubro (sem registro) e dezembro (11%), sendo nos anos anteriores os períodos com maior percentual de encalhes.

Figura 2: Mapas da área de estudo mostrando os registros e densidade de Kernel dos encalhes de botos-cinzas (*Sotalia guianensis*), no período chuvoso, entre os anos de 2012 a 2018. A, Pré-rompimento: 2012 a 2013. B, Pré-rompimento: 2013 a 2014. C, Pré-rompimento: 2014 a 2015. D, Pré-PMBA: 2015 a 2016. E, Pós-rompimento: 2016 a 2017. F, Pós-rompimento: 2017 a 2018. Imagens realizadas com o software Qgis, Fontes: Esri, GEBCO, NOAA, Geográfica Nacional, DeLorme, HERE, Geonames.org e outros contribuintes



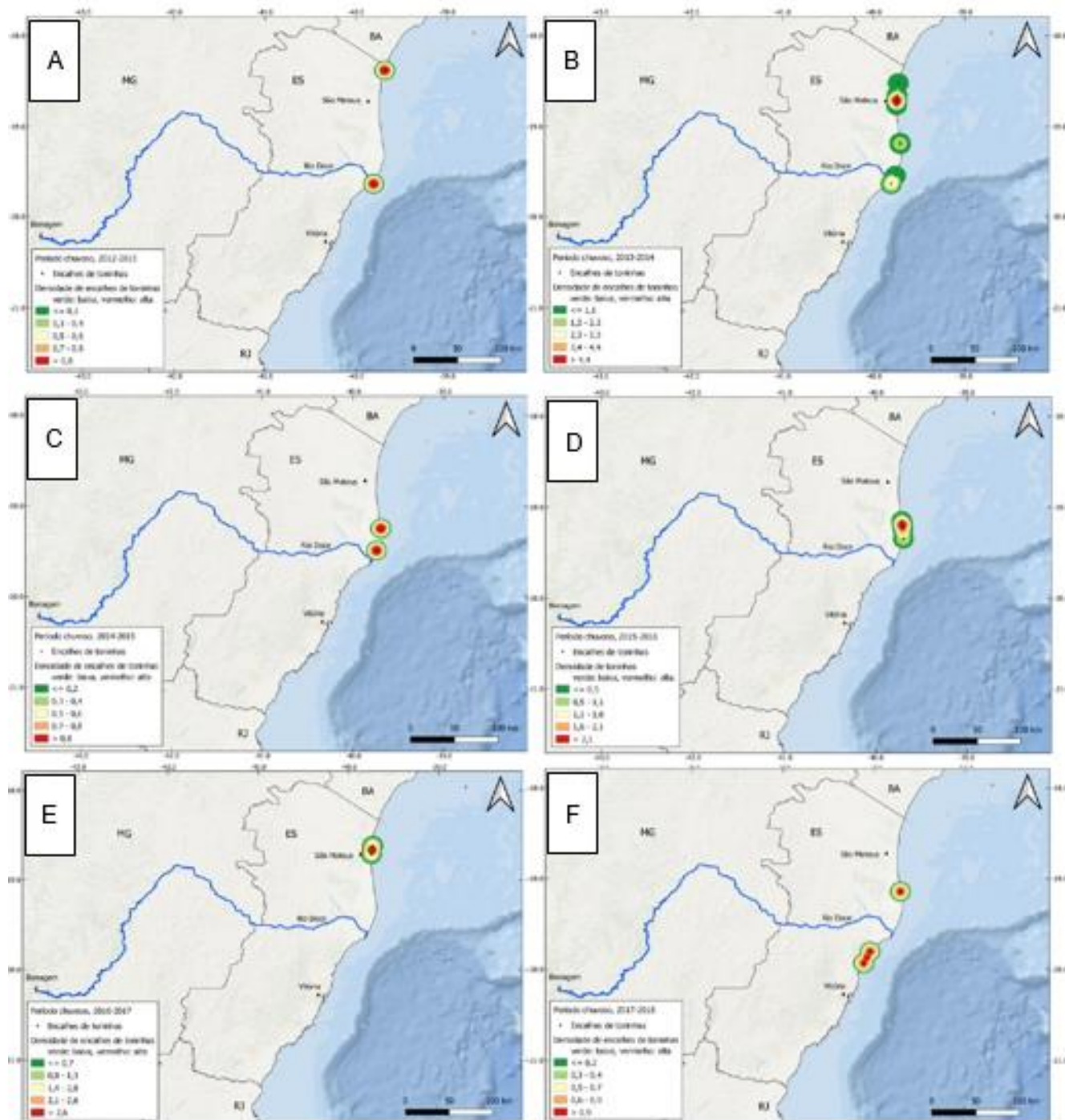
Nas fases pré-rompimento (A, B, C,) e pré-PMBA (D e E), a distribuição dos encalhes era mais evidente na região ao Norte do Rio Doce, com altas concentrações. Entre os anos 2017 e 2018 (F), a distribuição dos encalhes se concentrou mais ao Sul do Rio Doce e mais distribuída ao longo da costa.

Figura 3: Mapas da área de estudo mostrando os registros e densidade de Kernel dos encalhes de botos-cinzas (*Sotalia guianensis*) no período chuvoso durante as fases do monitoramento do PMBA, entre os anos de 2018 a 2023. A: Ano 1 (2018 a 2019). B: Ano 2 (2019 a 2020). C: Ano 3 (2020 a 2021). D: Ano 4 (2021 a 2022). E: Ano 5 (2022 a 2023). Imagens realizadas com o software Qgis, Fontes: Esri, GEBCO, NOAA, Geográfica Nacional, DeLorme, HERE, Geonames.org e outros contribuintes



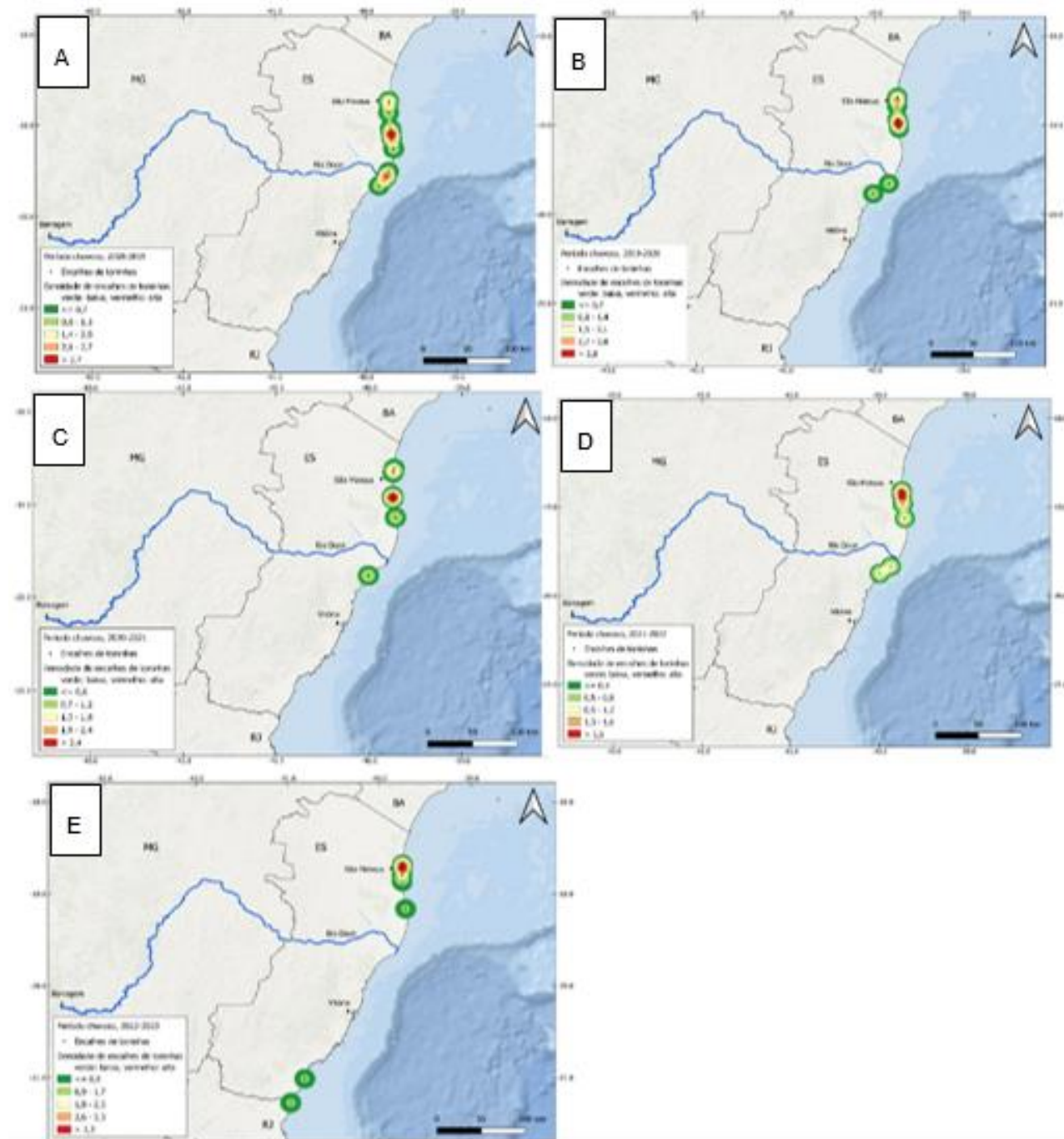
A partir de 2017 até 2021 (Ano 3) houve concentração de encalhes abaixo do Rio Doce e mais ao Sul da costa (A) Ano 1 (2018 a 2019), (B) Ano 2 (2019 a 2020), (C) Ano 3 (2020 a 2021), (D) Ano 4 (2021 a 2022). No Ano 5 a densidade de encalhes aumentou novamente ao Norte da costa (E: Ano 5, 2022 a 2023).

Figura 4: Mapas da área de estudo mostrando os registros e densidade de Kernel dos encalhes de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) no período chuvoso, entre os anos de 2012 a 2018. A, Pré-rompimento: 2012 a 2013. B, Pré-rompimento: 2013 a 2014. C, Pré-rompimento: 2014 a 2015. D, Pré-PMBA: 2015 a 2016. E, Pré-PMBA (2016 a 2017). F, Pré-PMBA (2017 a 2018). Imagens realizadas com o software Qgis, Fontes: Esri, GEBCO, NOAA, Geográfica Nacional, DeLorme, HERE, Geonames.org e outros contribuintes



Nas fases pré-rompimento: A (2012 a 2013), B (2013 a 2014), C (2014 a 2015) e fase pré-PMBA: D (2015 a 2016), E (2016 a 2017) a densidade de encalhes de toninhas se concentravam ao Norte do Rio Doce. E no final da fase pré-PMBA: F (2017 a 2018) a concentração de encalhes se distribuiu nos extremos Norte e Sul do Rio Doce.

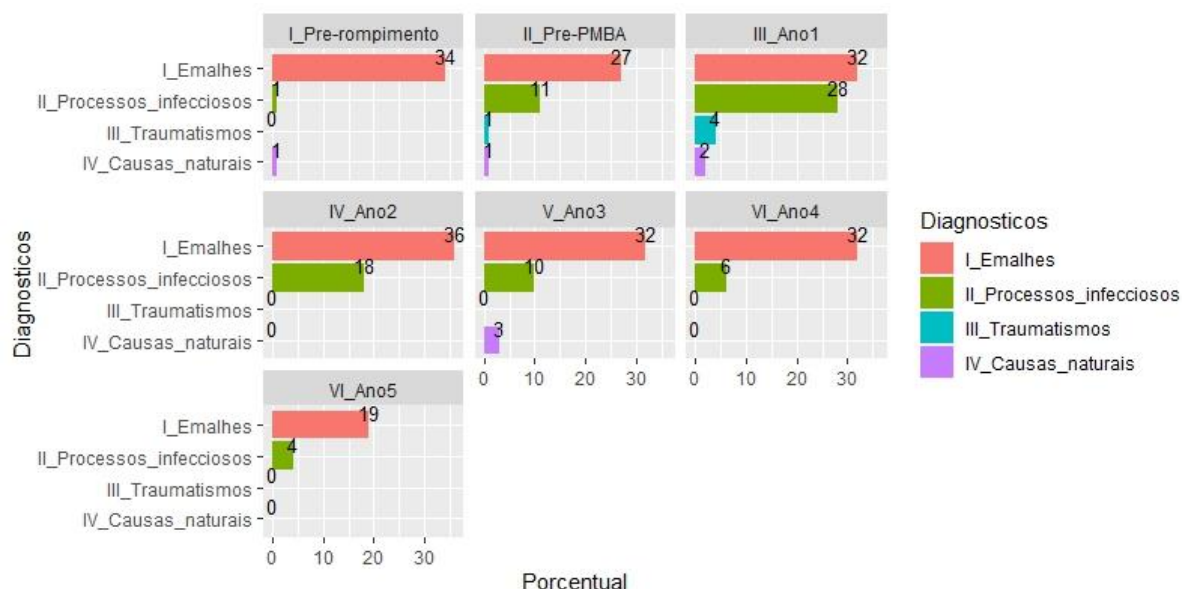
Figura 5: Mapas da área de estudo mostrando os registros e densidade de Kernel dos encalhes de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) no período chuvoso durante as fases do monitoramento do PMBA, entre os anos de 2018 a 2023. A: Ano 1 (2018 a 2019). B: Ano 2 (2019 a 2020). C: Ano 3 (2020 a 2021). D: Ano 4 (2021 a 2022). E: Ano 5 (2022 a 2023). Imagens realizadas com o software Qgis, Fontes: Esri, GEBCO, NOAA, Geográfica Nacional, DeLorme, HERE, Geonames.org e outros contribuintes.



A concentração de encalhes de toninhas aumentou ao Sul do Rio Doce ao longo dos anos de PMBA e no Ano 5 (mapa E) apresentou ocorrência ao Sul da costa do ES, indicando a possibilidade de a espécie estar presente nesta região ou destes animais pertencerem à população do RJ.

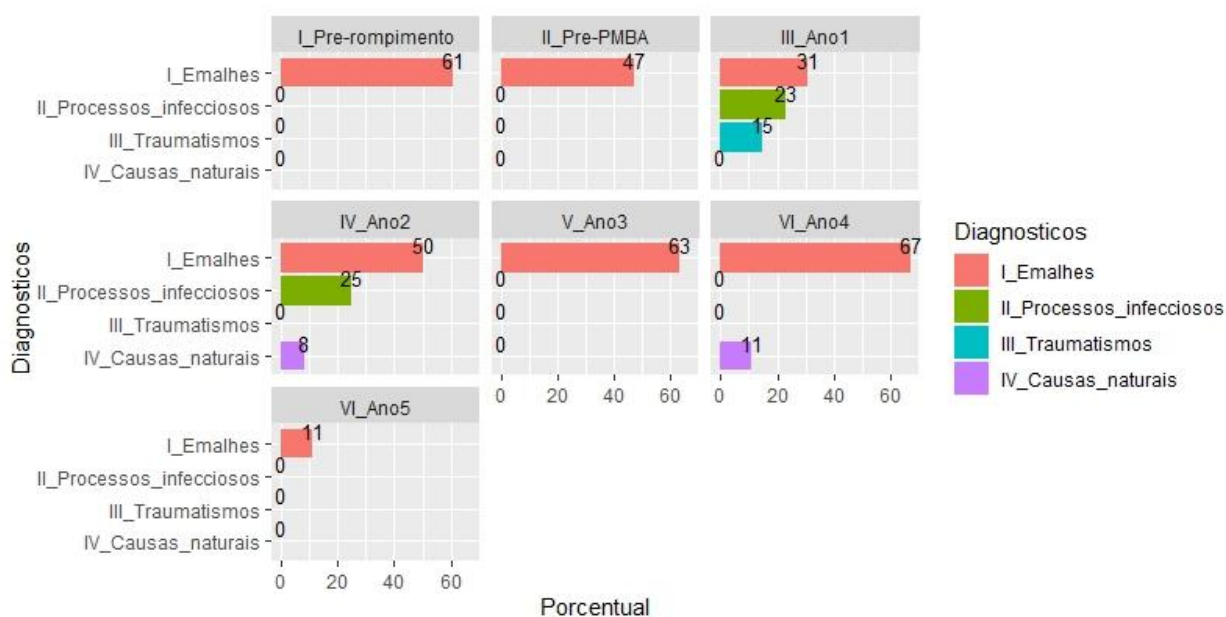
2.3 TAXA DE ÓBITO PARA *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI* DO ESPÍRITO SANTO POR DIAGNÓSTICO DA CAUSA DA MORTE

Figura 6: Percentual de diagnósticos conclusivos para botos-cinza (*Sotalia guianensis*) ao longo das fases de monitoramento (período chuvoso)



Para os botos-cinza, foi possível observar que os emalhes permaneceram como principal ameaça (incidências de 19%). A segunda causa mais frequente são os processos infecciosos, representando 4% dos óbitos, havendo diminuição dos casos do Ano 1 ao Ano 5.

Figura 7: Percentual de diagnósticos conclusivos para toninhas (*Pontoporia blainvillei*) ao longo das fases de monitoramento (período chuvoso)



Para as toninhas, os emalhes permaneceram como principal ameaça, com incidências de 11% dos casos de óbitos e sem detecção de outras causas. Esses resultados podem ter relação com o estado de decomposição que esses animais são encontrados, ou sugerem que realmente tenha diminuído a ocorrência de outras causas.

Quadro 4: Código de decomposição dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhados, aplicado nas fases de monitoramento correspondentes ao período chuvoso, no âmbito do Monitoramento do PMBA/Fest. Códigos de decomposição: COD I (vivo); COD II (recém-morto, até 24 horas); COD III (decomposição inicial); COD IV (decomposição avançada); e COD V (decomposição final). As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência

Botos	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
I	-	1%	-	-	-	-	4%	1%
II	11%	5%	9%	7%	4%	11%	-	7%
III	29%	29%	16%	7%	11%	18%	12%	22%
IV	52%	55%	59%	64%	70%	61%	73%	59%
V	8%	10%	16%	21%	15%	11%	12%	12%
Total geral	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para os botos-cinza, os códigos de decomposição com maior frequência foram os códigos IV e V, presentes em 85% dos botos-cinzas examinados, destacados em cinza.

Quadro 5: Código de decomposição das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encalhadas, aplicado nas fases de monitoramento correspondentes ao período chuvoso, no âmbito do Monitoramento do PMBA/Fest. Códigos de decomposição: COD I (vivo); COD II (recém-morto, até 24 horas); COD III (decomposição inicial); COD IV (decomposição avançada); e COD V (decomposição final). As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
COD I	-	-	-	-	-	-	-	-
COD II	19%	14%	-	-	-	-	-	8%
COD III	19%	14%	42%	11%	14%	14%	11%	19%
COD IV	42%	29%	50%	78%	43%	86%	78%	55%
COD V	19%	43%	8%	11%	43%	-	11%	18%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para as toninhas, os códigos de decomposição com maior frequência que foram os códigos IV e V, presentes em 89% das toninhas examinadas, destacados em cinza.

Quadro 6: Percentual de sexo dos botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhados nas fases de monitoramento correspondentes ao período chuvoso. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência.

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Macho	42%	41%	72%	54%	47%	46%	50%	46%
Fêmea	18%	21%	28%	25%	43%	39%	31%	26%
Indeterminado	41%	38%	-	21%	11%	14%	19%	28%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Razão M/F*	2.33	1.96	2.56	2.14	1.10	1.18	1.63	1.88

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

Para os botos-cinza, a razão sexual entre machos e fêmeas foi de 1,63 e a porcentagem de sexo indefinido representou 19% dos botos examinados.

Quadro 7: Percentual de sexo das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encalhadas nas fases de monitoramento correspondentes ao período chuvoso. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência.

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Macho	19%	29%	50%	33%	29%	29%	11%	27%
Fêmea	27%	14%	33%	33%	-	-	56%	26%
Indeterminado	54%	57%	17%	33%	71%	71%	33%	47%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Razão M/F*	0.71	2.00	1.50	1.00	DIV/0**	DIV/0**	0.20	1.05

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

Para as toninhas, a razão sexual entre machos e fêmeas foi de 0,20 para toninhas, indicando uma frequência cinco vezes maior de encalhes de toninhas fêmeas em relação aos machos. E o percentual de sexo indeterminado representou 33% das toninhas examinadas.

Quadro 8: Percentual de faixa etária de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhados nas fases de monitoramento durante o período chuvoso. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência

Botos-cinza	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Filhote	4%	7%	19%	11%	9%	7%	4%	7%
Juvenil	35%	47%	28%	21%	34%	21%	27%	35%
Adulta	54%	40%	53%	64%	55%	68%	58%	52%
Indeterminada	7%	6%	-	4%	2%	4%	12%	5%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para os botos-cinza, os animais adultos com 58% de frequência apresentaram com maior registro no Ano 5, resultado semelhante aos anos anteriores.

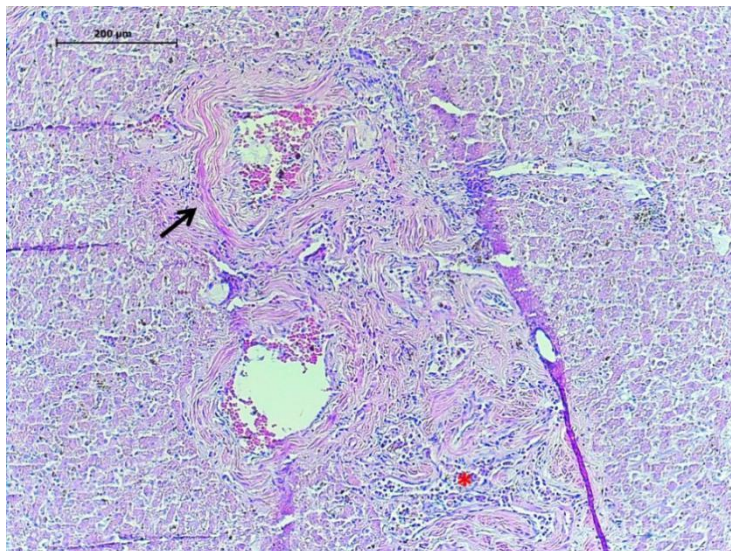
Quadro 9: Percentual de faixa etária de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encalhadas nas fases de monitoramento durante o período chuvoso. As células destacadas em cinza indicam os casos com maior frequência

Toninhas	Pré-rompimento	Pré-PMBA	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Filhote	12%	29%	25%	11%	29%	29%	11%	18%
Juvenil	62%	29%	67%	11%	57%	57%	44%	51%
Adulta	15%	29%	8%	78%	14%	14%	33%	25%
Indeterminada	12%	14%	-	-	-	-	11%	6%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para as toninhas, os animais juvenis com 44% de frequência apresentaram maior registro no Ano 5, resultado semelhante aos anos anteriores.

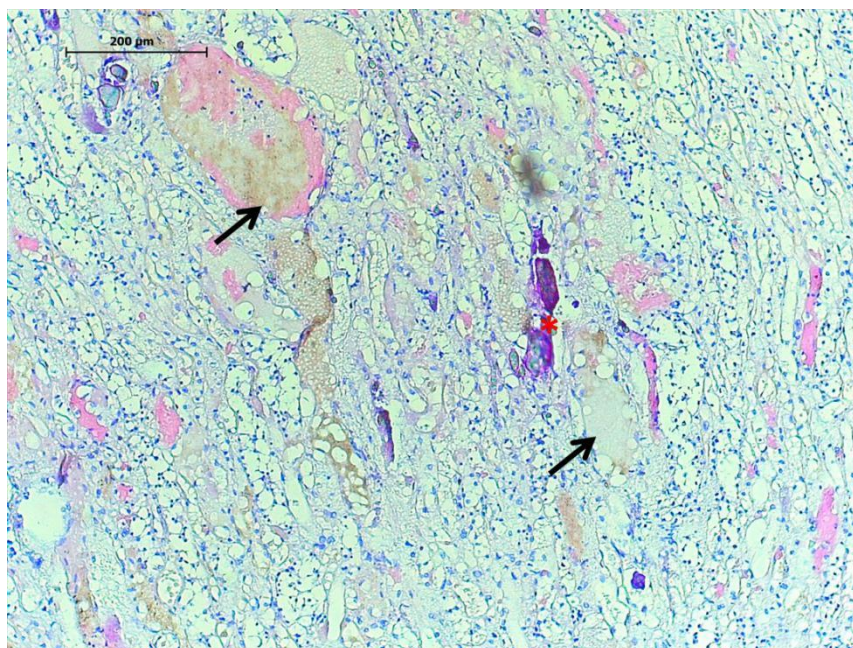
2.4 SAÚDE DOS CETÁCEOS

Figura 8: Fotomicrografia do Fígado: Processo inflamatório (asterisco vermelho), fibrose perivascular (seta preta). Na amostra também foi identificado edema, degeneração turva, congestão, esteatose e fibrose pericapsular. *Sotalia guianensis*, EAE_S197, fêmea, adulto. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



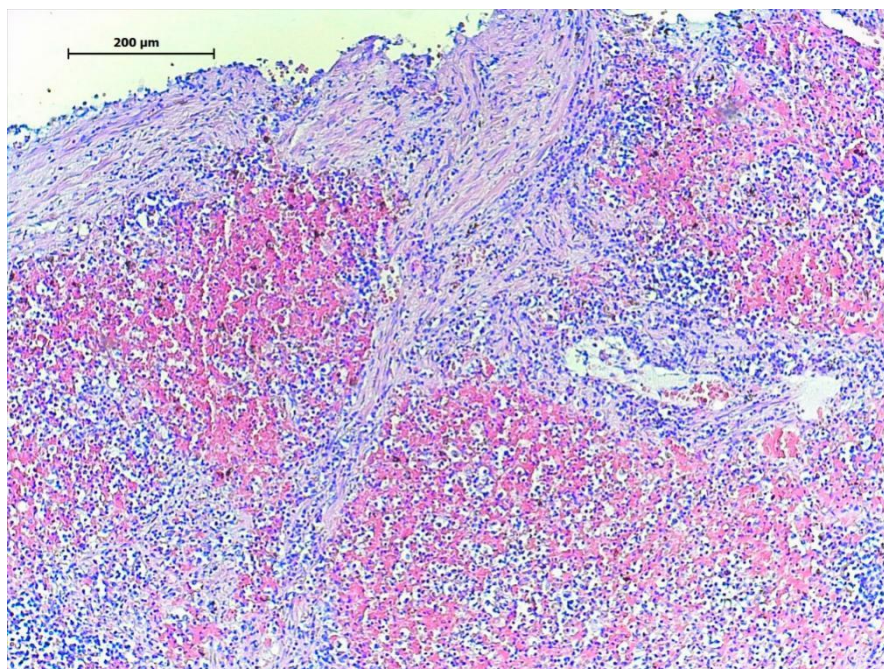
Os achados histopatológicos evidenciam o comprometimento do órgão e consequentemente a saúde dos sistemas e do animal.

Figura 9: Fotomicrografia de Rim: Mineralização (asterisco vermelho), cálculo proteico (seta preta). Na amostra também foi identificado processo inflamatório difuso moderado, congestão e cirrose perivascular. *Sotalia guianensis*, EAE_S197, fêmea, adulto. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



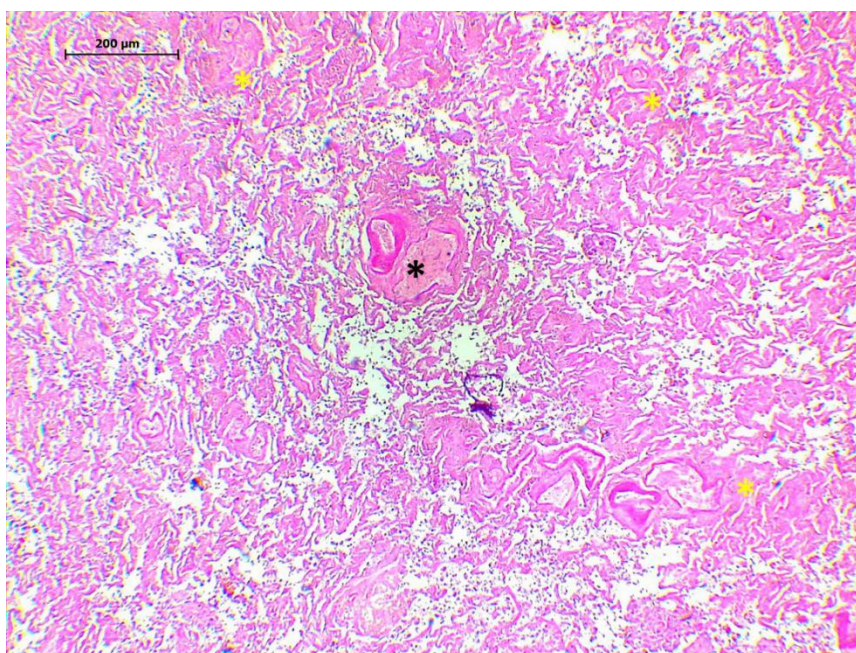
Os achados histopatológicos indicam debilidade do órgão, comprometendo o sistema renal, a filtração e por consequência a saúde do animal.

Figura 10: Fotomicrografia de Baço: Órgão reativo. Na amostra também foram identificados nódulos linfáticos reativos, congestão, focos de cirrose perivascular. *Sotalia guianensis*, EAE_S197, fêmea, adulto. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



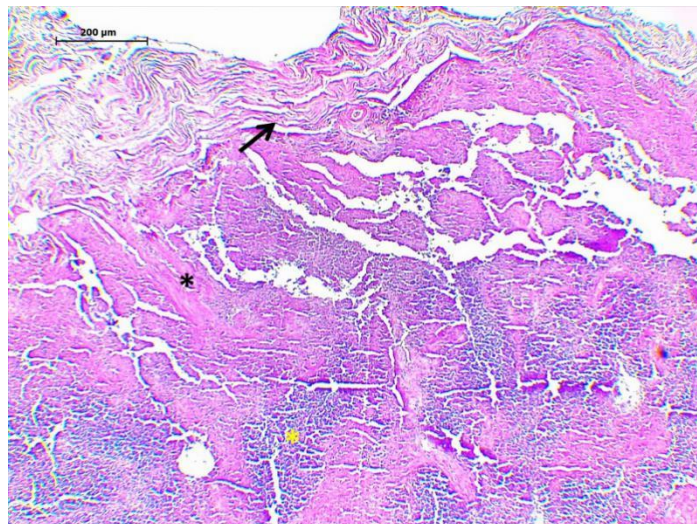
Os achados histopatológicos indicam um sistema linfático ativo, indicativo de processos infecciosos em outros órgãos do espécime, que pode estar com um ou mais órgãos ou sistemas comprometidos, prejudicando a saúde do animal.

Figura 11: Fotomicrografia de Pulmão: Congestão (asteriscos) e grave atelectasia. Na amostra também foram identificadas áreas de enfisema e espessamento de septo. *Pontoporia blainvillei*, EAE_N184, sexo indeterminado, juvenil. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



Os achados histopatológicos indicam insuficiência respiratória, comprometendo a distribuição de oxigênio e por consequência afetando todos os sistemas essenciais que mantêm a saúde do espécime.

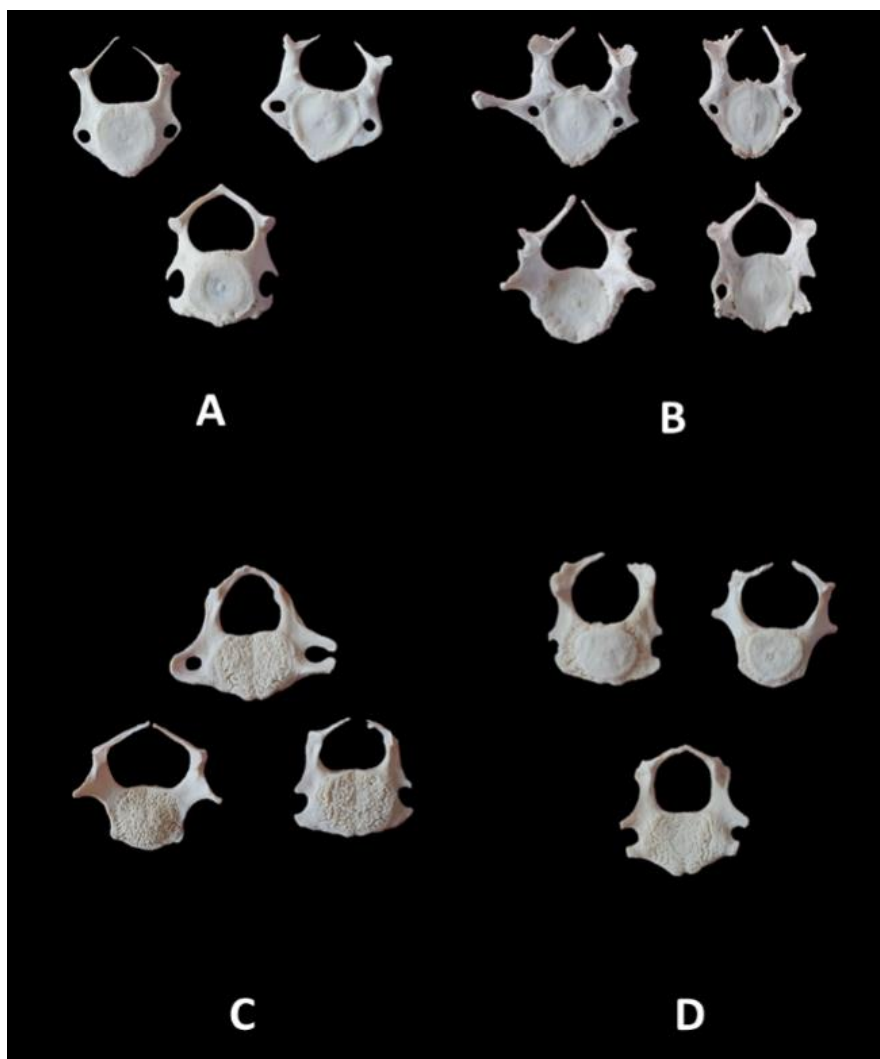
Figura 12: Fotomicrografia de Coração: Proliferação de tecido conjuntivo (asterisco preto), aderências e pericardite (seta preta), infiltrado inflamatório (asterisco amarelo). Na amostra também foi identificada proliferação de tecido conjuntivo, pequenos focos de mineralização, congestão e leve hemorragia. *Sotalia guianensis*, EAE_N180, macho, adulto. Coloração: HE. Aumento: 4X. Ano 5 PMBA/Fest



Os achados histopatológicos indicam órgão comprometido, o que prejudica a circulação sanguínea, distribuição de oxigênio, afetando todos os sistemas e o desempenho de diversas funções essenciais para a sobrevivência do espécime.

Figura 13: Abertura do arco neural em vértebras cervicais. A: *Sotalia guianensis*, macho, adulto (EAE_N168); B: *Sotalia guianensis*, fêmea, juvenil (EAE_S181); C: *Pontoporia blainvillei*, fêmea, juvenil (EAE_N171); D: *Pontoporia blainvillei*, fêmea, filhote (EAE_N173).

Ano 5 PMBA/Fest



Considerada uma anomalia congênita em pequenos cetáceos, a abertura do arco neural já foi identificada em algumas populações de *Sotalia guianensis* de regiões distintas, no entanto, sendo mencionadas frequências menores que as encontradas para os espécimes avaliados pelo PMBA/Fest. Para *Pontoporia blainvillei*, ainda há um déficit de estudos que apresentem essas frequências. Sendo necessário aprofundar os estudos sobre essas alterações ósseas, bem como atingir um número significativo de espécimes avaliados.

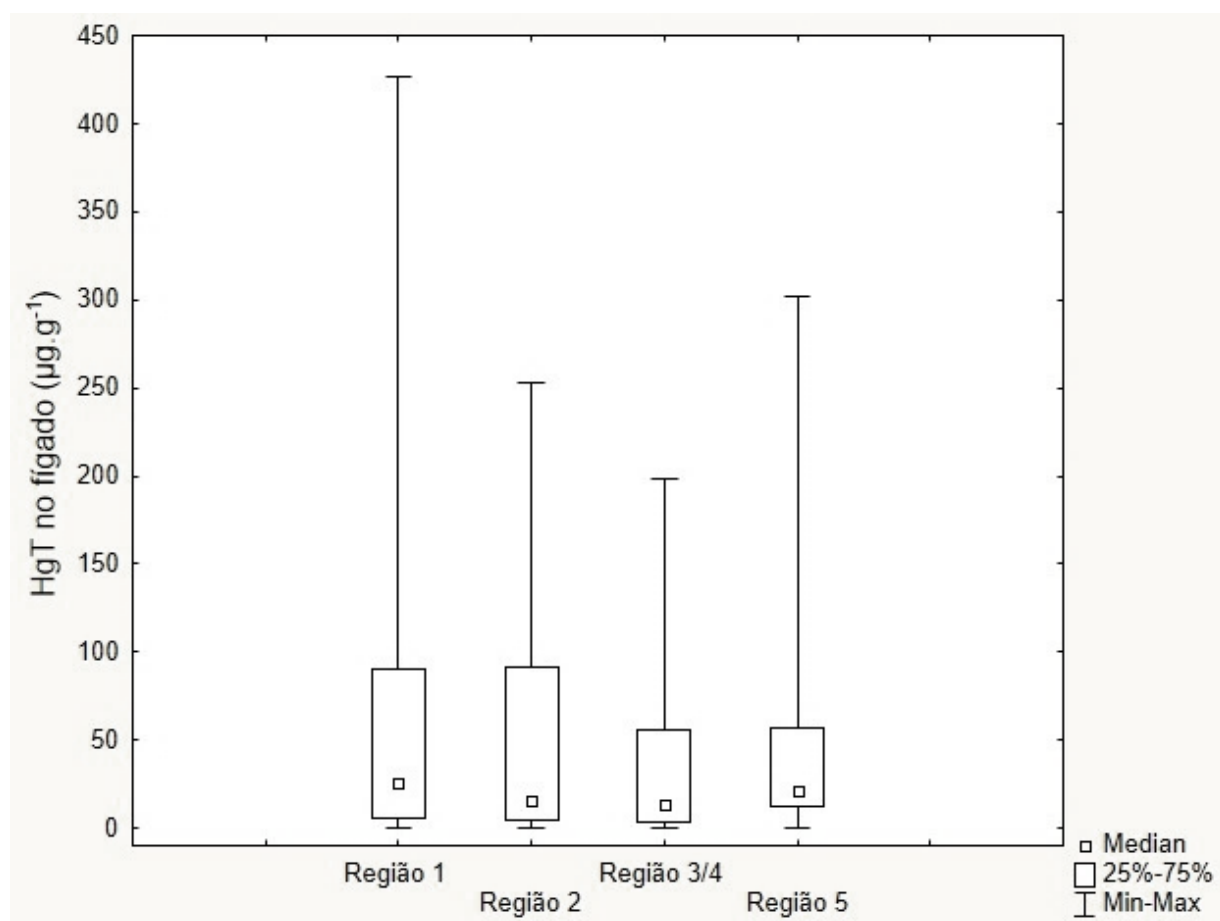
Quadro 10: Gêneros de bactérias e fungos encontrados nos cetáceos do PMBA/Fest.

Ano de amostragem	Gêneros de bactérias e fungos
Ano 1 (set/18 a set/19)	<i>Actinomyces</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Candida</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>
Ano 2 (out/19 a set/20)	<i>Candida</i> <i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Kluyvera</i> <i>Koserella</i> <i>Pantoea</i> <i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Ano 3 (out/20 a set/21)	<i>Candida</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i>
Ano 4 (out/21 a set/22)	<i>Candida</i> <i>Citrobacter</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Koserella</i> <i>Proteus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Ano 5 (out/22 a mar/23)	<i>Aeromonas</i> <i>Candida</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Staphylococcus</i>

No Ano 2 a diversidade de espécies de microrganismos identificados foi maior que o Ano 1. No Ano 3 e Ano 4 as bactérias encontradas já haviam sido descritas nos anos anteriores, bem como o gênero fúngico *Candida*. No Ano 5 (até março de 2023), foi identificado um gênero inédito de bactéria: *Aeromonas*. Fatores ambientais exercem papel fundamental na ocorrência de infecções, alterando principalmente o sistema imunológico dos cetáceos. Esta diversidade de microrganismos identificados pode indicar mudanças ambientais e interferir na saúde dos espécimes, pois muitos são patogênicos, podendo causar debilidade e até levar a óbito.

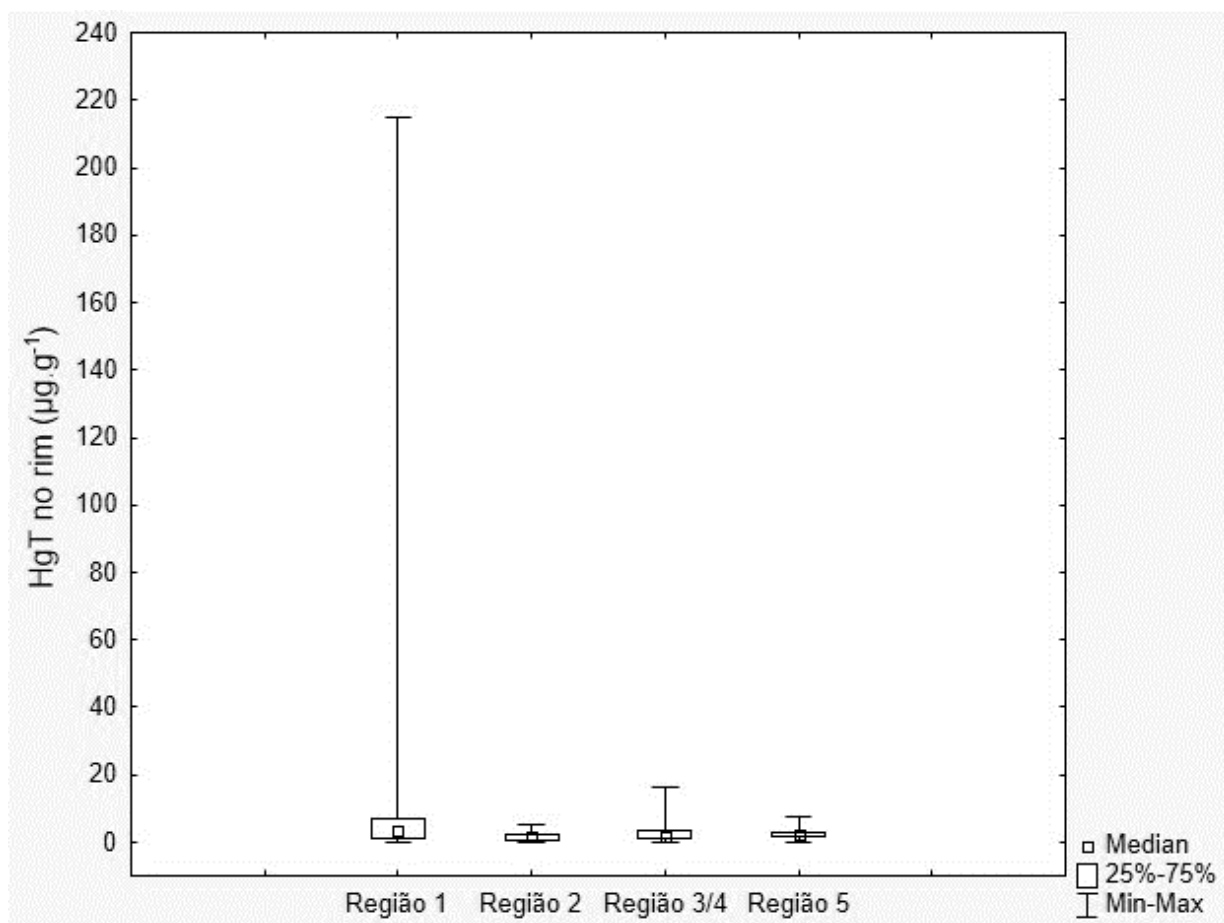
2.5 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES EM *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI*

Figura 14: Concentrações de HgT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 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, Ano 4 e Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



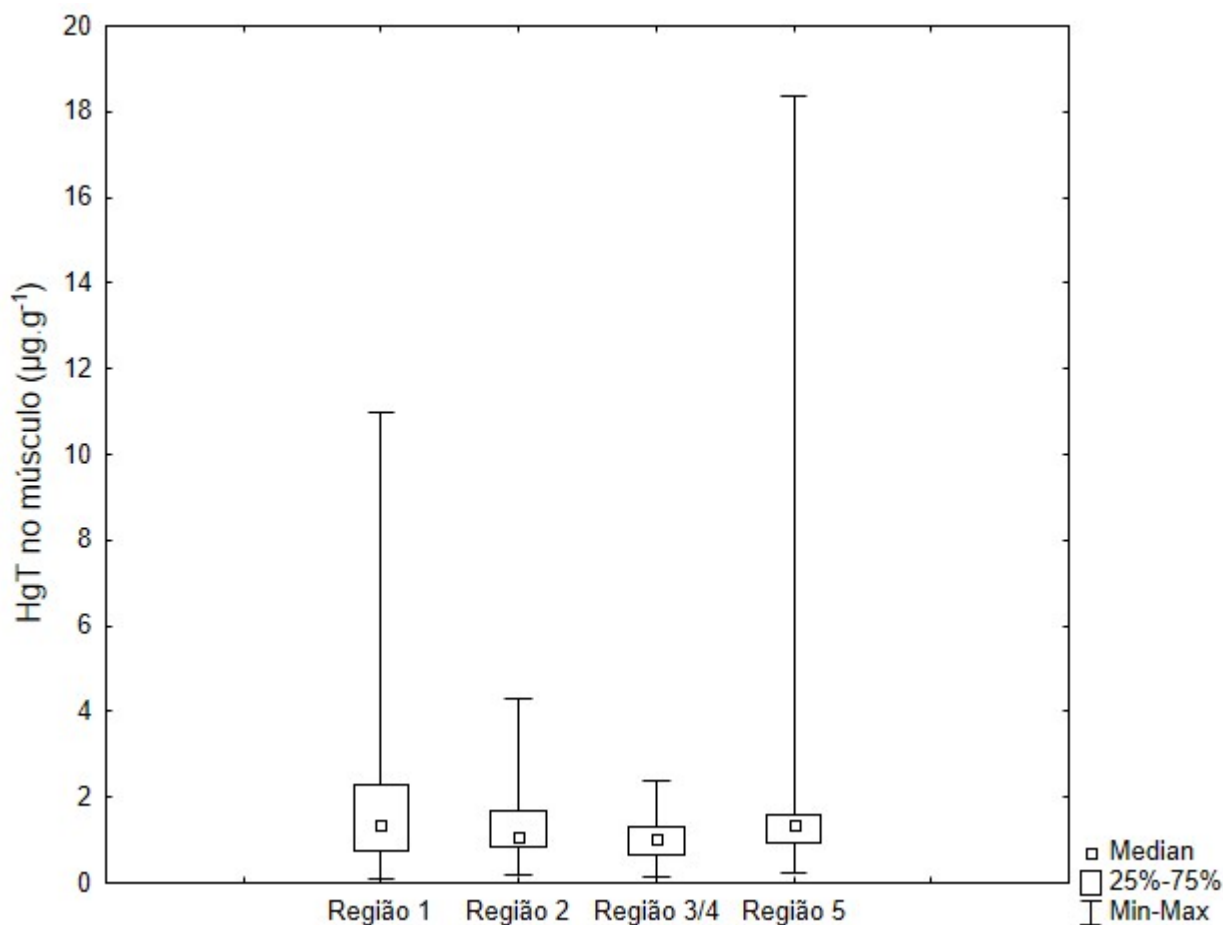
Vale destacar que as concentrações máximas de HgT em fígado de botos-cinza estão acima do limite de tolerância estabelecido na literatura que pode causar danos hepáticos nos mamíferos marinhos ($100 \text{ a } 400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, p. u.) para todas as regiões de estudo. Em relação à variação espacial, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em fígado de botos-cinza das regiões analisadas. Em relação à variação temporal, também não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no fígado de botos-cinza ao longo dos anos de monitoramento (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Apesar da ausência de diferenças significativas, vale destacar que as concentrações hepáticas são elevadas, especialmente nos botos-cinza coletados no período Pré-PMBA.

Figura 15 : 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, Ano 4 e Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



Em relação à variação espacial, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no rim de botos-cinza das regiões analisadas, e nem variações temporais (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) ao longo dos anos de monitoramento.

Figura 16: 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, Ano 4 e Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



Em relação à variação espacial, foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações em músculo de botos-cinza das regiões analisadas, sendo significativamente mais elevadas em botos-cinza da região 5 (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; Teste de comparações múltiplas, $p < 0,05$). Em relação à variação temporal, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações no músculo de botos-cinza ao longo dos anos de monitoramento.

Quadro 11: 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, Ano 4 e Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)

Região	N	Tecido	Média \pm DP	Mediana	Mín-Máx
1	68	Músculo	2,03 \pm 2,2	1,38	0,12-10,98
	50	Rim	9,14 \pm 30,2	2,91	0,14-214,91
	66	Fígado	65,90 \pm 95,0	25,01	0,11-426,23
2	22	Músculo	1,29 \pm 0,9	1,06	0,19-4,31
	19	Rim	1,82 \pm 1,3	1,59	0,28-5,09
	19	Fígado	48,56 \pm 73,5	14,68	0,29-252,65
3/4	64	Músculo	1,04 \pm 0,5	1,02	0,15-2,39
	59	Rim	2,73 \pm 2,9	1,64	0,20-16,52
	58	Fígado	36,5 \pm 52,0	13,57	0,64-198,47
5	46	Músculo	1,66 \pm 2,6	1,37	0,24-18,35
	42	Rim	2,43 \pm 1,6	2,17	0,25- 7,67
	39	Fígado	44,47 \pm 61,0	21,17	0,22- 301,90

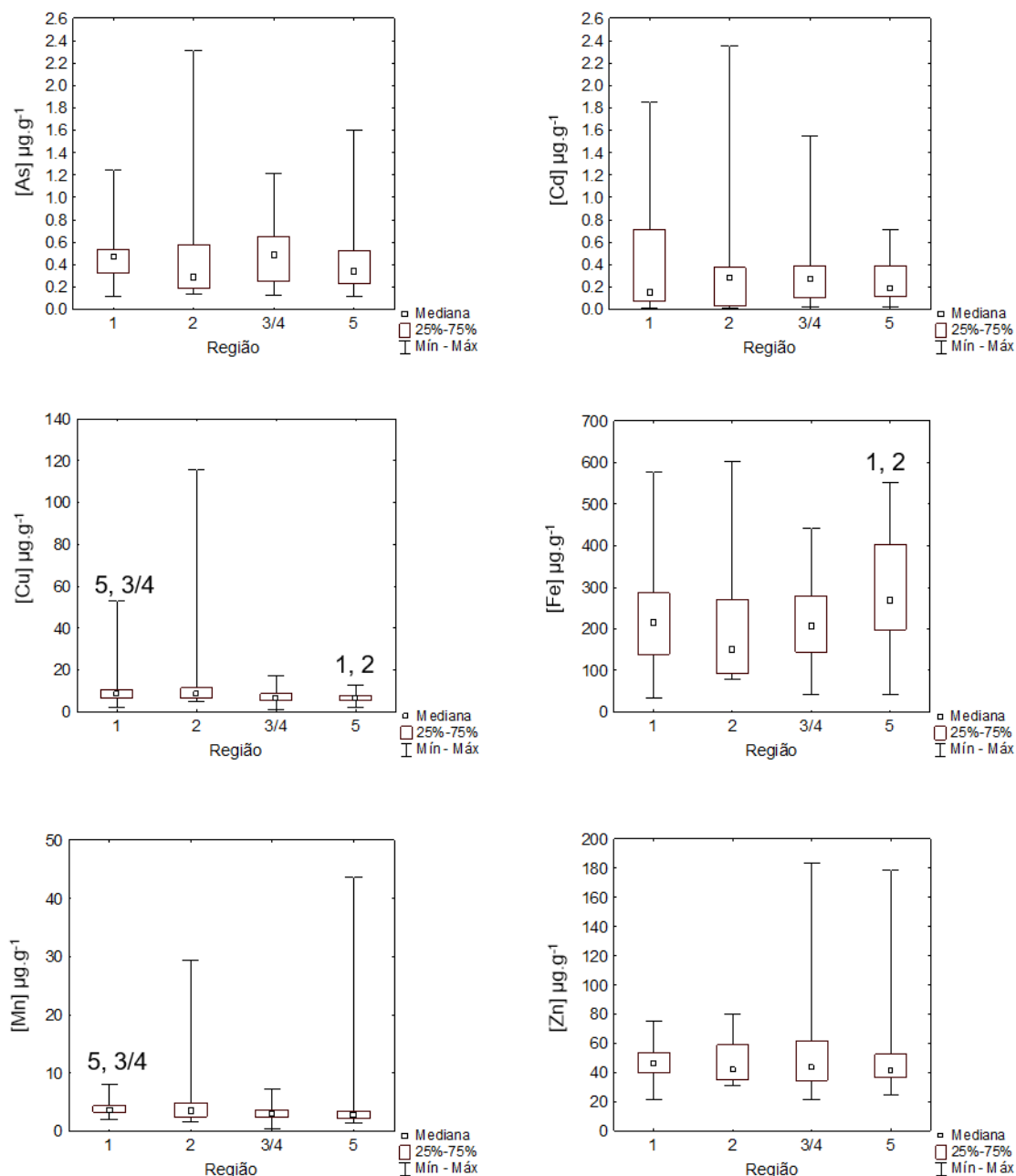
Podemos destacar as concentrações mais elevadas no fígado, seguido do rim e do músculo nos botos-cinza analisados. As concentrações hepáticas médias dos indivíduos de botos-cinza analisados (n= 202) durante os anos monitoramento do PMBA/Fest encontram-se na mesma ordem de grandeza que as médias mais elevadas do Brasil, como em botos-cinza da costa do Rio de Janeiro. Esses dados corroboram os resultados obtidos no último relatório (RA2022).

Quadro 12: 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, Ano 4 e Ano 5 do PMBA/Fest

N	Tecido	Média \pm DP	Mediana	Mín-Máx
18	Músculo	0,63 \pm 0,5	0,65	0,13-1,32
13	Rim	0,52 \pm 0,3	0,50	0,07-1,05
15	Fígado	1,40 \pm 1,7	0,90	0,25 -7,00

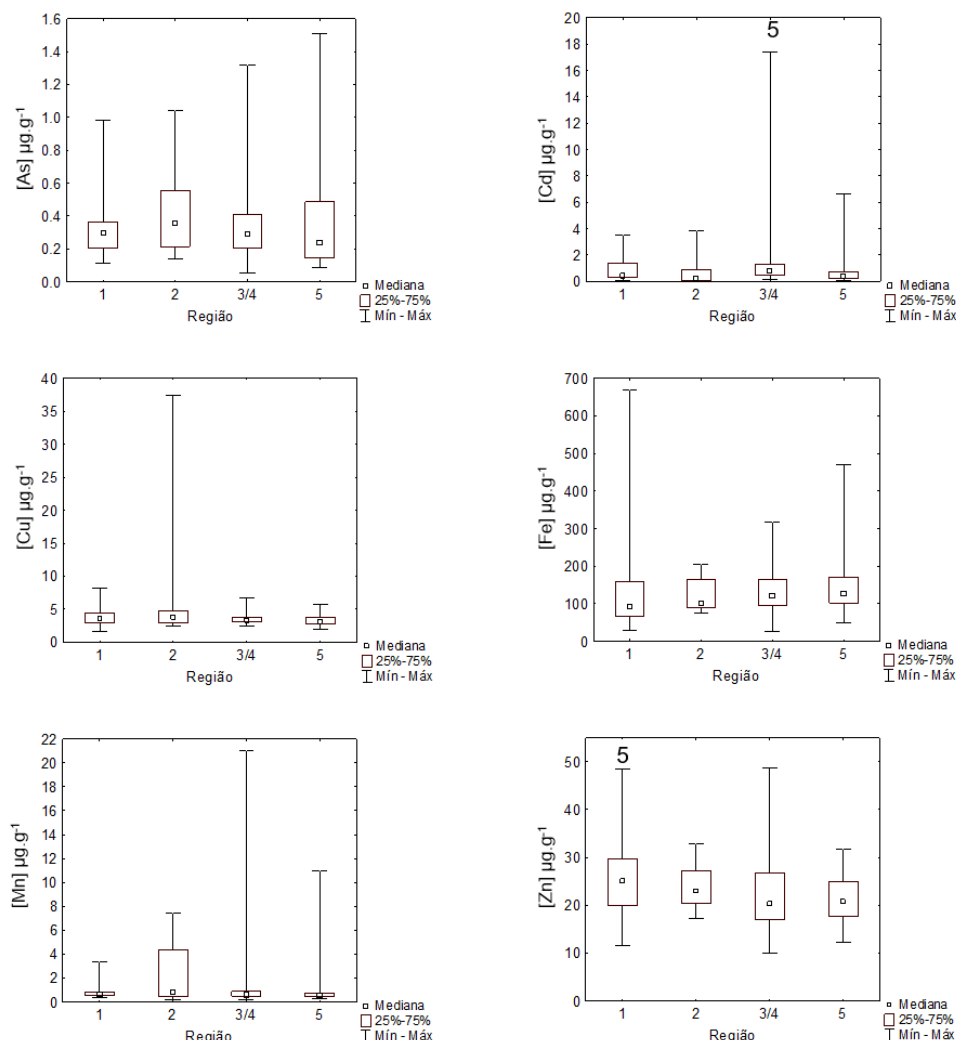
Vale ressaltar que as concentrações encontradas no presente RSE2023 encontram-se na mesma ordem de grandeza que estudos prévios realizados na costa Sudeste do Brasil. Considerando dados pretéritos, os indivíduos do presente RSE2023 apresentaram concentrações de HgT similares a estudos prévios na costa 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 17: 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados até o Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG). Os números acima das barras indicam as regiões com as quais foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$)



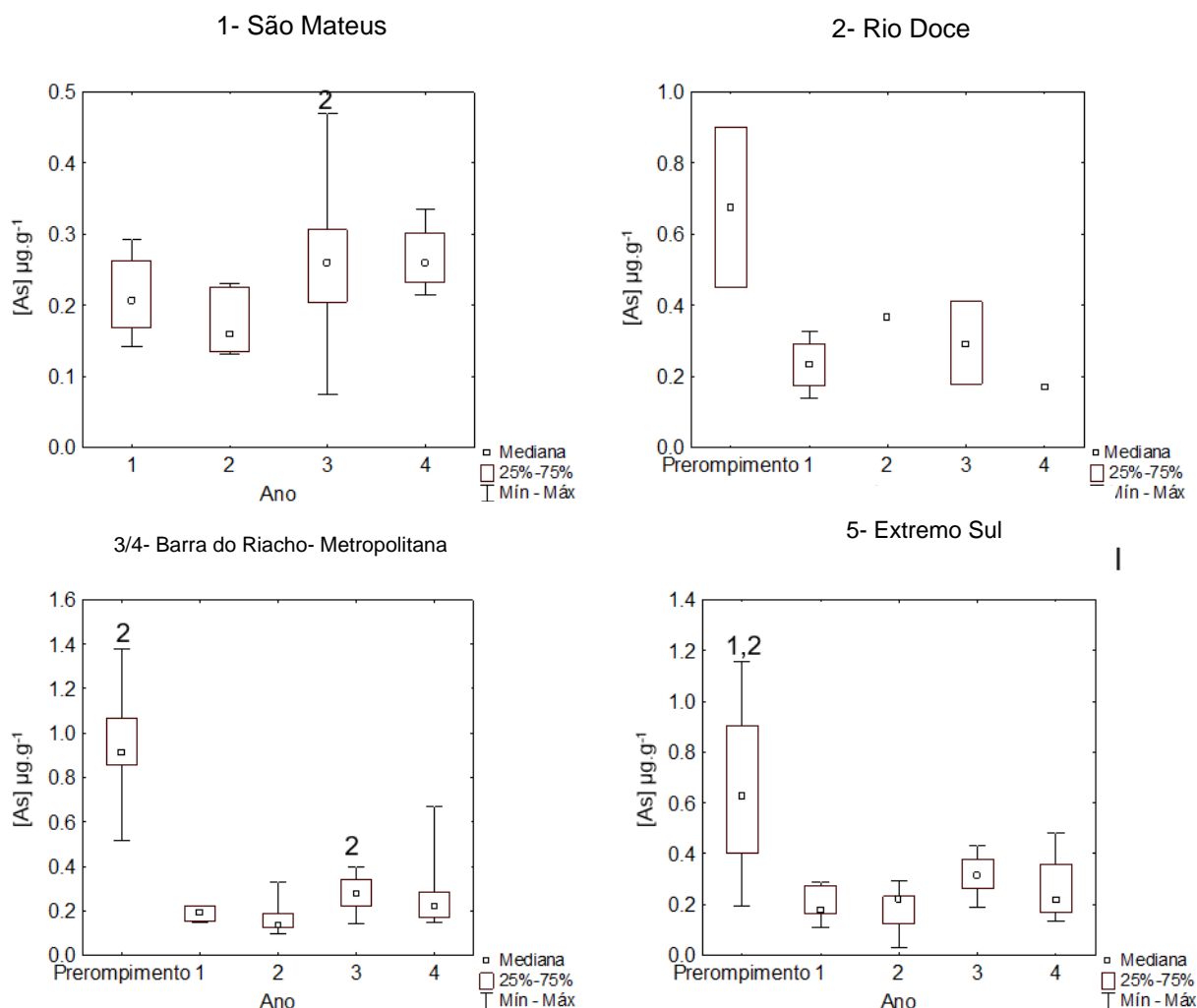
Todas as regiões apresentam concentrações medianas de As maiores que as reportadas na literatura para a espécie. Com exceção do As, as medianas das concentrações dos elementos-traço estão na mesma ordem de magnitude daquelas reportadas na literatura. Entretanto, a literatura abrange diferentes estados 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 18: 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) analisados até o Ano 5 do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG). Os números acima das barras indicam as regiões com as quais foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$)



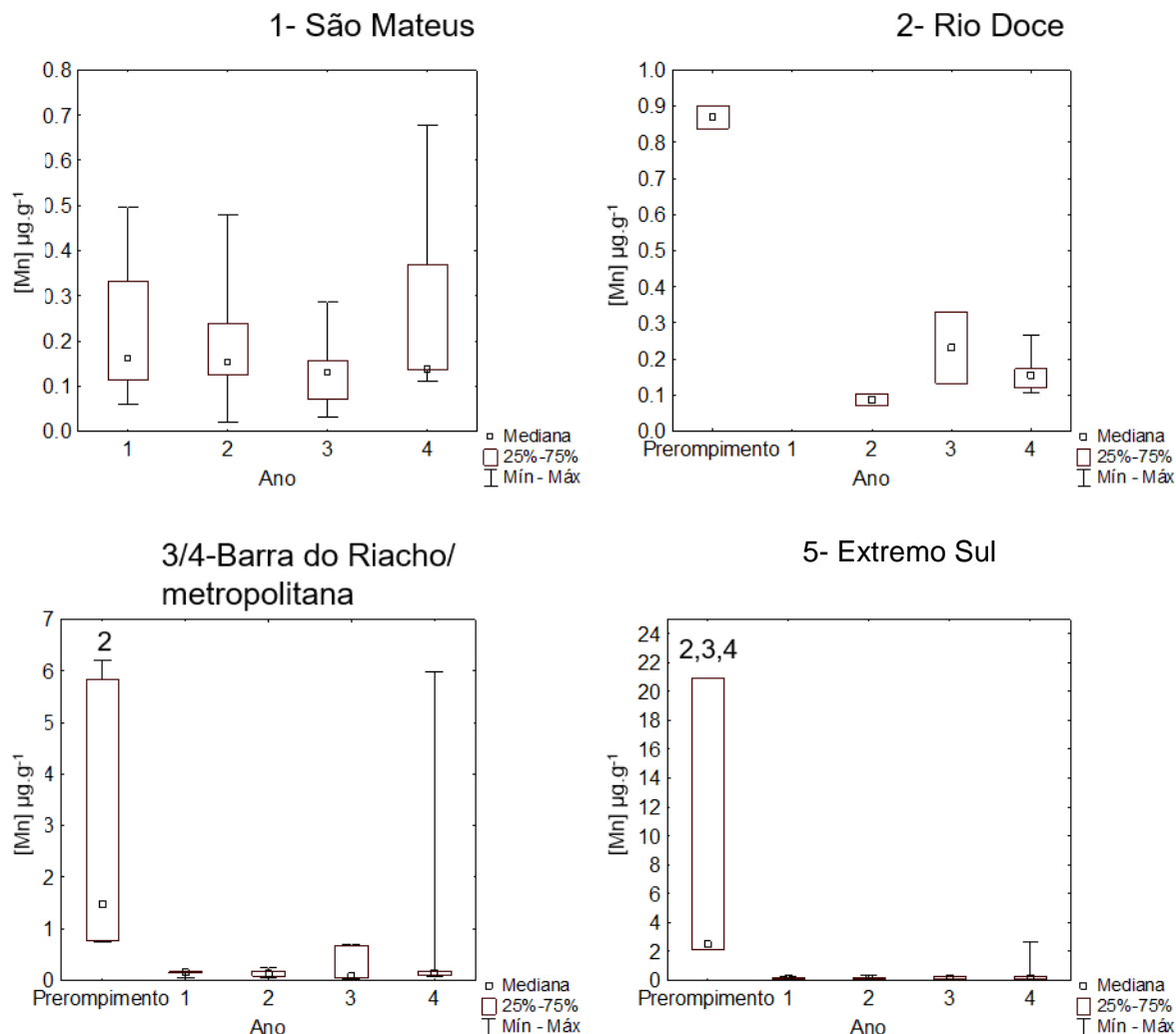
As concentrações medianas de Cd no rim estão maiores que as reportadas na literatura para a espécie, com destaque para a região Barra do Riacho/Metropolitana. A região de São Mateus apresentou concentrações renais significativamente maiores de Zn do que no Extremo Sul (Kruskal-Wallis, $p<0,05$).

Figura 19: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso úmido) músculo de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG), separados por região da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES)



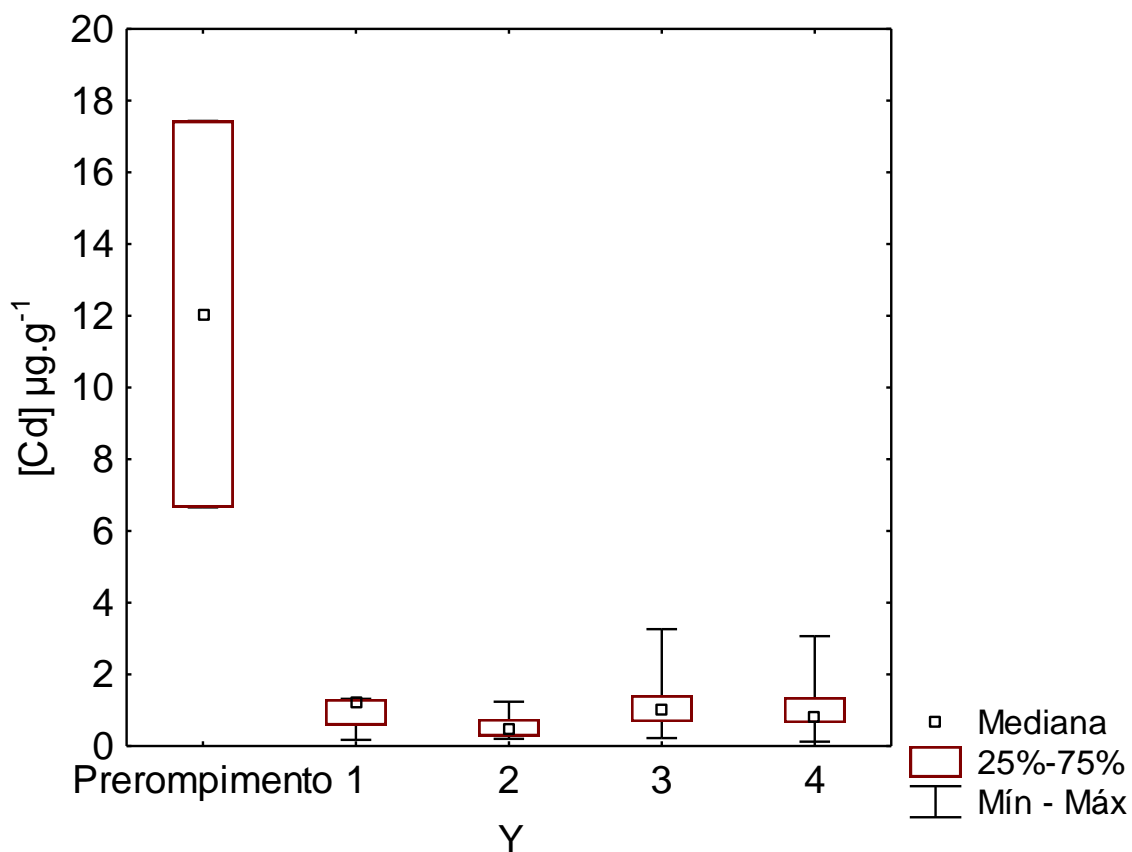
Quando comparados aos anos de monitoramento do PMBA/Fest, foi observado um aumento significativo nas concentrações durante o Ano 3 para as regiões 1 e 3/4. O Ano 3 também apresentou maior mediana que a região 5, apesar de não ser uma diferença significativa. A região 2-Rio Doce não possui número amostral suficiente para análise estatística comparando os dados pré e pós-rompimento. Os indivíduos pré-rompimento apresentaram as maiores concentrações de As, indicando uma possível mudança na dinâmica desse elemento com o rompimento da barragem de Fundão. Entretanto, esses resultados devem ser analisados com cautela pois os dados biológicos que podem influenciar o acúmulo de elementos não estão disponíveis (ex.: idade). 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 20: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Mn ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso úmido) no rim de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG). separados por região da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES)



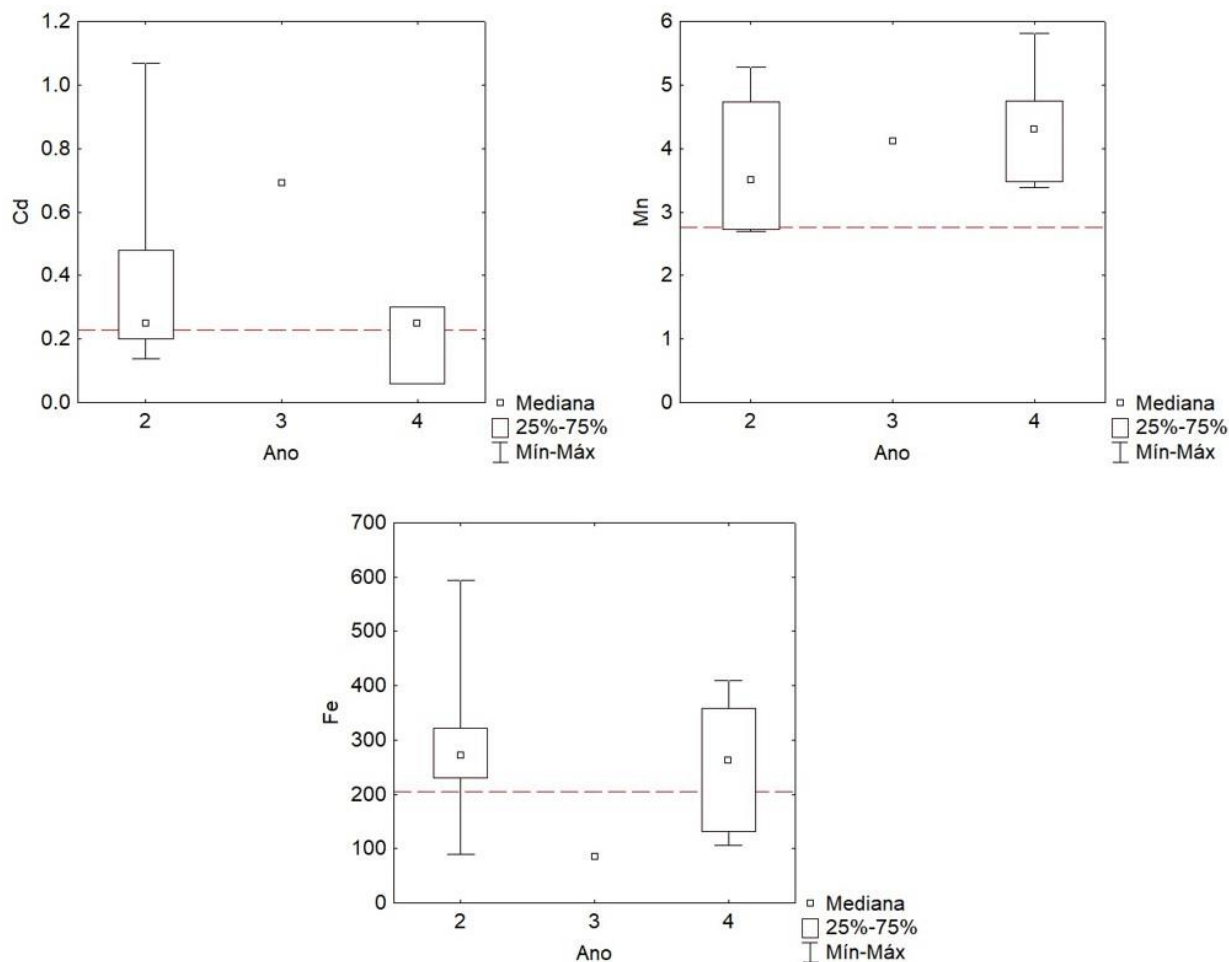
O Mn foi identificado como um dos principais componentes da lama e em diversos compartimentos já foi identificado aumento em suas concentrações relacionada ao rompimento. As concentrações de Mn nos indivíduos pré-rompimento foram maiores do que nos demais anos de monitoramento em todas as regiões onde essas amostras estavam disponíveis (Regiões 2, 3/4 e 5). Essa mesma tendência foi observada para os demais elementos essenciais (Cu, Zn, Fe). As elevadas concentrações de Mn reportadas no presente relatório reforçam os riscos aos quais os cetáceos estão expostos na região afetada pelo rompimento da barragem de Fundão.

Figura 21: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso úmido) no rim de *Sotalia guianensis* durante os diferentes Anos do PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG), Região 3/4-Barra do Riacho/Metropolitana



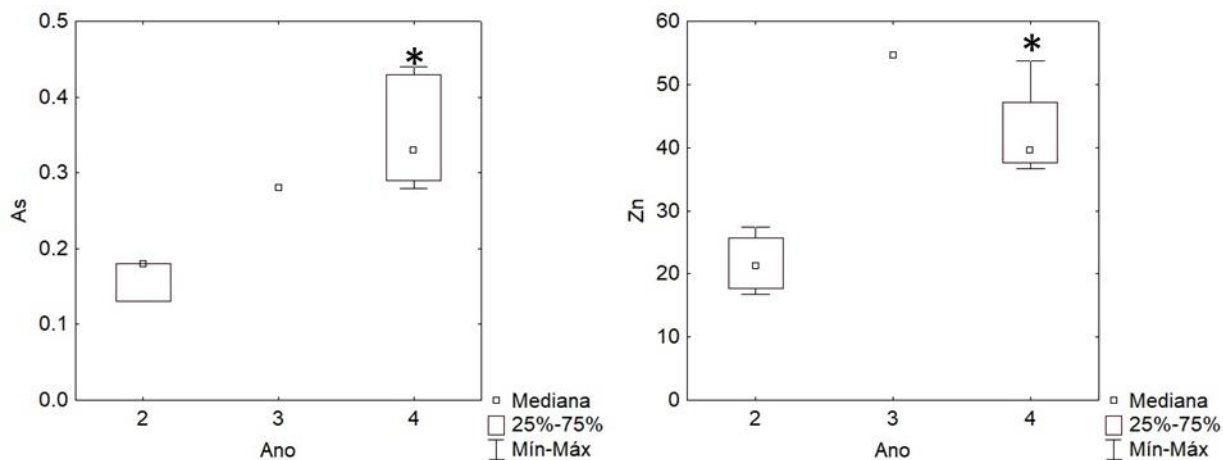
Destacam-se as elevadas concentrações de Cd no período pré-rompimento (período entre 2009 e 2012).

Figura 22: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de Cd no rim; e Mn e Fe no fígado ($\mu\text{g.g}^{-1}$ 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 ao longo do 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 23: Alterações nas concentrações de contaminantes em *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*. Concentrações de As no músculo e Zn no fígado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 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, $p < 0,05$).

Quadro 13: 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 analisados durante os 5 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, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)

Região	Tecido	N		Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	As
1	Fígado	61	Média ± DP	0,38±0,44	12,0±12,8	222±121	3,9±1,5	49±20	0,49±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 ± DP	0,06±0,08	0,8±0,4	93±41	0,2±0,1	19±5	0,23±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±0,84	3,8±1,4	128±107	0,7±0,5	25±7	0,33±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	15	Média ± DP	0,40±0,60	16,2±27,6	204±143	5,2±6,8	47±15	0,55±0,61
			Mediana	0,29	8,5	151	3,5	42	0,29
			Mín. - Máx.	<0,01-2,35	4,8-115,6	78-604	1,7-29,4	31-80	0,13-2,31
	Músculo	20	Média ± DP	-	3,7±5,1	98±37	0,29±0,29	20±4	0,33±0,21
			Mediana	-	1	95	0,16	21	0,29
			Mín. - Máx.	<0,01-0,006	0,4-16	26-167	<0,02-0,90	15-28	0,14-0,90
	Rim	15	Média	0,71±1,04	22,7±47	122±44	2,0±2,5	25±8	0,41±0,26
			Mediana	0,21	4,1	101	0,8	24	0,36
			Mín. - Máx.	0,02-3,84	2,5-172	76-205	0,2-7,4	17-47	0,14-1,04
3/4	Fígado	56	Média ± DP	0,31±0,28	13±31	222±105	3,4±1,6	58±43	0,49±0,27
			Mediana	0,27	6,8	206	3,0	44	0,48
			Mín. - Máx.	<0,01-1,55	0,8-231	42-442	0,3-7,3	22-288	0,13-1,22
	Músculo	63	Média ± DP	0,01±0,007	1,6±2,8	92±41	0,7±3,0	20±6	0,29±0,18
			Mediana	0,006	0,86	78	0,15	18	0,25
			Mín. - Máx.	<0,01-0,02	0,24-18,1	25-206	0,02-20,9	5,5-45	0,03-1,16
	Rim	56	Média ± DP	1,36±2,50	5,6±10,1	130±59	1,4±3,4	24±9	0,34±0,28
			Mediana	0,81	3,4	122	0,6	21	0,29
			Mín. - Máx.	0,12-17,4	2,5-74	27-317	0,2-21,0	9,8-49	0,05-1,32
5	Fígado	38	Média ± DP	0,24±0,16	55,6±301	291±122	4,0±6,7	49±27	0,44±0,32
			Mediana	0,19	6,5	268	2,8	42	0,34
			Mín. - Máx.	<0,01-0,71	1,9-1862	42-551	1,4-43,6	25-179	0,12-1,60
	Músculo	47	Média ± DP	0,008±0,009	3,9±8,0	98±48	0,78±1,62	20±6	0,33±0,29
			Mediana	0,005	0,85	85	0,17	19	0,22
			Mín. - Máx.	<0,01-0,03	0,14±44	40-257	<0,02-6,20	11-37	0,10-1,40
	Rim	37	Média	0,80±1,38	10,2±22,8	144±75	1,7±2,9	22±6	0,37±0,32
			Mediana	0,39	3,18	128	0,53	21	0,24
			Mín. - Máx.	0,06-6,67	1,9-111	49-469	0,26-11,0	12-39	0,09-1,51

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 Espírito Santo. Essas 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 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Quadro 14: 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).

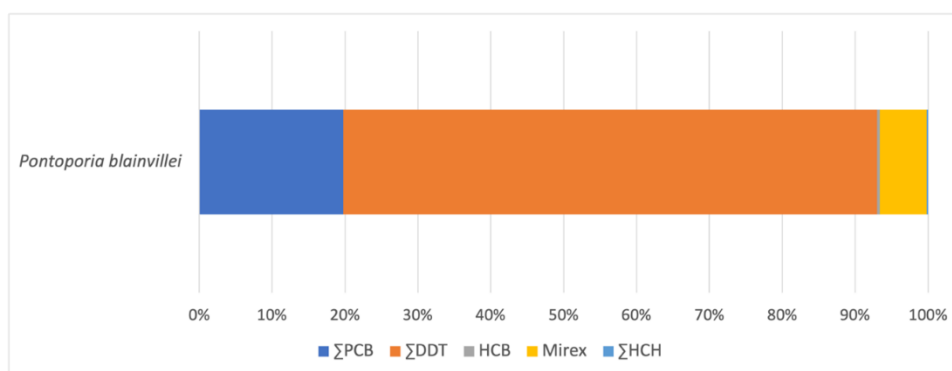
Quadro 15: Concentrações medianas, médias, desvio padrão, mínimas e máximas dos compostos organoclorados ΣPCB , ΣDDT , HCB, mirex e ΣHCH , expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso lipídico, em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)

		ΣPCB	ΣDDT	HCB	Mirex	ΣHCH
<i>Pontoporia blainvillei</i>						
	Mediana	3,03	11,2	0,1	1	0,03
N= 17	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
<i>Sotalia guianensis</i>						
Região 1 N= 62	Mediana	9,2	6,9	0,03	1,7	<0,002
	Média \pm Desvio Padrão	22,3 \pm 37,0	46,6 \pm 92,6	0,18 \pm 0,32	6,7 \pm 13,6	<0,002
	Mínimo - Máximo	0,28 - 220,2	0,08 - 414,3	<0,002 - 1,6	0,11 - 82,7	-
Região 2 N= 20	Mediana	19,3	7,3	0,04	1,8	0,05
	Média \pm Desvio Padrão	18,8 \pm 11,8	37,2 \pm 75,0	0,15 \pm 0,28	7,0 \pm 13,9	0,01 \pm 0,02
	Mínimo - Máximo	1,7 - 48,2	1,4 - 265,1	<0,002 - 0,88	<0,001 - 56,2	<0,002 - 0,08
Região 3/4 N= 62	Mediana	20,6	6,8	0,07	1,6	0,1
	Média \pm Desvio Padrão	42,9 \pm 49,7	37,7 \pm 95,8	0,27 \pm 0,46	6,3 \pm 13,4	0,1 \pm 0,04
	Mínimo - Máximo	0,07 - 189,55	0,2 - 624,34	<0,001 - 1,9	<0,001 - 75,1	<0,002 - 0,12
Região 5 N= 47	Mediana	26,2	6,9	0,05	1,1	-
	Média \pm Desvio Padrão	38,6 \pm 46,6	39,9 \pm 101,1	0,18 \pm 0,37	8,4 \pm 21,7	-
	Mínimo - Máximo	1,2 - 261,3	0,22 - 530,8	<0,002 - 1,7	0,14 - 97,11	-

Foram encontradas altas concentrações de ΣPCB em botos-cinza de todas as regiões monitoradas, que excedem os valores de 17 $\mu\text{g.g}^{-1}$ lip sugeridos para desencadear efeitos deletérios em mamíferos marinhos. Com o aumento do número amostral de toninhas (n=17) foi possível observar uma elevação nas

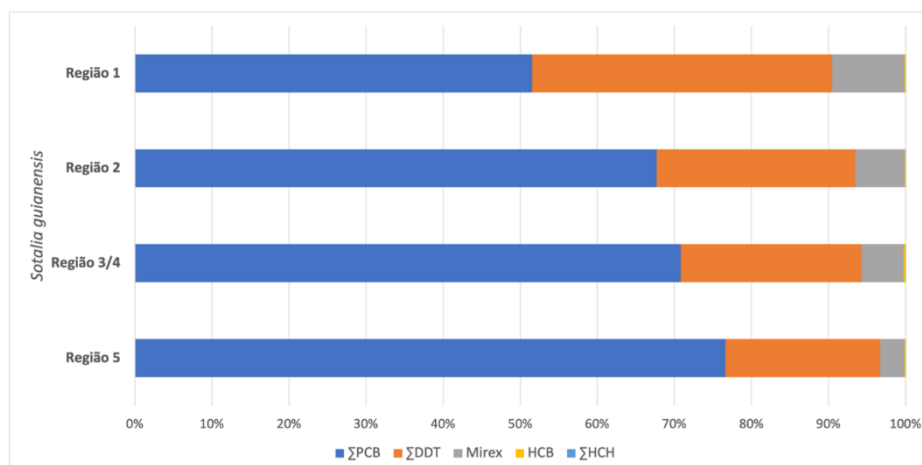
concentrações de DDT no presente RSE2023. As medianas das concentrações de bifenilas policloradas (PCBs) no tecido adiposo subcutâneo de botos-cinza (n=191) coletados no ES aumentaram gradativamente da região 1 (norte) para a região 5 (sul), sendo observada diferença significativa entre a região 1 e as regiões 3/4 e 5 (Figura 24). No entanto, não são observadas tendências temporais do acúmulo de PCBs nas regiões 1 e 3/4, refletindo o caráter recalcitrante desta classe de compostos. Em relação aos pesticidas organoclorados (DDT, HCB, HCH e Mirex), as concentrações foram similares entre as regiões, mas apresentaram uma variação temporal nas regiões 1 e 3/4. As concentrações de DDT e mirex foram maiores nos anos 3 e 4 em comparação aos anos 1 e 2 do PMBA/Fest, enquanto as concentrações de HCB foram maiores nos anos 3 e 4 do que o período pré-rompimento e o Ano 1 de monitoramento.

Figura 24: Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletadas na costa do estado do Espírito Santo durante os cinco anos de PMBA/Fest



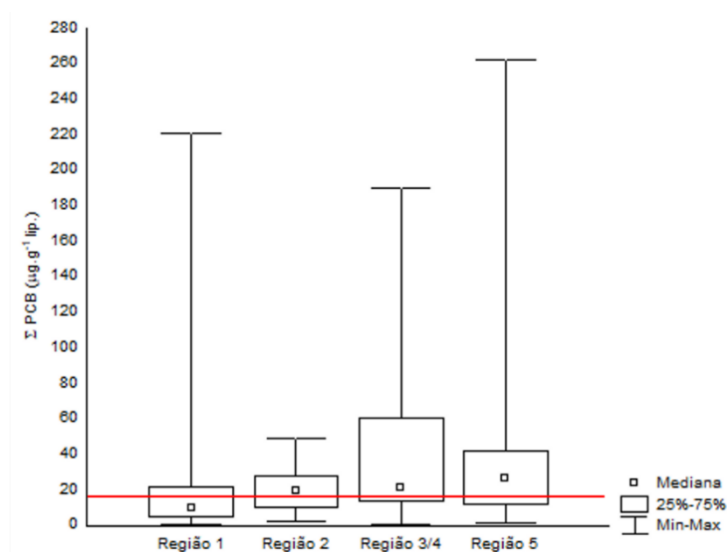
O perfil de contaminação das toninhas é dominado por DDTs, seguido de PCBs, mirex, HCB e HCHs.

Figura 25: Perfil de contribuição de compostos organoclorados Σ PCB, Σ DDT, HCB, mirex e Σ HCH em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5 coletados na costa do estado do Espírito Santo da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



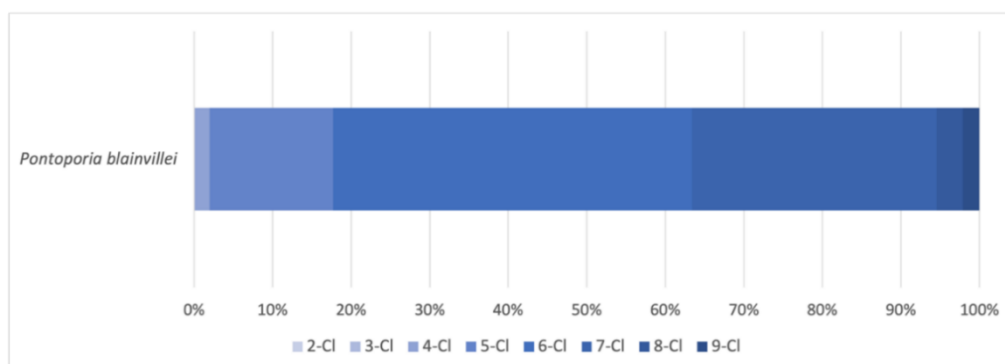
O perfil de contaminação semelhante entre as regiões, com predomínio de PCBs, seguido por DDTs, mirex, HCB e HCHs. No entanto, nota-se uma contribuição um pouco maior de DDTs na região 1 quando comparada às outras regiões.

Figura 26: Concentração de Σ PCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1, 2, 3/4 e 5, coletados na costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



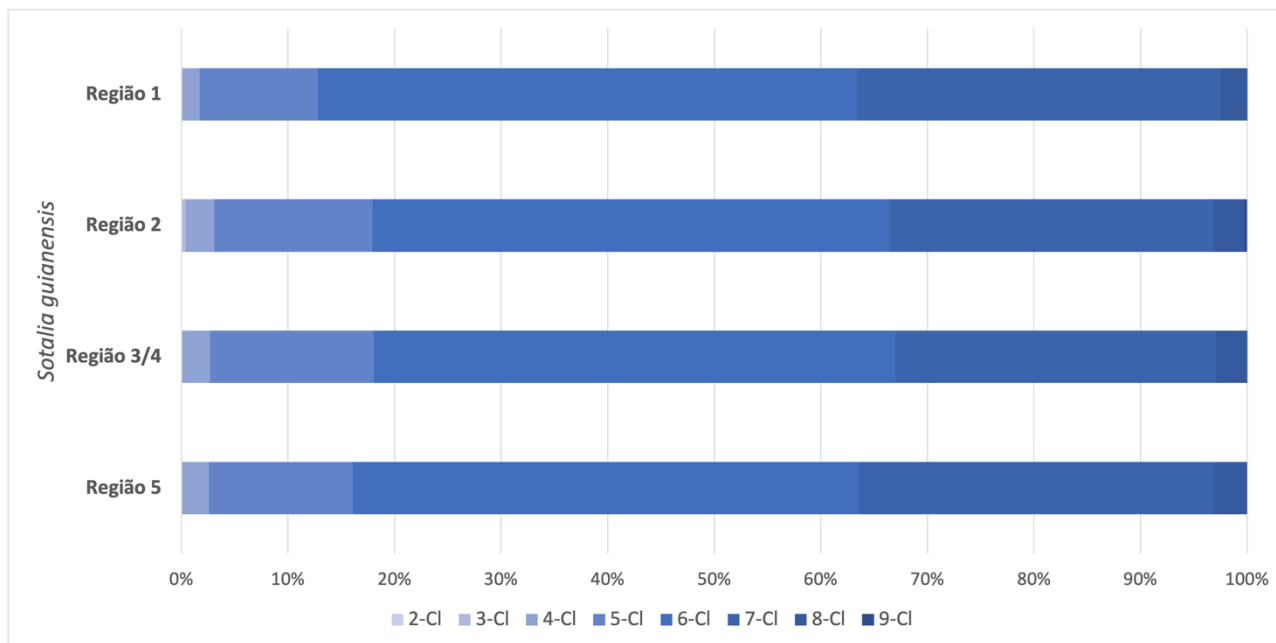
A concentração de Σ PCB em botos-cinza da região 1 é menor que nas regiões 3/4 e 5, sendo as últimas consideradas regiões metropolitanas, de alta impacto urbano. Vale ressaltar que as concentrações medianas em botos-cinza das regiões 2, 3/4 e 5 ultrapassam o limite de $17 \mu\text{g.g}^{-1}$ (marcado 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 ao longo dos anos. As concentrações de Σ PCB são similares às reportadas para populações que residem em áreas que sofrem com a alta pressão antrópica. Tais concentrações observadas podem ter consequências para a manutenção das populações e devem ser monitoradas.

Figura 27: Perfil de contribuição de PCBs por grau de cloração em toninhas (*Pontoporia blainvillei*) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os cinco anos de PMBA/Fest



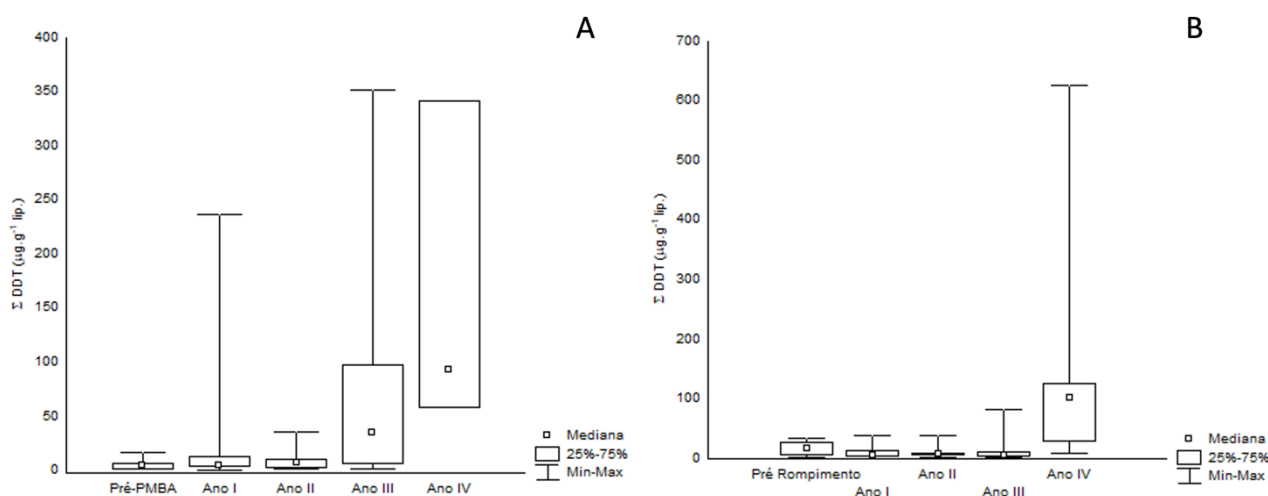
Assim como observado para o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), o perfil de PCBs por grau de cloração reflete a maior disponibilidade e baixa taxa de degradação dos congêneres contendo, 5, 6 e 7 átomos de cloro em sua composição.

Figura 28: 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) (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



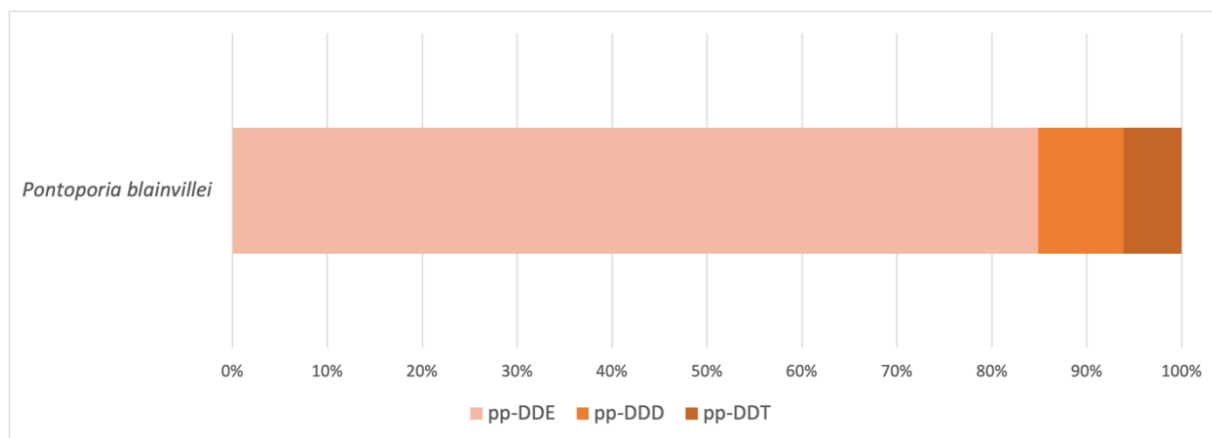
De modo geral, não são observadas diferenças no perfil de PCBs relacionados ao grau de cloração em botos-cinza ao longo da costa do ES, sendo este semelhante ao observado em golfinhos-de-dentes-rugosos e toninhas também coletadas ao longo da costa.

Figura 29: Concentração de Σ DDT em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1 (A) e 3/4 (B) coletados na costa do estado do Espírito Santo (1= São Mateus; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana) durante no período pré-PMBA/Fest e durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



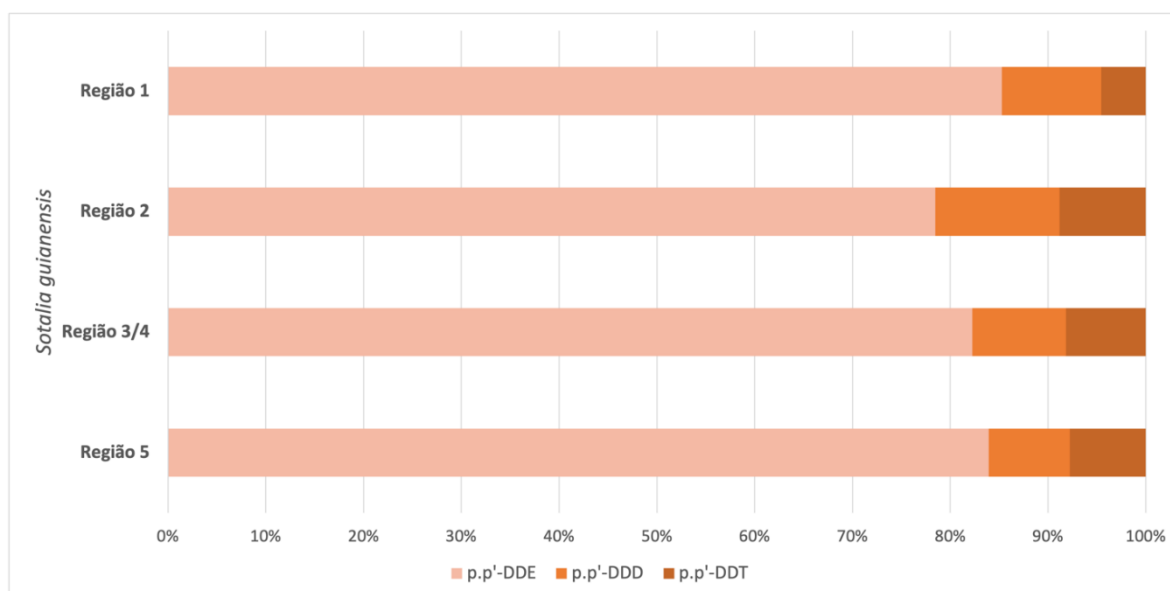
Em ambas as regiões, as concentrações de DDT em botos-cinza aumentaram gradativamente desde o período pré-monitoramento até o Ano 4.

Figura 30: 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 cinco anos de PMBA/Fest



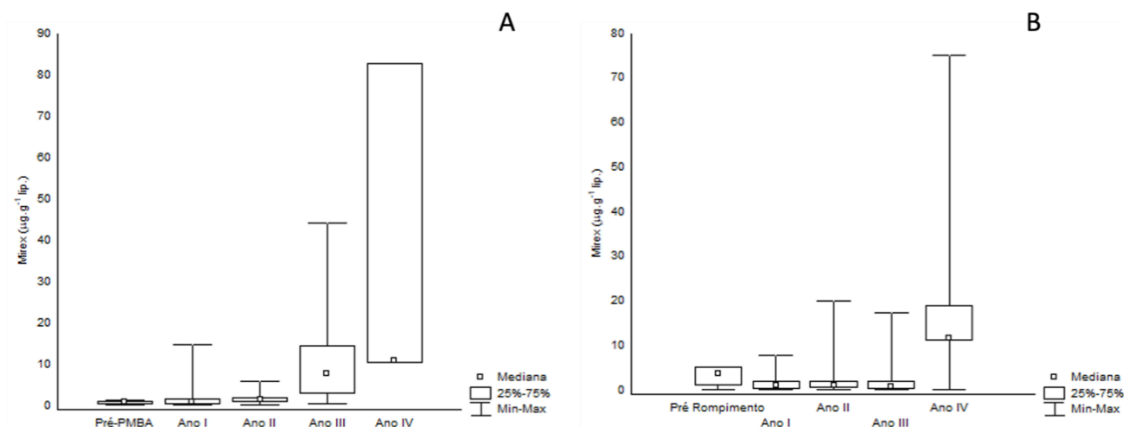
O predomínio do metabólito *p.p'*-DDE em toninhas sugere não disponibilização recente de DDT na teia trófica deste cetáceo residente. Recentemente, foi observado um aumento das concentrações de pesticidas organoclorados em toninhas dessa região após o rompimento da barragem de Fundão (Oliveira-Ferreira 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 31: 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)



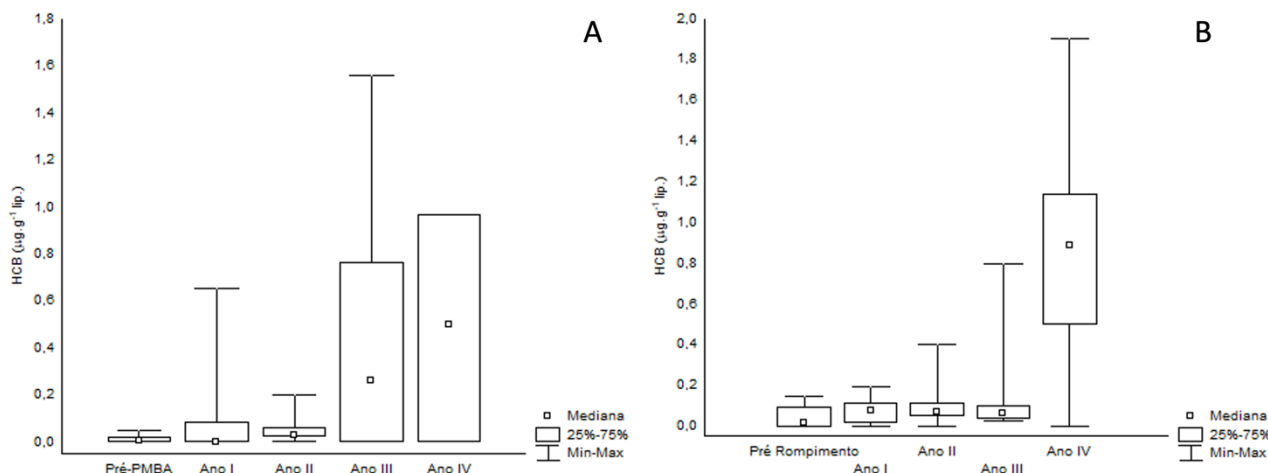
Assim como observado em toninhas (*Pontoporia blainvillei*), há dominância de *p.p'*-DDE no perfil, indicando uma contaminação histórica e não recente no local.

Figura 32: Concentração de Mirex em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (A) e 3/4 (B) coletados na costa do estado do Espírito Santo (ES) (1= São Mateus; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



As concentrações de mirex em botos-cinza sofreram um aumento gradativo na costa do ES ao longo dos quatro anos de monitoramento deste composto. Não houve a adição de indivíduos no Ano 5 por se tratar de uma fêmea, que devido a transferência placentária, foi excluída desta análise.

Figura 33: Concentração de HCB em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões 1 e 3/4 da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana) coletados na costa do estado do Espírito Santo durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, Mariana (MG)



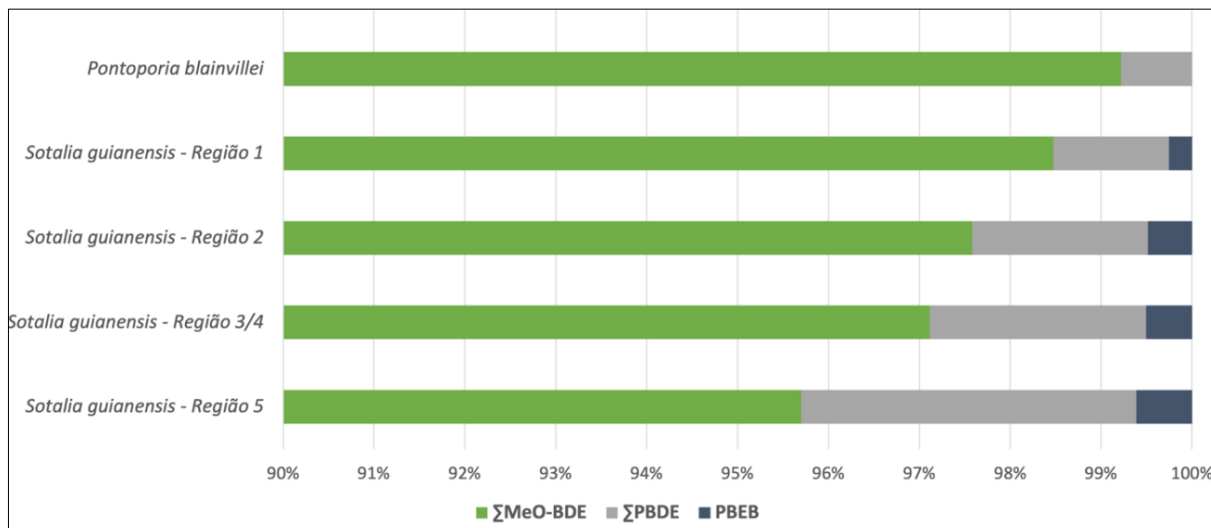
As concentrações de HCB foram maiores nos Anos 3 e 4 que no período pré-rompimento da barragem e Ano 1, sugerindo também uma remobilização de pesticidas organoclorados ao longo do período de monitoramento dos botos-cinza.

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

		Σ MeO-BDE	Σ PBDE	PBEB	HBBZ
<i>Pontoporia blainvillei</i>					
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	-	-
<i>Sotalia guianensis</i>					
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, que podem refletir a influência do Banco de Abrolhos na costa do Espírito Santo.

Figura 34: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ MeO-BDE, e de origem antrópica, Σ 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) 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 35: Perfil de contribuição de compostos organobromados de origem natural, Σ 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os quatro anos de PMBA/Fest

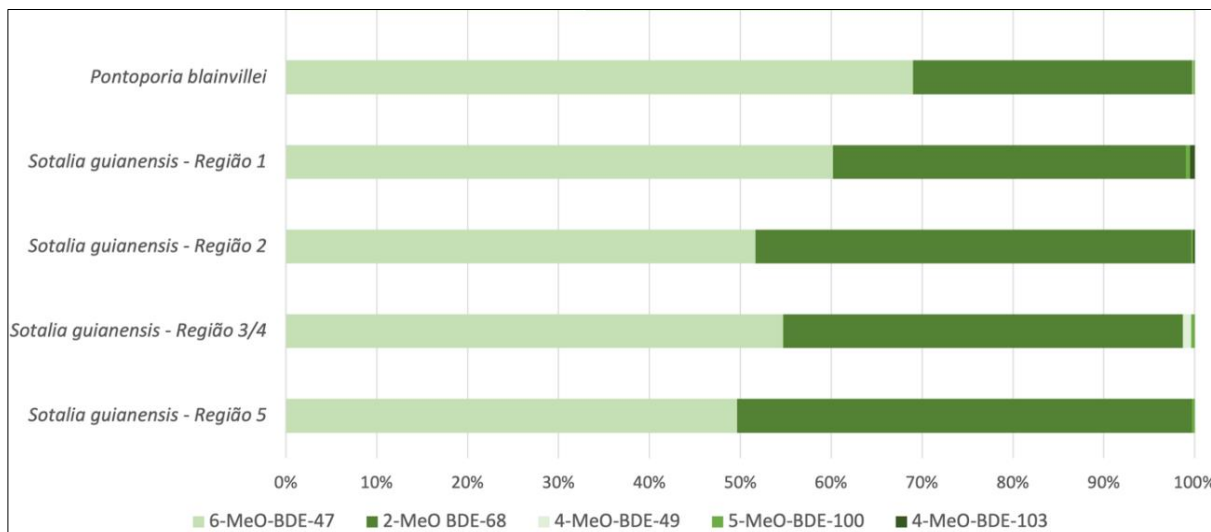
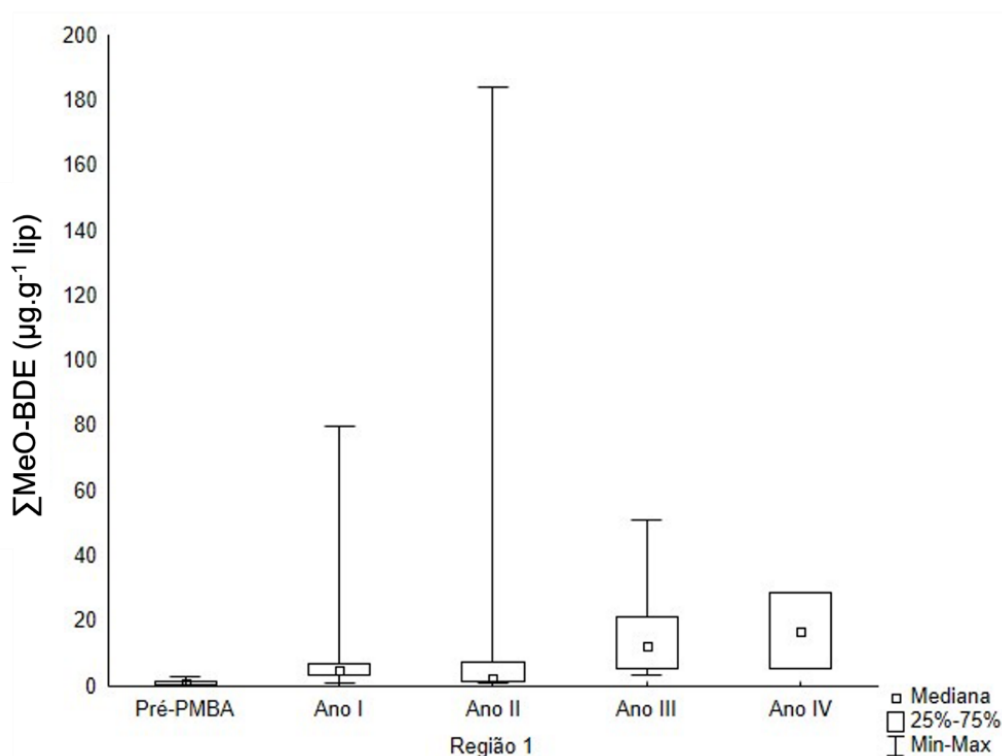


Figura 36: Concentração de Σ MeO-BDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (1- São Mateus) coletados na costa do estado do Espírito Santo por ano durante os quatro anos de PMBA/Fest



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 37: 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 (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os quatro anos de PMBA/Fest

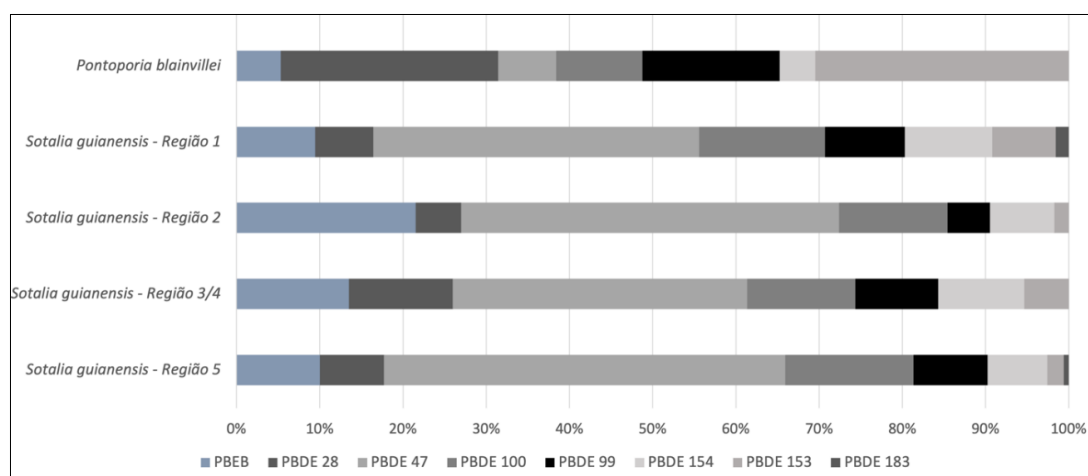
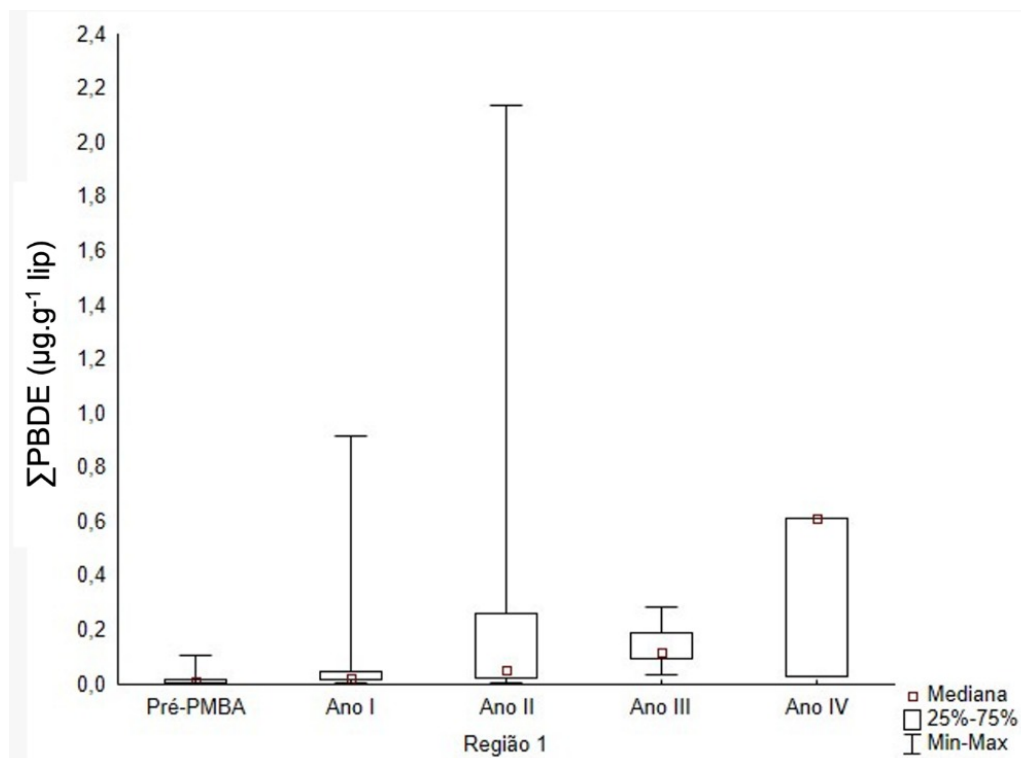


Figura 38: Concentração de Σ PBDE em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) da região 1 (1- São Mateus) coletados na costa do estado do Espírito Santo por ano durante os quatro anos de PMBA/Fest



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 antrópicos encontradas nessas regiões são semelhantes às observadas em locais altamente impactados na costa do Brasil, como a Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. Em relação às toninhas, as concentrações de compostos organobromados de origem natural e antrópica se assemelham às do boto-cinza da mesma região.

Quadro 17: Concentrações mediana, médias, desvio padrão, mínimas e máximas de Σ HPAs_{Total}, Σ HPAs_{USEPA}, Σ HPAs₂₋₃ anéis, Σ HPAs₄₋₆ 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 na costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES) durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)

		Σ HPAs _{Total}	Σ HPAs _{USEPA}	Σ HPAs ₂₋₃ anéis	Σ HPAs ₄₋₆ anéis
<i>Pontoporia blainvillei</i>					
N= 15	Mediana	0,07	0,06	0,04	0,02
	Média ± Desvio Padrão	0,46 ± 0,68	0,44 ± 0,66	0,26 ± 0,53	0,22 ± 0,33
	Mínimo – Máximo	<0,001 – 2,12	<0,001 – 2,09	<0,001 – 1,66	<0,001 – 0,97
<i>Sotalia guianensis</i>					
Região 1 (N= 59)	Mediana	0,18	0,17	0,04	0,32
	Média ± Desvio Padrão	3,22 ± 7,72	3,27 ± 7,77	0,86 ± 3,71	3,05 ± 6,38
	Mínimo – Máximo	<0,001 – 37,27	<0,001 – 37,27	<0,001 – 25,15	<0,001 – 26,05

		$\Sigma \text{HPAs}_{\text{Total}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{\text{USEPA}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{2-3 \text{ anéis}}$	$\Sigma \text{HPAs}_{4-6 \text{ anéis}}$
Região 2 (N= 38)	Mediana	0,68	0,70	0,20	0,35
	Média \pm Desvio Padrão	5,91 \pm 17,91	6,04 \pm 17,65	0,59 \pm 0,74	5,71 \pm 17,95
	Mínimo – Máximo	<0,001 – 76,66	<0,001 – 73,48	<0,001 – 2,05	<0,001 – 74,61
Região 3/4 (N= 60)	Mediana	0,10	0,13	0,05	0,15
	Média \pm Desvio Padrão	2,82 \pm 11,73	2,88 \pm 11,62	0,78 \pm 2,66	2,67 \pm 10,50
	Mínimo – Máximo	<0,001 – 82,48	<0,001 – 79,61	<0,001 – 16,66	<0,001 – 65,81
Região 5 (N= 44)	Mediana	0,18	0,17	0,05	0,11
	Média \pm Desvio Padrão	1,27 \pm 2,67	1,26 \pm 2,66	0,22 \pm 0,37	1,26 \pm 2,65
	Mínimo – Máximo	<0,001 – 12,03	<0,001 – 12,03	<0,001 – 1,71	<0,001 – 11,70

Não foram observadas variações temporais ou espaciais em relação às concentrações de $\text{HPAs}_{\text{Totais}}$, $\text{HPAs}_{\text{USEPA}}$, HPAs de baixo peso molecular (2-3 anéis) e de alto peso molecular (4-6 anéis; Figura 37).

Figura 39: Concentração de Σ HPAs_{Total} em tecido hepático de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados nas regiões 1, 2, 3/4 e 5, na costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES), durante os cinco anos de PMBA/Fest, incluindo as amostras coletadas antes do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG)

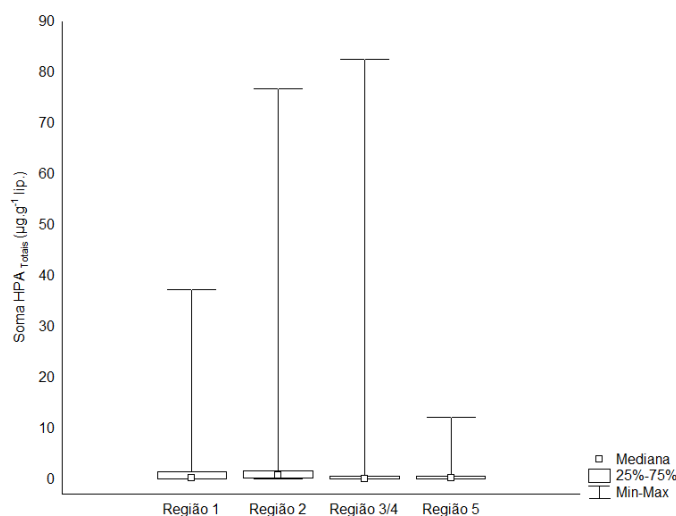
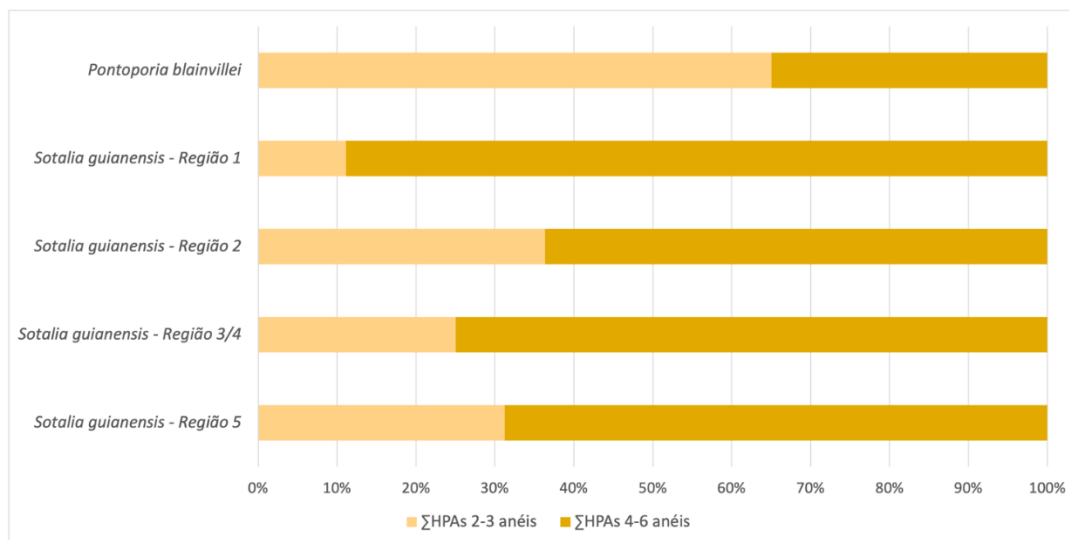


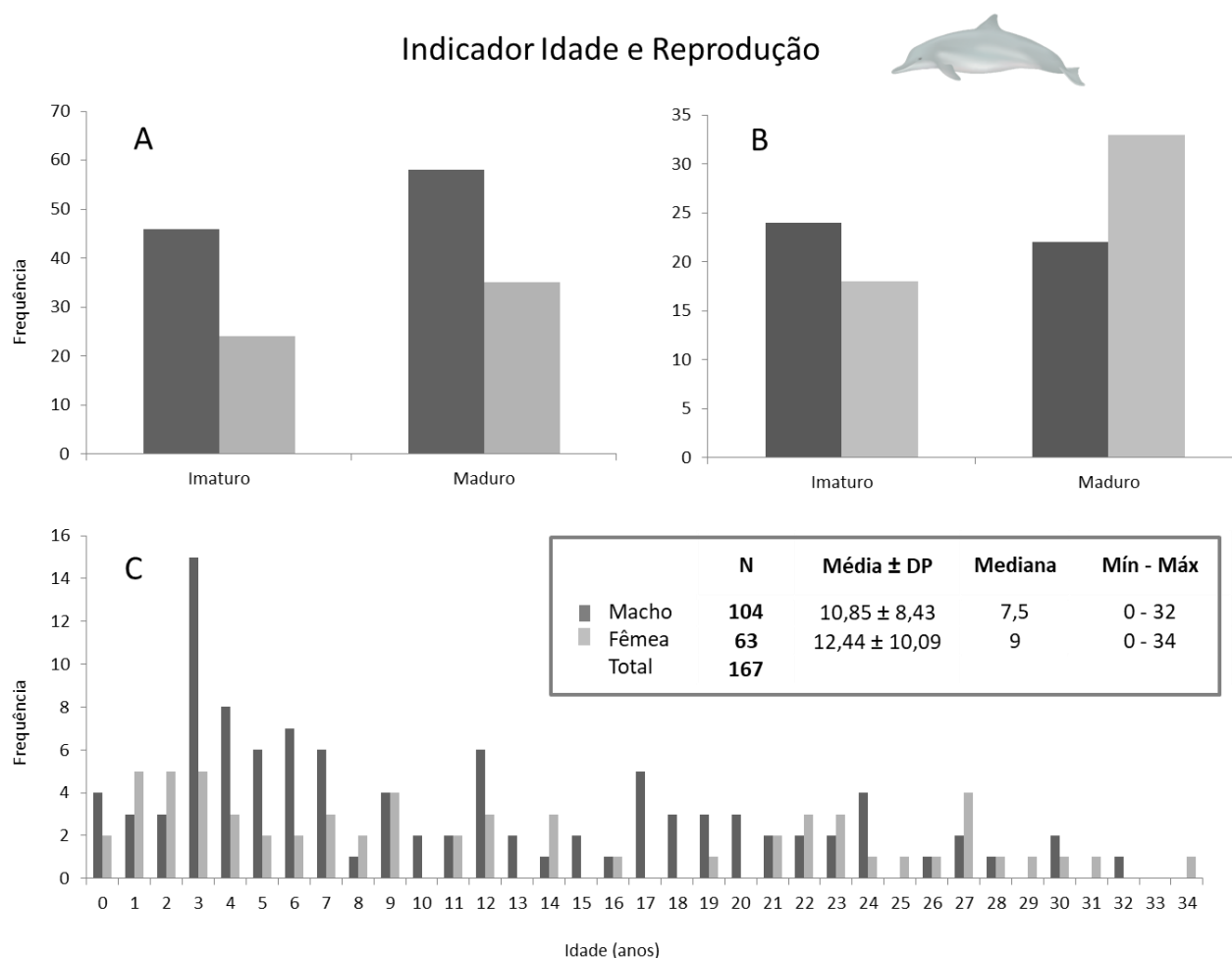
Figura 40: Perfil de HPAs de baixo (2-3 anéis) e alto (4-6 anéis) peso molecular em tecido hepático de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e botos-cinza (*Sotalia guianensis*) coletados nas regiões 1, 2, 3/4 e 5 costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana;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



O perfil de HPAs de baixo e alto peso molecular variou entre as espécies. Enquanto o boto-cinza apresenta uma contribuição expressiva de HPAs de alto peso molecular, as toninhas apresentam um perfil de marjoritariamente, HPAs de baixo peso molecular. Chama a atenção a contribuição de HPAs de baixo peso molecular em botos-cinza da região 2 (Figura 38). 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.

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

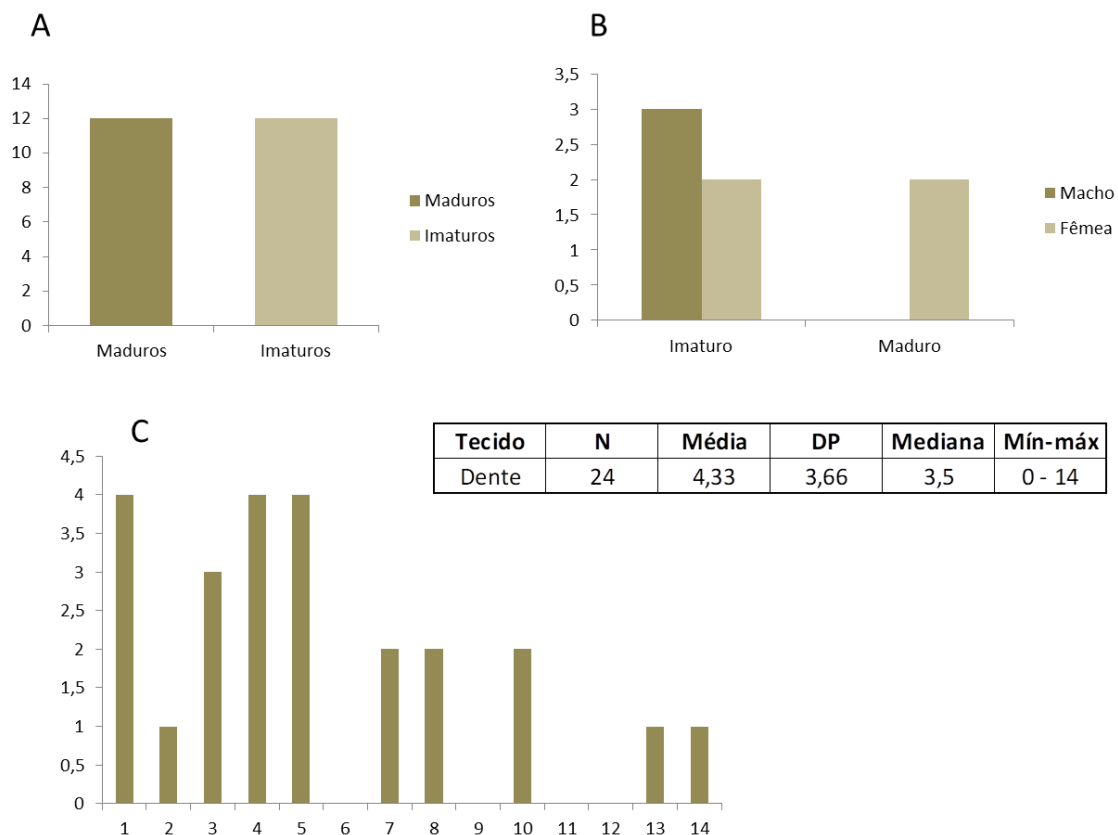
Figura 41: Distribuição dos indivíduos machos e fêmeas de boto-cinza (*S. guianensis*) coletados no Espírito Santo nos Anos 1, 2, 3, 4 e 5 do PMBA/Fest (N=167) em relação às classes de maturidade reprodutiva, conforme determinado por A) idade e B) maturidade gonadal. Observa-se maior frequência de indivíduos machos e de indivíduos maduros, com idade média de 12,44 anos para fêmeas e 10,85 anos para machos (em B a maior frequência de fêmeas maduras e de imaturos machos possivelmente se deve a um artefato de amostragem, pois o conjunto de dados obtidos de gônadas é cerca de 50% menor em relação ao de dentes). C) As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 6 anos (imaturos)



Os dados indicam um aumento da idade média dos indivíduos encalhados em relação aos padrões Pré-rompimento relatados na literatura (Médias = 5,01 a 10,28; Azevedo et al., 2015; Carvalho et al., 2015, Lima et al., 2017). Esses resultados são preocupantes por indicarem que a população de botos-cinza da região tem maior mortalidade de indivíduos com alta capacidade reprodutiva, potencialmente afetando a persistência desta espécie na área.

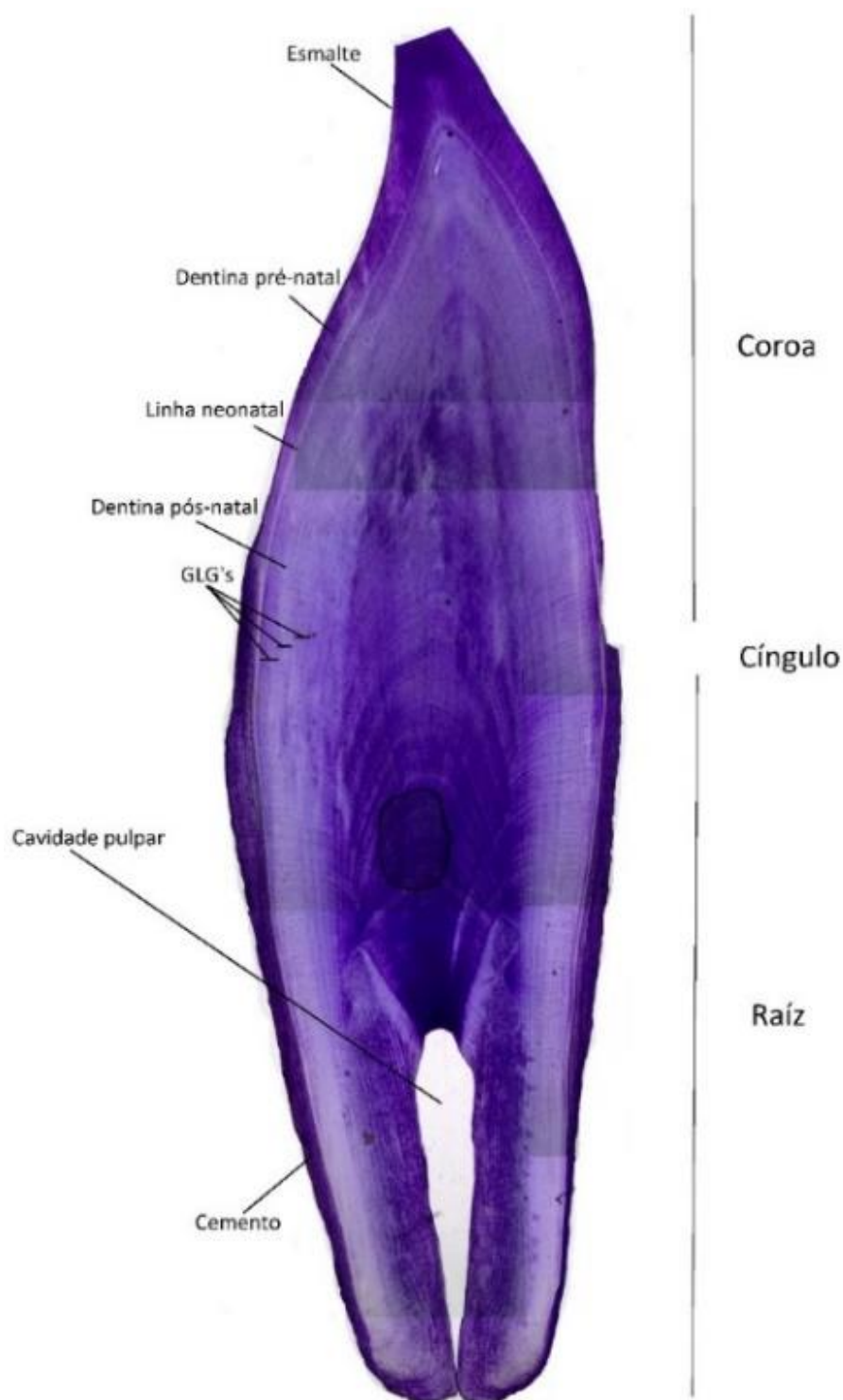
Figura 42: Distribuição dos indivíduos de toninha (*P. blainvillei*) coletados no Espírito Santo nos Anos 2, 3, 4 e 5 do PMBA/Fest em relação à maturidade reprodutiva a partir da idade (A, N=24), e da análise de gônadas (B, N=7). C) Distribuição dos indivíduos nas categorias de idade. A idade média é de 4,33 anos. Na maioria das análises, os indivíduos não foram separados por sexo devido à ausência dessa informação

Indicador Idade e Reprodução



As classes etárias mais frequentes nos encalhes são as até 4 anos (imaturos), porém no total há uma proporção igual entre maduros e imaturos.

Figura 43: 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.

2.7 ÍNDICES DE DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE CETÁCEOS

Quadro 18: Índices de estruturação genética mitocondrial (Fst par-a-par e AMOVA) do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*). Valores estatisticamente significativos estão indicados com asteriscos, $P < 0,05$, e destacados em cinza

Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)					
Estruturação Espacial					
Fst par-a-par ($P < 0,05$)					
	1	2	3		
1. Norte (N= 94)	-				
2. Central (N= 214)	0,144	-			
3. Extremo Sul (N= 61)	0,000*	0,000*	-		
AMOVA ($P < 0,05$)					
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	
Entre populações	1	5,767	0,05346 Va	14,17	
Dentro das populações	367	118,875	0,32391 Vb	85,83	
Total	368	124,642			
Fst	0,141*				
P-Value	0,000				
Estruturação Temporal					
Fst par-a-par ($P < 0,05$)					
	1	2			
1. Pré-rompimento (N= 118)	-				
2. Pós-rompimento (N= 251)	0,258*				
AMOVA ($P < 0,05$)					
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	
Entre populações	1	16,764	0,10260 Va	25,87	
Dentro das populações	367	108	0,29395 Vb	74,13	
Total	368	124,642	0,39654		
Fst	0,258*				
P-value	0,000				
Estruturação Espaço-Temporal					
Fst par-a-par ($P < 0,05$)					
	1	2	3	4	5
1. Norte-Pré (N=21)	-				
2. Central-Pré (N=69)	0,061*	-			
3. Extremo Sul-Pré (N=28)	0,059*	0,056*	-		
4. Norte-Central-Pós (N=218)	0,407*	0,340*	0,369*	-	
5. Extremo Sul-Pós (N=33)	0,358*	0,293*	0,283*	0,375*	-
AMOVA ($P < 0,05$)					
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	
Entre populações	4	26.998	0,11741 Va	30,96	
Dentro das populações	364	95.289	0,26178 Vb	69,04	
Total	368	122.287	0,37919		
Fst	0,309*				
P-Value	0,000				

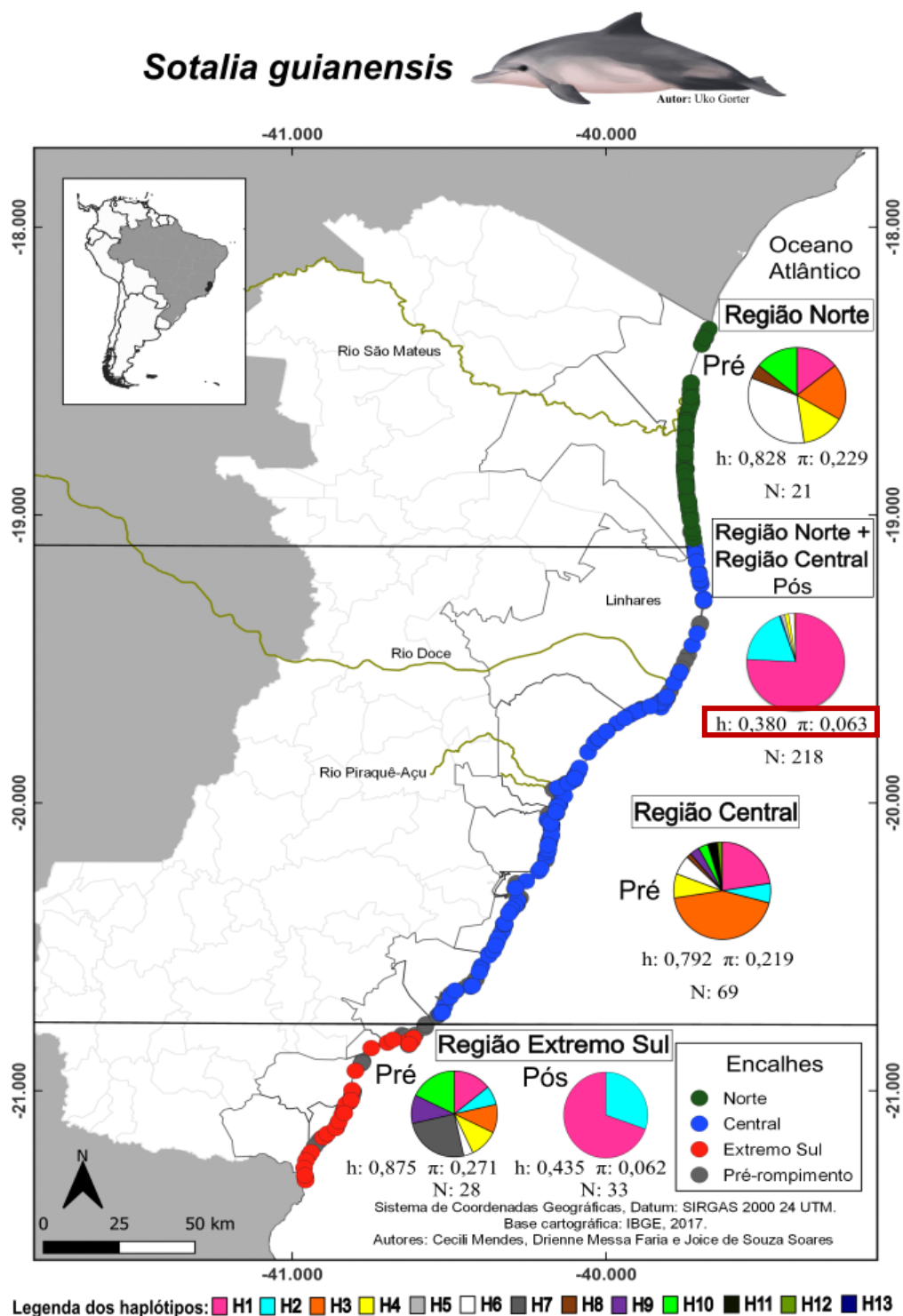
No total foram avaliados 371 indivíduos de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados ao longo de todo o litoral do Espírito Santo, antes (Pré-rompimento) e após (Pós-rompimento) o rompimento da barragem de Fundão, incluindo regiões criticamente impactadas, como a foz do Rio Doce e norte do Espírito Santo, e regiões do sul do estado. Os valores encontrados indicam a presença de duas populações regionais (Região Norte-Central e Região Extremo Sul) e duas populações temporais (Pré-rompimento e Pós-rompimento). É possível observar a presença das seguintes populações levando-se em consideração o espaço e o tempo: Norte-Pré, Central-Pré, Norte-Central-Pós, Extremo Sul-Pré, Extremo Sul -Pós.

Quadro 19: Índices de estruturação genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em 10 locos microssatélites (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6). Valores de P podem ser observados entre parênteses, $P < 0,05$. Valores estatisticamente significativos estão indicados com asteriscos e destacados em cinza

Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)				
Estruturação Espacial				
Fst par-a-par				
	1	2		
1. Região Norte-Central (N=202)	-			
2. Região Extremo Sul (N=49)	0,043*	-		
AMOVA				
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
Total	501	158,558	0,32623	
Fst	0,043*			
P-Value	0,01			
Estruturação Temporal				
Fst par-a-par				
	Pré - rompimento	Pós - rompimento		
Pré - rompimento (N=88)	-			
Pós - rompimento (N=163)	0,578*	-		
AMOVA				
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
Total	501	158,558	0,46158	
Fst	0,578*			
P-Value	0			

No total foram avaliados 251 indivíduos de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados ao longo de todo o litoral do Espírito Santo, antes (Pré-rompimento) e após (Pós-rompimento) o rompimento da barragem de Fundão, incluindo regiões criticamente impactadas, como a foz do Rio Doce e norte do Espírito Santo, e regiões do sul do estado. Os valores encontrados indicam a presença de duas populações regionais Região Norte-Central e Região Extremo Sul, e duas populações temporais Pré-rompimento e Pós-rompimento, assim como evidenciado com marcadores mitocondriais.

Figura 44: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo. Amostras coletadas após o rompimento da barragem (Pós-rompimento) são indicadas por 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). As amostras coletadas antes do rompimento estão em cinza (Pré-rompimento). N = número de indivíduos; h = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica



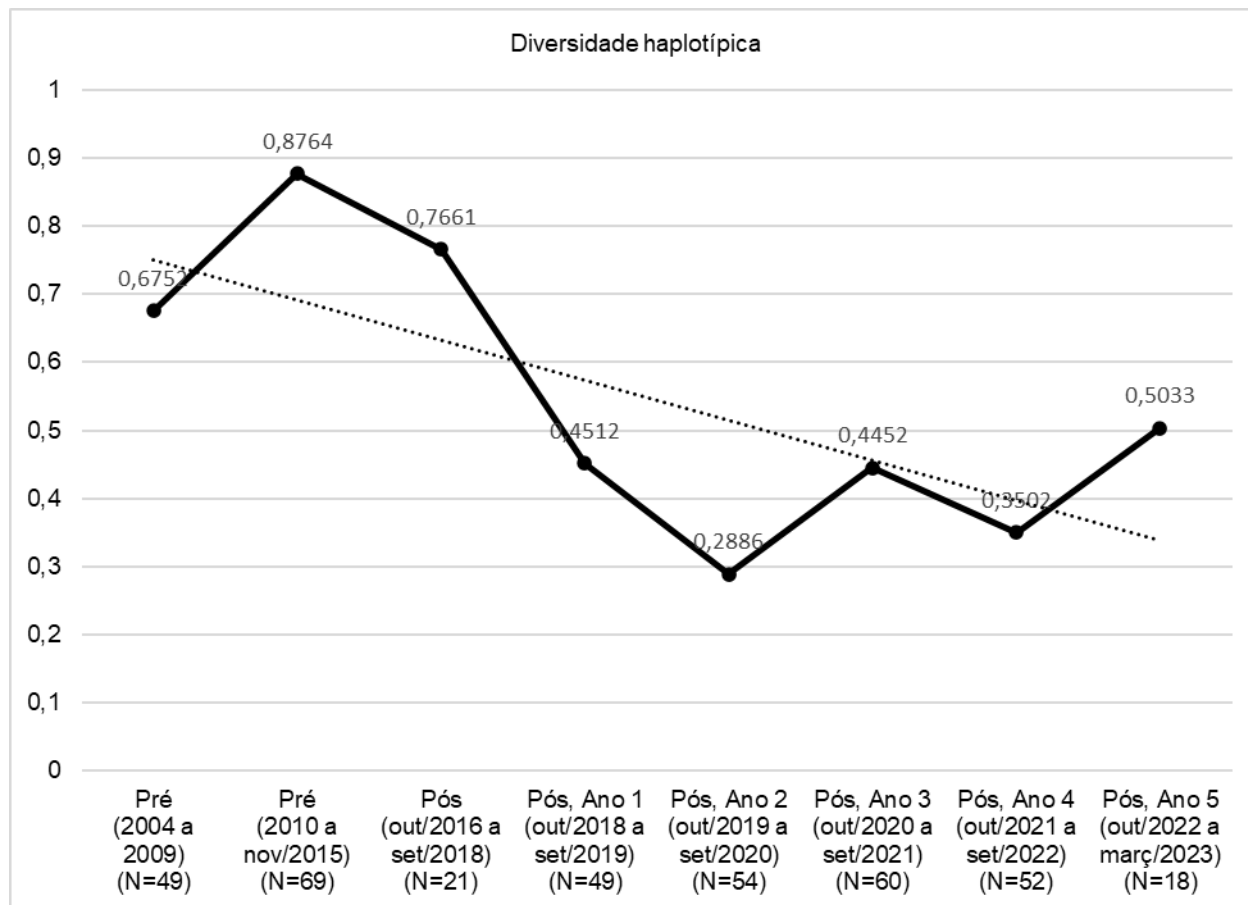
Para os 371 indivíduos de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) avaliados, é possível observar baixa diversidade genética haplotípica para a população Norte-Central ($h=0,380$) para o período Pós-rompimento. Para o período Pré-rompimento (Região Norte, $h=0,828$; Região Central, $h=0,792$) os valores dessas duas regiões separadas foram de moderados a altos. Os gráficos de pizza representam a proporção de haplótipos do DNA mitocondrial referente as populações levando-se em consideração o espaço e o tempo, cada cor refere-se a um haplótipo diferente. Para 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 a Região Extremo Sul e um para Região Norte-Central). Os gráficos de pizza evidenciam presença de maior quantidade de haplótipos para as regiões avaliadas no período Pré-rompimento da barragem e perda de haplótipos para o período Pós-rompimento. Para a Região Norte-Central, criticamente afetada, é possível observar a perda de praticamente metade dos haplótipos, seis haplótipos (H7, H8, H9, H10, H11, H12) com a manutenção de somente sete haplótipos, representados pelas cores rosa (H1), azul claro (H2), laranja (H3), amarelo (H4), cinza (H5), branco (H6) e azul escuro (H13). Para a Região Extremo Sul, os resultados também chamam atenção, pois é possível observar a manutenção de somente dois haplótipos, representados pelas cores rosa (H1) e azul claro (H2). No geral, é possível observar a perda de haplótipos exclusivos e aumento do número de indivíduos com os haplótipos mais comuns, representados pelas cores rosa (H1) e azul claro (H2). Essa perda de haplótipos reflete na menor diversidade genética encontrada para a região Norte-Central ($h=0,380$) para o período Pós-rompimento o que indica possível relação causal com a chegada do rejeito de minério no litoral do Espírito Santo o que aumenta a vulnerabilidade dessa espécie já ameaçada de extinção.

Quadro 20: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) em diferentes períodos e regiões avaliados: Número de indivíduos (N); n° de haplótipos (Nh); diversidade haplotípica (h); diversidade nucleotídica (π); D de Tajima, Fs de Fu. Para D de Tajima foi considerado $P < 0,05$ e para Fs de Fu $P < 0,02$. Valores estatisticamente significativos estão indicados com asteriscos e destacados em cinza. Menores valores encontrados estão destacados em negrito

Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)						
Diversidade Espacial						
	N	Nh	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Tajima's D	Fu's FS
1. Norte	94	7	0,578	0,108	-0,246	-1,761
2. Central	214	14	0,641	0,121	-0,627	-7,453*
2. Extremo Sul	61	9	0,771	0,165	0,555	-2,491
Total	369					
Diversidade Temporal						
	N	Nh	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Tajima's D	Fu's FS
1. Pré-rompimento	118	11	0,847	0,221	0,809	-1,754
2. Pós-rompimento	251	8	0,466	0,066	-1,103	-3,730
Total	369					
Diversidade Espaço-Temporal						
	N	Nh	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Tajima's D	Fu's FS
1. Norte-Pré	21	6	0,828	0,229	0,476	-0,793
2. Central-Pré	69	11	0,792	0,219	0,133	-3,415
3. Extremo Sul-Pré	28	8	0,875	0,271	2,225	-1,598
4. Norte-Central-Pós	218	6	0,381	0,063	-0,898	-2,372
5. Extremo Sul-Pré	33	2	0,435	0,062	1,161	1,425
Total	369					

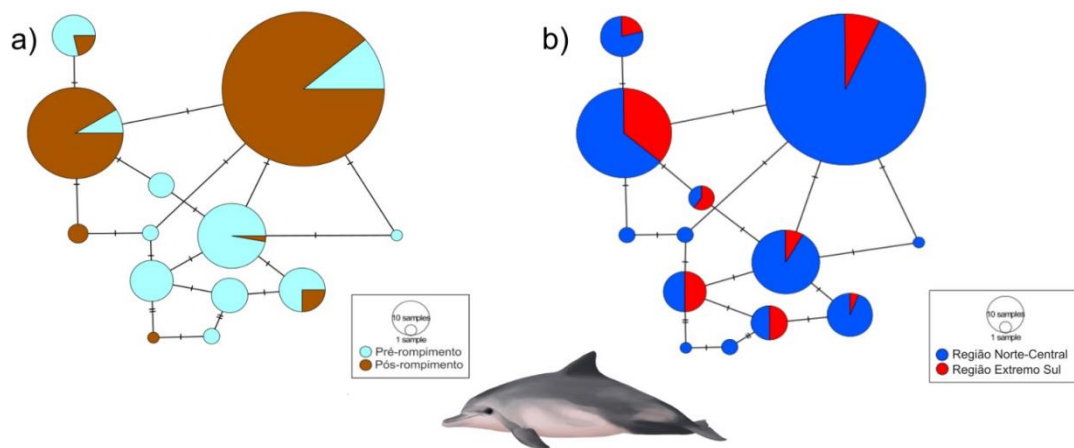
Para o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), os valores de diversidade genética foram moderados para as regiões avaliadas no geral. No entanto, os menores valores de diversidade genética foram encontrados para a região sob maior influência do Rio Doce e que recebeu o maior aporte do rejeito de minério após o rompimento da barragem, Região Norte-Central-Pós (N=218; Nh=6; h=0,381; π =0,063). Os menores valores foram encontrados também para a Região Norte (N=214; Nh=14; h=0,578; π =0,121) quando comparadas todas as regiões avaliadas. Vale destacar que a Região Central, sob maior influência do rejeito de minério, apresentou valores significativos de expansão populacional após um evento de gargalo visto os valores significativos de FS de Fu. Para o período Pós-rompimento (N=251; Nh=8; h=0,466; π =0,066) 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; π =0,12).

Figura 45: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo, de 2004 a março de 2023. Gráfico de valores de diversidade haplotípica (eixo Y) por ano de amostragem (eixo X), Pré-rompimento (Pré) e Pós-rompimento (Pós). A linha de tendência está representada pela linha tracejada



Nesse gráfico de diversidade genética mitocondrial ao longo dos anos de amostragem, é possível observar que há uma tendência de diminuição de diversidade genética (praticamente 50% de Pré-2004 a 2009 a Pós-Ano 4) e uma queda acentuada dos valores entre o período Pré-rompimento e Pós-rompimento da barragem. Essa queda de diversidade genética começa a ocorrer entre Pré (2010 a nov/2015) e Pós (out/2016 a set/2018), podendo indicar uma relação causal com a chegada do rejeio de minério no litoral do estado do Espírito Santo, e continua menor do que os valores Pré-rompimento da barragem de Fundão. Os valores de diversidade genética haplotípica do período Pós-Ano 5 (de outubro de 2022 a março de 2023) devem ser interpretados com cautela uma vez que a amostragem ainda não foi finalizada e pode refletir um valor superestimado dado o número amostral ainda incompleto.

Figura 46: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de botos-cinza (*Sotalia guianensis*). Rede de haplótipos baseada na análise de Median-Joining. Cada círculo corresponde a um haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência na população. Cores diferentes representam os diferentes haplótipos encontrados. Traços entre os haplótipos significam o número de passos mutacionais, número de bases nitrogenadas (A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina) que diferem 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-Central e Região Extremo Sul)



Para o boto-cinza, foram encontrados 13 haplótipos, sendo possível observar compartilhamento de haplótipos, tanto entre os períodos avaliados quanto entre as regiões. Para essa espécie são apresentadas duas redes de haplótipos uma vez que, ficou constatada diferenciação entre os períodos avaliados (Pré e Pós-rompimento) e as regiões avaliadas (Região Norte-Central e Região Extremo Sul). Os haplótipos exclusivos (círculos de apenas uma cor) apareceram majoritariamente para o período Pré-rompimento e Região Norte-Central. Pode-se observar maior número de haplótipos para o período Pré-rompimento.

Quadro 21: Índices de diversidade genética nuclear de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) em 10 locos microssatélites (Sgui 002, Sgui 003, Sgui 005, Sgui 006, Sgui 011, Sgui 016, Sgui 017, GATA98, PPHO142, MK6). Número de alelos (K), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (R_a), índice de endogamia (FIS).

Valores de coeficiente de endogamia (FIS), com correção de Bonferroni, que não foram significativos ($P < 0,005$)

Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)						
Loco	K	H_o	H_e	PIC	R_a	FIS
Sgui-002	6	0,006	0,546	0,546	2,754	0,005
Sgui003	7	0,090	0,732	0,732	4,791	0,005
Sgui005	4	0,000	0,344	0,344	2,676	0,005
Sgui006	6	0,500	0,833	0,833	6,000	0,044
Sgui011	7	0,000	0,692	0,856	4,381	0,005
Sgui016	4	0,000	0,452	0,692	2,000	0,005
Sgui017	12	0,704	0,746	0,452	2,955	0,005
GATA98	10	0,004	0,623	0,705	5,067	0,138
PPHO142	4	0,007	0,609	0,553	3,576	0,005
MK6	9	0,007	0,609	0,530	2,986	0,005
Média	6,818	0,120	0,612	0,617	3,630	0,005

Para os 251 indivíduos de botos-cinza avaliados (Pré e Pós-rompimento da barragem de Fundão), os valores encontrados evidenciam índices de diversidade genética baixos (heterozigosidade observada média= 0,120; heterozigosidade esperada média= 0,612, Riqueza alélica média=3,630; Número de alelos médio=6,818).

Quadro 22: Índices de estruturação genética mitocondrial (Fst par-a-par e AMOVA) do marcador D-loop de toninhas (*Pontoporia blainvillei*)

Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)				
Estruturação Espacial				
Fst par-a-par (P<0,05)				
	1	2	3	
1. Região Norte (N=40)	-			
2. Região Central (N=37)	-0,001			
AMOVA (P<0,05)				
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	0,0012	-0,00003 Va	-0,2
Dentro das populações	75	0,975	0,01300 Vb	100,20
Total	76	0,987	0,07195	
Fst	-0,001			
P-Value	1,000			
Estruturação Temporal				
Fst par-a-par (P<0,05)				
	1	2		
1. Pré-rompimento (N=28)	-			
2. Pós-rompimento (N=49)	-0,020			
AMOVA (P<0,05)				
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	0,023	0,00028 Va	2,11
Dentro das populações	75	0,964	0,01286 Vb	97,89
Total	76	0,987	0,0482	
Fst	0,021			
P-Value	0,365			

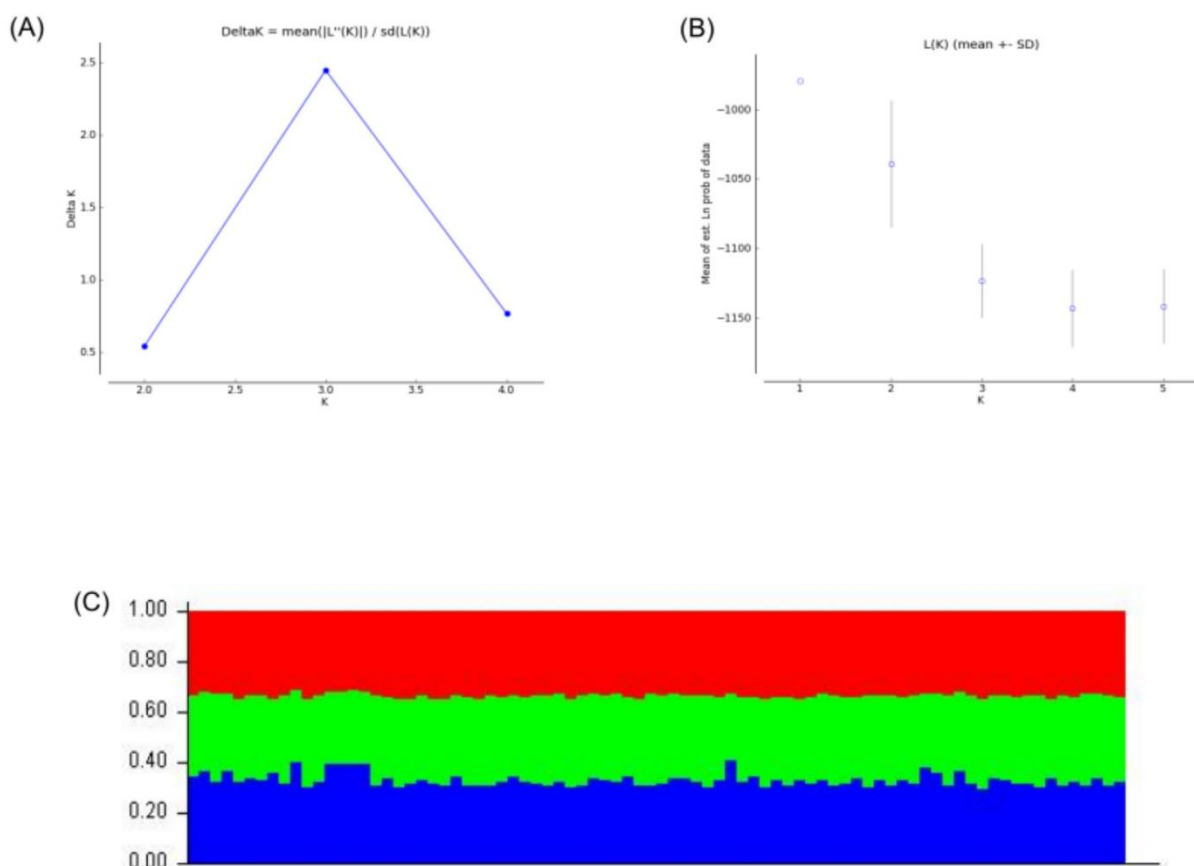
No total foram avaliados 77 indivíduos da espécie *Pontoporia blainvillei* encontrados mortos encalhados ao longo de todo o litoral do Espírito Santo, antes (Pré-rompimento) e após (Pós-rompimento) o rompimento da barragem de Fundão, incluindo regiões criticamente impactadas, como a foz do Rio Doce e norte do Espírito Santo, e regiões do sul do estado. Três indivíduos encontrados mortos encalhados na Região Extremo Sul foram excluídos dessas análises por se tratar de uma região que não é uma área de ocorrência para as toninhas. Foi possível detectar ausência de valores estatisticamente significativos. Sendo assim, há a presença de somente uma população de toninhas para todo o litoral do Espírito Santo.

Quadro 23: Índices de estruturação genética nuclear de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) em seis locos microssatélites (EV5Pma, FCB2a, FCB5a, FCB17a, D22a, EV76Mna). Valores de P podem ser observados entre parênteses, $P < 0,05$. Valores estatisticamente significativos estão indicados com asteriscos e destacados em cinza

Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)				
Estruturação Espacial				
Fst par-a-par				
	1	2		
1. Região Norte (N=40)	-			
2. Região Central (N=37)	-0,006	-		
AMOVA				
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	1,1256	0,00525	0,64
Dentro das populações	164	134,539	0,82036	99,36
Total	165	135,795	0,82561	
Fst	0,006			
P-Value	0,231			
Estruturação Temporal				
Fst par-a-par				
	Pré - rompimento	Pós - rompimento		
Pré - rompimento (N=28)	-			
Pós - rompimento (N=49)	0,028*			
AMOVA				
Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre populações	1	2,653	0,02341 Va	2,80
Dentro das populações	164	133,142	0,81184 Vb	97,20
Total	165	135,795	0,82561	
Fst	0,028*			
P-Value	0,014			

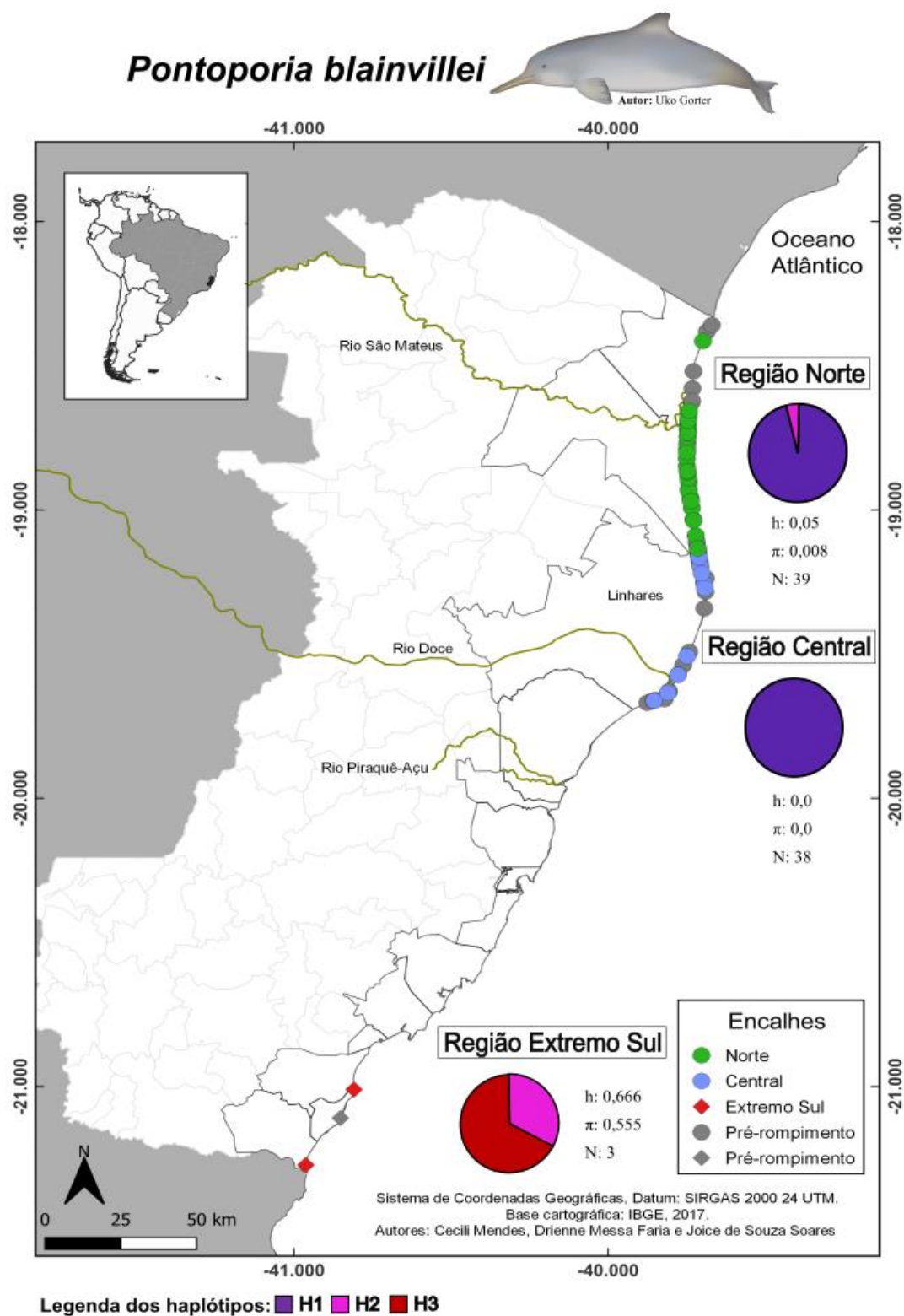
No total foram avaliados 77 indivíduos de toninhas, os três indivíduos da Região Extremo Sul também foram excluídos dessas análises. Foi possível observar presença de somente uma população em todo o litoral do Espírito Santo, como evidenciado com o uso de marcadores mitocondriais. Entretanto, foi possível observar diferenciação entre os indivíduos dos períodos Pré e Pós-rompimento, porém, esse resultado precisa ser interpretado com cautela visto que o número amostral de um período para o outro é quase o dobro.

Figura 47: Índices de estruturação genética nuclear de toninha (*Pontoporia blainvillei*) em seis locos microssatélites (EV5Pma, FCB2a, FCB5a, FCB17a, D22a, EV76Mna). 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 *Pontoporia blainvillei* 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 K indicar três possíveis clusters (letra A), o gráfico da média a probabilidade log (Lk) (letra B) e as probabilidades de atribuição de cada indivíduo a cada cluster (letra C) indicam a presença de somente uma população.

Figura 48: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) encontrados mortos encalhados nas praias do litoral do Espírito Santo. As amostras coletadas no período Pré-rompimento das Regiões Norte e Central estão indicadas por círculos cinzas, já as do período Pós-rompimento estão indicadas por círculo coloridos de verde claro para a Região Norte e azul claro para a Região Central. Especialmente para a Região Extremo Sul, as amostras coletadas estão indicadas por losangos, coloridos de vermelho para o período Pós-rompimento e de cinza para o período Pré-rompimento. N = número de indivíduos; h = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica



Para o total de 80 indivíduos da espécie de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) avaliados, é possível observar baixa diversidade genética para todas as regiões de amostragem. Os gráficos de pizza representam as proporções de haplótipos do DNA mitocondrial encontrados para cada região de amostragem. É possível observar a presença de somente três haplótipos para as toninhas do Espírito Santo, sendo um haplótipo mais representativo, colorido de roxo (H1) (encontrado em 95% dos indivíduos). Cada cor refere-se a um haplótipo diferente. É possível observar a presença de um haplótipo exclusivo para a Região Extremo Sul, o haplótipo H3, no entanto, sabe-se que a região Extremo Sul não é uma região de ocorrência conhecida para as toninhas. As amostras provenientes de encalhes de indivíduos da Região Extremo Sul foram mantidas aqui, mas os encalhes de toninhas registrados para essa região serão investigados cautelosamente.

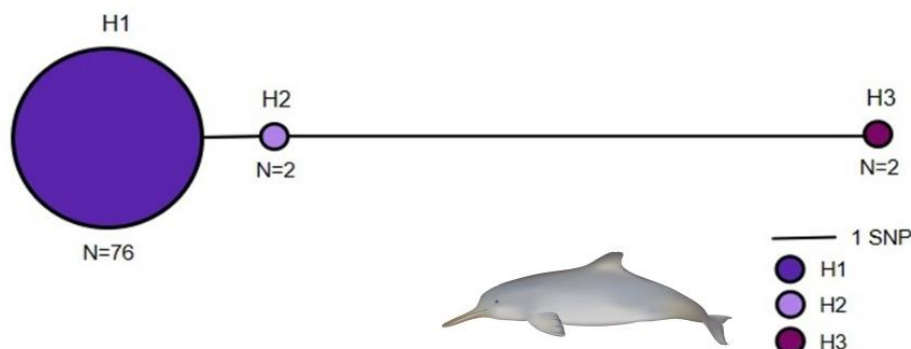
Quadro 24: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) em diferentes períodos e regiões avaliados: Número de indivíduos (N); n° de haplótipos (Nh); diversidade haplotípica (h); diversidade nucleotídica (π); D de Tajima, Fs de Fu. Valores entre parênteses são valores de p. Para D de Tajima foi considerado $P < 0,05$ e para Fs de Fu $P < 0,02$.

Valores estatisticamente significativos estão indicados com asteriscos e destacados em cinza

Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)						
Diversidade Espacial						
	N	Nh	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Tajima's D	Fu's FS
1. Norte	40	2	0,05	0,008	-1,124	-1,450*
2. Central	37	1	0,00	0,00	-	-
Total (1 população)	77	2	0,026	0,025	-1,056	-1,998*
Diversidade Temporal						
	N	Nh	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Tajima's D	Fu's FS
1. Pré-rompimento	28	2	0,071	0,00	-1,151	-1,154*
2. Pós-rompimento	49	1	0,000	0,00	-	-
Total	77					

Para a toninha, *Pontoporia blainvillei*, é possível observar baixa diversidade genética para a população ($N=77$; $Nh=2$; $h=0,026$; $\pi=0,025$), destacando que essa espécie está criticamente ameaçada de extinção. É possível observar valores FS de Fu foram significativos e que essa população pode se encontrar em expansão após um evento de gargalo.

Figura 49: Índices de diversidade genética mitocondrial do marcador D-loop de toninhas (*Pontoporia blainvillei*). Rede de haplótipos baseada na análise de Median-Joining. Cada círculo corresponde a um haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência na população. Cores diferentes representam os diferentes haplótipos encontrados. Traços entre os haplótipos significam o número de passos mutacionais, número de bases nitrogenadas (A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina) que diferem entre os haplótipos



Para a espécie *Pontoporia blainvillei* é possível observar a presença de três haplótipos somente, o que reflete nos baixos valores de diversidade haplotípica encontrados. Há um haplótipo principal (H1), observado em 95% da população. A presença do haplótipo 3 deve ser interpretada com cautela visto que está presente nos dois indivíduos que foram encontrados mortos encalhados na Região Extremo Sul, região que não é reconhecida como área de ocorrência dessa espécie.

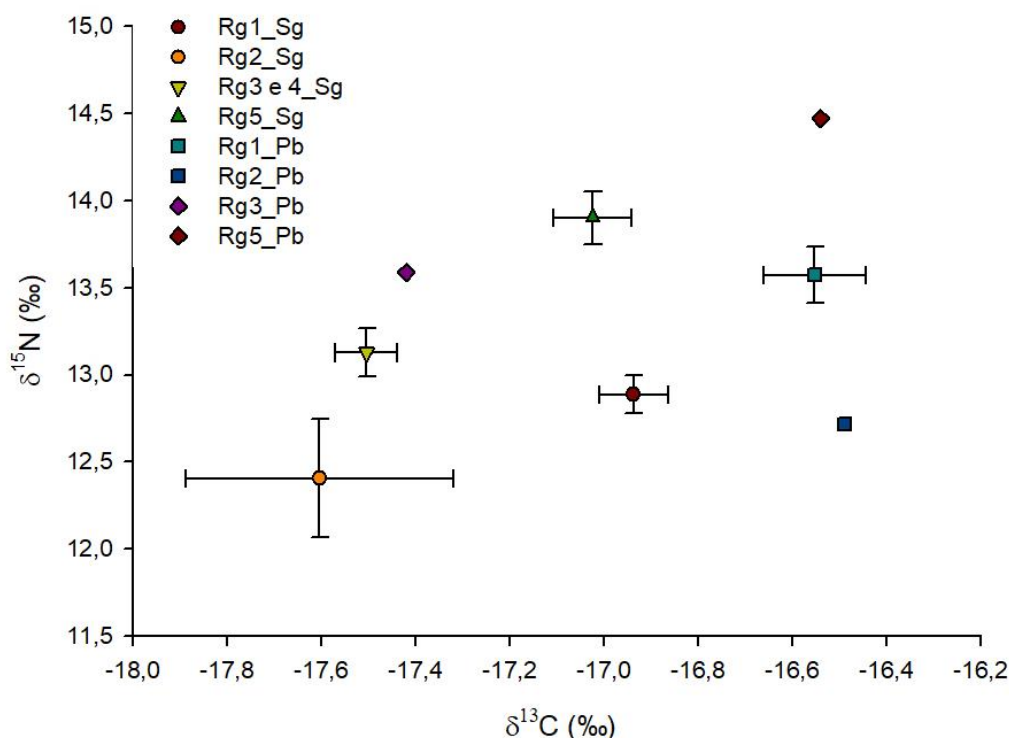
Quadro 25: Índices de diversidade genética nuclear de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) em seis locos microssatélites. Número de alelos (K), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS). *Valores estatisticamente significativos do coeficiente de endogamia (FIS), com correção de Bonferroni, ($P < 0,00625$)

Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)						
Loco	K	Ho	He	PIC	Ra	FIS
EV5Pma	7	0,666	0,685	0,624	6,178	0,027
FCB2a	3	0,500	0,520	0,399	2,912	0,040
FCB5a	6	0,367	0,605	0,548	5,313	0,395*
FCB17a	8	0,500	0,641	0,604	7,674	0,221*
D22a	3	0,373	0,445	0,389	3,000	0,162
EV76Mna	9	0,428	0,730	0,682	9,000	0,416*
Média	6,0	0,472	0,604	0,541	5,679	

Para a população total de toninhas (N=80), Pré e Pós-rompimento da barragem de Fundão, os valores encontrados evidenciam índices de diversidade genética baixos (heterozigosidade observada média= 0,472; heterozigosidade esperada média= 0,604, Riqueza alélica média=5,679; Número de alelos médio=6,0). Valores do teste de Wilcoxon para eventos passados de gargalo populacional baseado em frequências alélicas revelaram que a população de toninhas do litoral do estado do Espírito Santo passou por evento de gargalo com base no modelo mutacional SMM ($P = 0.04688$), $P < 0,05$.

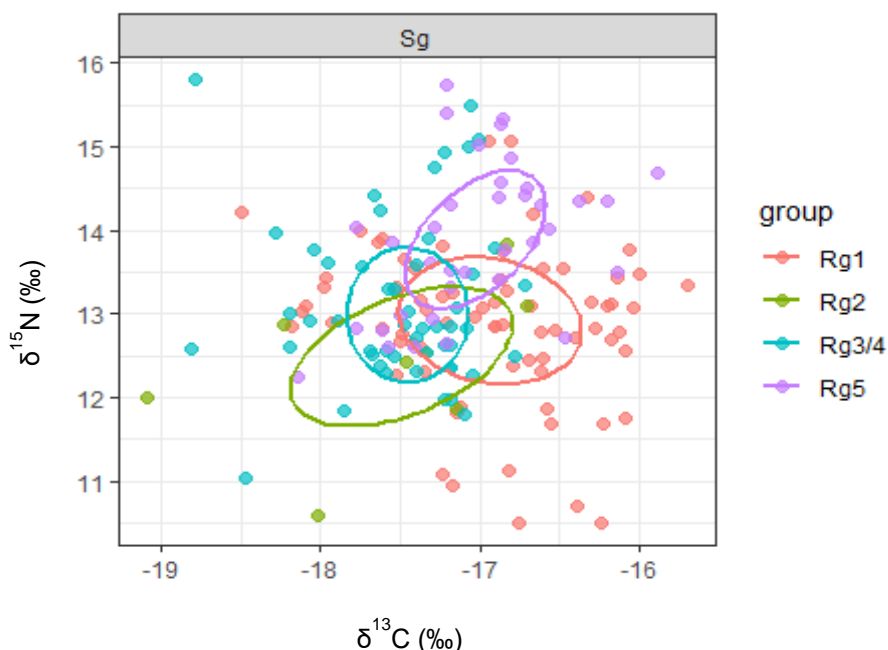
2.8 RAZÃO ISOTÓPICA DE C E N EM AMOSTRAS DE *SOTALIA GUIANENSIS* E *PONTOPORIA BLAINVILLEI*

Figura 50: Média e erro padrão das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em botos-cinza (*Sotalia guianensis*- Sg) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*- Pb) coletados ao longo da costa do Espírito Santo ao longo dos quatros anos do monitoramento, agrupados em quatro regiões amostrais (Rg 1, 2, 3/4 e 5) e (Rg 1, 2, 3 e 5), respectivamente (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES)



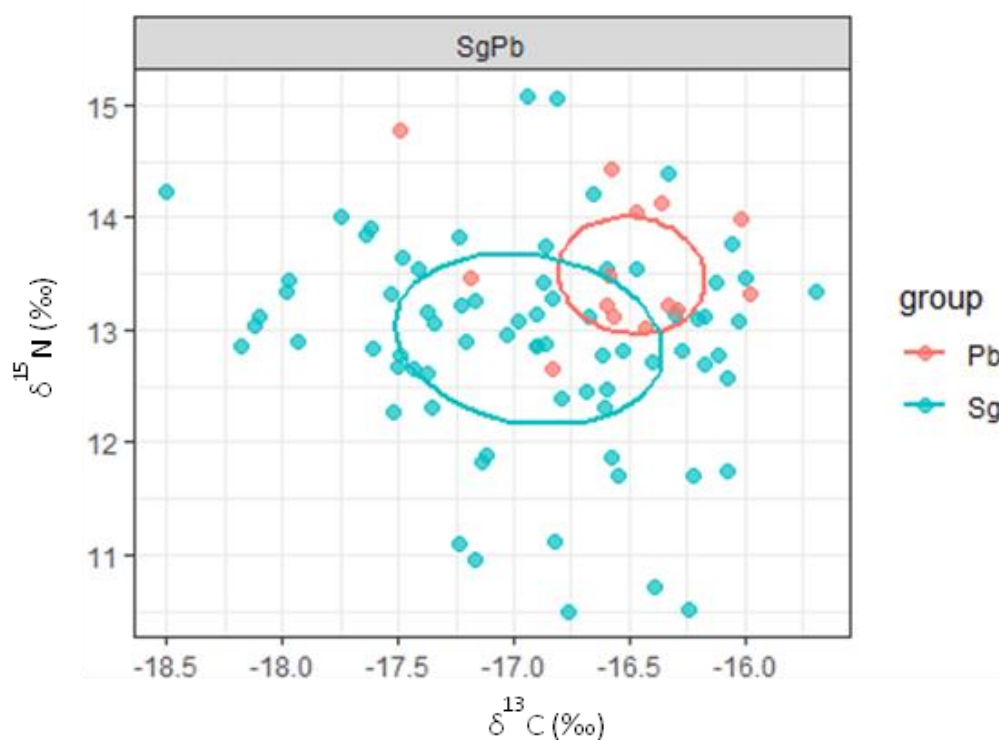
Foram usados apenas os resultados dos indivíduos adultos e juvenis, com base na maturação sexual e idade dentária, e excluindo-se os filhotes, resultando em 186 espécimes de boto-cinza (18 indivíduos foram coletados no período pré-rompimento) e 17 de toninhas. O gráfico mostra a separação em possíveis grupos ecológicos distintos do boto-cinza coletados entre os anos um e cinco de monitoramento. 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, $p = 0,00001$) e na região 5 ($p=0,004$), enquanto que o valor de $\delta^{15}\text{N}$ na região 5 foi maior em relação à todas as demais ($p < 0,005$.) 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 (SM) e Rio Ipiranga, enquanto que os indivíduos da região 2 se alimentam na área sob influência do Rio Doce (RD). 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. Para a toninha, foi analisado apenas um indivíduo nas regiões 2, 3 e 5, o que limita a análise para a espécie.

Figura 51: Elipses isotópicas padrão de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ dos botos-cinza coletados ao longo dos cinco anos de monitoramento em cada região amostral da costa do Espírito Santo (1= São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES)



O nicho isotópico dos animais de cada região, estimado pela SEAc (área da elipse padrão corrigida, utilizando-se 40% dos dados) foi de $1,8 \text{ ‰}^2$ para a Região 1 – São Mateus (Rg1); $2,5 \text{ ‰}^2$ para a região 2 – Rio Doce (Rg2); $1,5 \text{ ‰}^2$ para a Região 3/4 – Barra do Riacho e Metropolitana (Rg3/4) e $1,3 \text{ ‰}^2$ para a Região 5 - Extremo Sul (Rg5). Com o acréscimo de novos indivíduos ao n amostral total, observou-se que os indivíduos da região amostral 2 agora ocupam o maior nicho ecológico dentre todos os animais amostrados. Houve sobreposição de nicho isotópico entre todas as regiões sendo a maior encontrada entre os animais das regiões 2 e 3/4 (30% de sobreposição), seguindo entre os espécimes das regiões 1 e 2 (25%). 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. Os animais da região 5 (Extremo sul) foram os que apresentaram a menor sobreposição de nicho isotópico em relação as demais áreas, variando entre 6 % (entre regiões 2 e 3/4) e 18 % (entre as regiões 1 e 5), apontando distinção no uso do habitat da espécie na referida região. 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 resultados evidenciam possíveis grupos ecológicos distintos na área de estudo, mas com compartilhamento parcial na área de forrageio e/ou das espécies de presas que se alimentam. O monitoramento contínuo e o aumento do número de amostras têm possibilitado o entendimento cada vez mais preciso acerca de como esses animais utilizam a costa do estado do Espírito Santo para forrageio, e a continuidade do estudo é necessário para conhecer o grau de conectividade, isolamento e fidelidade de sítio em cada região.

Figura 52: 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 (1-São Mateus) ao longo dos cinco anos de monitoramento



As outras regiões não foram consideradas na análise devido ao baixo n amostral das toninhas (n=1 nas regiões 2, 3 e 5). 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, sugerindo uma ecologia alimentar mais especialista

Quadro 26: Valores médio \pm desvio padrão de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ nos botos-cinza coletados nos cinco anos de monitoramento em cada região amostral ao longo da costa do Espírito Santo (1=

São Mateus; 2=Rio Doce; 3/4= Barra do Riacho e Metropolitana; 5= Extremo Sul do ES)

	Pré-Rompimento			ANO 1			ANO 2			ANO 3			ANO 4			ANO 5		
	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
1	1	-17,2	12,5	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	3	-17,1 \pm 0,5	13,1 \pm 0,8
2	3	-16,8 \pm 0,2	13,3 \pm 1,4	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	0	-	-	0	-	-
3/4	5	-17,3 \pm 0,1	13,2 \pm 0,9	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	15	-17,6 \pm 0,4	13,1 \pm 1,0	4	-18,1 \pm 0,5	13,3 \pm 0,9
5	9	-17,0 \pm 0,3	13,7 \pm 0,8	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	2	-18,0 \pm 0,3	12,5 \pm 0,4
Todos	18	-17,1 \pm 0,3	13,4 \pm 0,9	40	-17,3 \pm 0,7	12,8 \pm $\pm 1,1$	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	9	-17,8 \pm 0,7	13,1 \pm 0,8

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 ‰) e aqueles no Ano 3 (-16,8 \pm 0,6 ‰; teste HSD para n desiguais, $p=0,008$) e, também, entre o Ano 3 (-16,8 \pm 0,6 ‰) e o Ano 4 (-17,3 \pm 0,5‰; $p=0,001$) e o Ano 5 (-17,8 \pm 0,7‰; $p=0,007$). 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 $\delta^{15}\text{N}$ entre os cinco anos de monitoramento na região 1 (ANOVA, $p > 0,05$). Já a região 3/4 apresentou maior valor de $\delta^{13}\text{C}$ no Ano 3 (-17,2 \pm 0,3‰) em relação ao Ano 5 (-18,1 \pm 0,5‰; Teste HSD para n desiguais, $p=0,03$) e a região 5 apresentou um menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ no Ano 3 (-16,4 \pm 0,3‰) em relação aos demais anos de monitoramento e ao Pré-monitoramento ($p < 0,01$). 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.

3 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, Rio de 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) (Cetacea, 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 Stadistic software package for education and analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9 pp, 2001.

HOHN, A.A.; CHIVERS, S.J.; BARLOW, J. Reproductive maturity and seasonality of male spotteddolphins *Stenella attenuata*, in the easteran tropical pacific. *Marine Mammals Science*, v.1, n.4, p. 273-293, 1985.

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

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. PPCB, 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 espectrofometria 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>.

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.