

TERMO DE REFERÊNCIA 4

PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA

ANEXO 6 - MONITORAMENTO DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE, PLATAFORMA CONTINENTAL E ÁREAS PROTEGIDAS ADJACENTES

1. Contexto

Diversos estudos têm mostrado que a região ao redor da foz do Rio Doce e plataforma continental adjacente é uma área importante para desova, reprodução e alimentação de diversas espécies ameaçadas de extinção, sobretudo o Boto-cinza (*Sotalia guianensis*), a Toninha (*Pontoporia blainvillei*), a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*), a Tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), a Tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), e aves marinhas, como o Rabo-de-palha-de-bico-vermelho (*Phaethon aethereus*), o Rabo-de-palha-de-bico-laranja (*Phaethon lepturus*), o Trinta-réis-de-bico-vermelho (*Sterna hirundinacea*), o Tesourão-pequeno (*Fregata ariel*), o Tesourão-grande (*Fregata minor*), o Petrel-de-trindade (*Pterodroma arminjoniana*) e o Albatroz-de-bico-amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*) (MMA, 2014).

O entendimento dos padrões de uso e deslocamento dessas espécies em áreas possivelmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce é de fundamental importância para a aplicação de ações mitigadoras, caso sejam detectadas ameaças a essas espécies em áreas com maior grau de impacto.

O enfoque da realização de observações diretas a partir de plataformas móveis semi-autônomas como VANTs (Veículos aéreos não tripulados, também conhecido como Drones) e veículos tripulados tem ganhado atenção da comunidade científica por permitir a obtenção de informações pouco disponíveis pelos outros enfoques e por terem se tornado progressivamente mais acessíveis devido ao avanço tecnológico.

Os vertebrados marinhos podem ainda ser utilizados como amostradores do ambiente, ao usarem-se equipamentos de sensoriamento remoto. Através destes equipamentos também é possível identificar áreas importantes para a alimentação das espécies, áreas usadas mais intensamente e ainda inferir mudanças no comportamento alimentar ocorridas devido a mudanças nas condições bióticas e abióticas, bem como impactos antrópicos em suas áreas de uso.

O monitoramento dos encalhes de cetáceos, aves e quelônios bem como a coleta e estudo sistemático de tecidos para análises genéticas, de contaminantes e de hábitos alimentares é de fundamental importância para avaliar a saúde das populações que ocupam os diversos habitats atingidos pelos impactos do acidente na região costeira.

O número de populações, o tamanho destas, bem como, a diversidade genética de cada uma delas no litoral do Espírito Santo podem influenciar no efeito causado por um impacto ambiental intenso, que pode ser extinções locais, ou até mesmo extinção da espécie em casos extremos. Níveis moderados a elevados de variabilidade geralmente

conferem maior probabilidade de sobrevivência de uma população a médio e longo prazos (Frankham *et al.*, 2002). Em espécies ameaçadas, as populações apresentam-se reduzidas e muitas vezes isoladas, o que pode levar a uma consequente perda de variabilidade pela redução do fluxo gênico (Frankham *et al.*, 2002). Desta forma, torna-se importante buscar a manutenção dos níveis de variabilidade das populações. Adicionalmente, a partir da variabilidade genética intrapopulacional é possível estimar o tamanho populacional efetivo, tanto ao longo da história evolutiva daquela população quanto no passado mais recente (últimas gerações, também chamado “contemporâneo”); analisar flutuações demográficas ao longo do tempo; testar cenários de expansão ou de contração populacional.

Outra informação importante para compreensão dos impactos a que uma população está exposta é a concentração de poluentes, como elementos-traço (Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As), organoclorados (PCBs e pesticidas clorados) e organobromados (PBDEs), pois há evidências de que altas concentrações desses compostos podem causar efeitos deletérios neurológicos, endócrinos, imunológicos e promotores de câncer (Who 1993, Gregory & Cyr 2000, Reijnders 2000, ATSDR 2002). Concentrações de alguns desses poluentes já foram determinadas nas toninhas ao longo da sua distribuição, revelando um quadro preocupante de contaminação (Lailson-Brito *et al.*, 2011, Alonso *et al.*, 2012, Dorneles *et al.*, 2013). Entretanto, os níveis de contaminação das toninhas do Espírito Santo ainda são pontuais e pouco conhecidos.

Alguns micropoluentes (e.g. elementos-traço, bifenilas policloradas, difenil éteres polibromados) estão sujeitos ao aumento das suas concentrações ao longo dos níveis tróficos, alcançando concentrações elevadas em organismos topos de cadeia (Renzoni *et al.*, 1998, Gray 2002). O processo de transferência trófica com consequente aumento das concentrações de poluentes nos organismos de um nível trófico para o nível consecutivo pode ser denominado de biomagnificação (Walker *et al.*, 1996). Desta maneira, o estudo das relações tróficas associados as análises ecotoxicológicas de organismos marinhos podem revelar informações importantes sobre a qualidade dos ecossistemas marinhos, assim como contribuir para a compreensão dos processos de bioacumulação e biomagnificação de micropoluentes.

Além da possibilidade de algum tipo de doença ou efeito de contaminação promover os encalhes e/ou morte dos cetáceos e aves, no litoral brasileiro a toninha, o boto-cinza e espécies ameaçadas de aves (e.g. albatrozes e petréis) apresentam um alto índice de captura incidental nas atividades pesqueiras, o que provoca uma alta mortalidade e encalhe desses animais durante todo o ano. Com o desastre no rio Doce este índice de mortalidade e encalhe pode aumentar, já que as interações com as atividades pesqueiras poderiam ser intensificadas com a diminuição de recursos e busca por esses animais de novas áreas de alimentação.

2. Objetivos:

- 1) Avaliar e monitorar, por um período de 5 anos a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.

- 2) Determinar e monitorar por um período de 5 anos, associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 3) Monitorar, por um período de 5 anos, os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível causa *mortis*.
- 4) Descrever, por um período de 5 anos, a partir de análises moleculares a prevalência de patógenos das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus* na área de estudo para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.
- 5) Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de cetáceos e tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo num período de 10 anos.
- 6) Monitorar a evolução das dosagens de contaminantes e histopatologias em tecidos de cetáceos e aves marinhas em encalhes e de aves marinhas vivas na área de estudo num período de 5 anos.
- 7) Descrever, por um período de 5 anos, a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis de *S. guianensis* e *P. blainvillei*, e das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus*.
- 8) Estimar a idade dos cetáceos e quelônios, de sua primeira maturação e analisar a taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias ao longo de 5 anos.
- 9) Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES: identificar possíveis mudanças durante 5 anos.
- 10) Monitorar as áreas de desova de *Caretta*, *Caretta* e *Dermochelys coriácea* ao redor da foz do Rio Doce, incluindo o comportamento reprodutivo dessas espécies, distribuição espacial e temporal de ninhos, sucesso reprodutivo e efeito de contaminantes sobre a saúde de fêmeas e filhotes (neonatos).
- 11) Avaliar o efeito da presença de contaminantes provenientes dos rejeitos de mineração ou que foram mobilizados pelo fluxo de rejeitos sobre a saúde das tartarugas marinhas e sua eficiência reprodutiva.

3. Metodologia de Coleta e Análise

Distribuição e abundância (objetivo 1)

Para avaliação da distribuição, abundância e área de vida (objetivo 1), deverão ser utilizados censos aéreos com aeronaves tripuladas. Deverão ser realizados dois censos por ano, sendo um destinado a avaliação de pequenos mamíferos e tartarugas (toninha, boto-cinza, tartarugas marinhas em geral) e outro destinado a avaliação de abundância de baleia-jubarte.

Os sobrevoos deverão ser realizados usando o método de amostragem por distância em transectos lineares (Buckland *et al.*, 2001). O método de transecções lineares assume que a densidade de animais na área amostrada, retângulo de comprimento igual a extensão da transecção e altura igual a duas vezes a faixa de busca do observador (Buckland *et al.*, 2001), é, em média, proporcional a densidade de indivíduos em toda a área de estudo, desde que as transecções sejam alocadas de forma a proporcionar uma probabilidade de cobertura uniforme (ou seja o número de km voados por unidade de área seja constante).

A aeronave utilizada como plataforma de observação deverá ser um Aerocommander 500B, bimotor, com asa alta, janelas-bolha (observadores da frente) ou equivalente. Durante os transectos de observação, a aeronave deverá voar a uma altitude constante de 500 pés (150m) e velocidade entre 170-190 km/h. Os dados deverão ser coletados utilizando um protocolo semelhante aos previamente aplicados para a obtenção de estimativas de abundância de toninhas na FMA I, FMA II e FMA III (Zerbini *et al.*, 2010; Danilewicz *et al.*, 2010; Danilewicz *et al.*, 2012).

Para a busca, contagem e identificação de grupos deverá ser utilizada uma equipe de quatro pesquisadores em cada sobrevoos, os quais trabalharão de forma independente, não havendo comunicação (acústica ou visual) entre eles durante o esforço de observação. A equipe deverá ser formada por observadores com experiência prévia de pelo menos 3 monitoramentos aéreos dedicados a toninha. Dois observadores posicionados na frente (janelas-bolha) e dois atrás (janelas-plana) deverão trabalhar simultaneamente. Apesar da experiência prévia da equipe, um sobrevoos de treinamento antes do início dos trabalhos deverá ser realizado para calibração e padronização entre os pesquisadores.

O observador deverá varrer uma área entre os 90° e os 30° de declinação em relação ao horizonte, empregando um maior esforço de observação próximo aos 90°. Em relação ao rumo do avião, o observador não deverá buscar grupos após os 90° (considerando o rumo do avião = 0°). Cada observador deverá ser responsável pela coleta das condições ambientais, possíveis co-variáveis que afetem a probabilidade de detecção, sendo tomadas no início de cada transecto e a cada vez que uma mudança significativa ocorrer. Deverão ser registrados (1) estado do mar em escala Beaufort, (2) reflexo no campo de visão, porcentagem e intensidade, (3) transparência da água (registrado visualmente como “turva” ou “clara”), (4) visibilidade. Visibilidade deverá ser elencada subjetivamente como “excelente”, “boa”, “moderada” e “ruim” de acordo com a escala fornecida por Rugh *et al.* (1993). Essas variáveis influenciam a detectabilidade de mamíferos marinhos e deverão ser adicionadas nos modelos de densidade (Marques & Buckland, 2003).

Para cada detecção deverá ser registrado a hora, o tamanho do grupo, presença de filhotes e o ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo detectado. Os relógios dos observadores (fixados em posição junto a janela, para facilitar a visualização da hora) deverão estar perfeitamente sincronizados com o horário do GPS, o qual deve gravar uma posição lat/long a cada 3 segundos. O ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo avistado deverá ser coletado pelo observador com o auxílio de um inclinômetro (Suunto, modelo PM-5) assim que o grupo estiver perpendicular ao observador. Todas as informações deverão ser registradas em gravadores digitais individuais.

No monitoramento aéreo deverá ser realizada a avaliação dos dados populacionais anteriores das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) com o objetivo de comparar quantitativamente as populações antes e após o evento e identificar possíveis locais de afastamento dos animais.

Os monitoramentos deverão ser associados aos estudos comportamentais dos cetáceos no local ou na área em que se deslocaram. No caso do deslocamento dos cetáceos para outras áreas, além dos estudos propostos, verificar a disponibilidade de alimentação no local.

A metodologia para contagem das aves marinhas deverá ser a de censo contínuo e instantâneo utilizando embarcação (Tasker *et al.*, 1984), pois oferece as melhores estimativas de densidade relativa e absoluta das aves encontradas no mar (voando ou pousadas). Esse método pode fornecer uma estimativa valiosa da abundância de aves marinhas que forrageiam em uma determinada área ou estão associadas a colônias próximas. Ao longo de vários anos de estudo, esse método deve fornecer uma medida de circunstâncias dos locais de alimentação, bem como de variações no uso destes locais.

A distribuição e abundância das aves marinhas deverão ser obtidas através de censos embarcados mensais. As aves marinhas deverão ser identificadas através de guias específicos (Harrison, 1985; Onley e Scofield, 2007) e contadas através de censos contínuos e instantâneos segundo Tasker *et al.* (1984) e Gould e Forsell (1989), incluindo as aves seguidoras. Pelo menos 7 transectos com 200 km de extensão devem ser elaborados, (2 ao sul, 4 ao norte e 1 na foz) e deverão ser percorridos durante o deslocamento da embarcação, preferencialmente, em linha reta na área monitorada, ao longo das horas de luz do dia. Cada estação de contagem deverá incluir as seguintes atividades em ordem de execução: (1) contagem de aves seguidoras na popa da embarcação; (2) tomada de informações sobre variáveis espaciais, temporais e ambientais (data, hora, latitude e longitude, rumo e velocidade da embarcação, profundidade, tipo de atividade desenvolvida pelo barco, estado do mar conforme escala Beaufort, temperatura e salinidade da água, temperatura do ar, direção e intensidade do vento); (3) censo contínuo; e (4) censo instantâneo. Os censos deverão ser realizados por pelo menos um ornitólogo com experiência reconhecida, sempre do mesmo local, ou do melhor lado da embarcação de acordo com condições de luz e vento no momento. Ao final de uma sequência de censo, outra deverá ser iniciada após intervalo de 10 minutos. Aves seguidoras são aquelas que acompanham a embarcação durante a navegação, geralmente voando atrás do barco, e deverão ser contadas da popa. O censo contínuo deverá abranger as aves que durante um período fixo de tempo aparecem dentro de uma faixa de 300 m de largura, medida a partir do bordo da embarcação em

ângulo reto com a rota do navio, excluindo as aves seguidoras. No censo instantâneo o tempo de contagem deverá ser dividido em intervalos consecutivos de duração fixa. Ao início de cada intervalo deverão ser contadas as aves presentes dentro do raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular a este, varrendo-se assim a quarta parte de um círculo. Os censos contínuos deverão ter duração de 10 minutos, e os censos instantâneos terão 10 intervalos consecutivos de 1 minuto.

A posição do limite externo da faixa de censo deverá ser determinada segundo Heinemann (1981), através de uma triangulação envolvendo a largura da faixa de censo de 300 m, a altura do observador acima da superfície do mar e a distância entre os olhos do observador e a ponta superior de um paquímetro colocada na linha do horizonte. Para tal a embarcação deverá navegar a velocidade constante, com rumo conhecido, e que a linha do horizonte seja visível. Os censos deverão ser realizados por dois ornitólogos com experiência, simultaneamente para evitar problemas de detecção de aves durante o deslocamento da embarcação (Spear *et al.*, 2004) e deverá ser auxiliado pelo observador de mamíferos. A densidade de aves (número de aves/km²) deverá ser calculada com base nos resultados obtidos nos censos instantâneos, com referência a área total coberta em cada censo, sendo esta igual a 10 vezes a área varrida em cada contagem instantânea.

Informações sobre áreas e padrões de forrageamento deverão ser obtidas de duas espécies de aves marinhas com uso de rastreamento remoto cujos transmissores por satélite deverão emitir sinais de rádio captados pelos satélites em órbita terrestre que estão sobre a área no momento em que o sinal é emitido (ARGOS, 1996). Os equipamentos deverão ser de tamanho reduzido (até 5 g), fixados no dorso das aves marinhas e, dependendo do modelo, recarregados através de um painel solar. Os dados deverão ser obtidos sem a necessidade de recaptura dos organismos, através de um canal de transmissão de dados alugado junto a empresas como a ARGOS (Candia-Gallardo *et al.*, 2010).

Complementarmente, deverão ser realizadas pesquisas de aves marinhas ocorrentes no litoral e em ambiente estuarino. A metodologia a ser executada deverá ser o “*Itinerário Fixo*” (Branco *et al.*, 2010), (a ser percorrido por quadriciclo). Devendo ser estabelecida pelo menos quatro trilhas a serem percorridas na praia, por pelo menos uma vez cada por campanha. Cada trilha deve ter no mínimo 30 km. Duas devem seguir ao norte da foz (até o Degredo e Barra Seca), outra ao sul da foz (até Barra do Riacho) e uma última mais ao sul (15 km ao norte do Piraque-açu e 15 km ao sul).

Também deve ser usado o método de “*Contagem em Descanso*” (Branco *et al.*, 2010), haja vista existência de bancos de areia as margens da foz e no estuário, que são utilizados como dormitório e área de descanso pelas aves.

Dados qualitativos, como lista com identificação de espécies, status de ameaça de extinção e endemismo, guilda trófica, espécies indicadoras, área de vida, padrões de distribuição, abundância, riqueza e biodiversidade, devem ser apresentados.

Metodologia para gravação acústica passiva de cetáceos (Objetivo 1)

Para a biologia, compreender a acústica de animais e do ambiente pode revelar aspectos importantes para a conservação de uma espécie, como sua biologia, ecologia e possíveis impactos que esteja ocorrendo em um determinado local. Devido a dificuldade de

observação de cetáceos em seu ambiente natural, principalmente em áreas com águas turvas, esse tipo de estudo trouxe vantagens para pesquisas com esse grupo.

Por se tratarem de seres que enxergam o mundo por meio de ondas sonoras, o desenvolvimento da bioacústica e de estudos de ecologia acústica em cetáceos é fundamental para a conservação destas espécies (Laiolo, 2010). Técnicas acústicas vêm sendo aplicadas para a obtenção de parâmetros ecológicos populacionais tais como densidade e abundância (Hatch *et al.*, 2012; Van Parijs *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2013).

A aplicação dessa nova ferramenta de acústica passiva possibilitará descrever e avaliar os padrões de vocalização e ecolocalização do grupo na foz do Rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes, ajudando na compreensão do uso ou não dessas áreas pelos animais. Deverão ser determinados as atividades e o uso da área pelos animais, através da interpretação de seus sinais sonoros (taxa e períodos de emissão das vocalizações e dos sons de ecolocalização). Deverão ser avaliadas as características físico-químicas do ambiente que possuem maior influência sobre os parâmetros de frequência e intensidade de sons modulados e pulsados dos cetáceos sob diferentes escalas de variação espacial na região através de um delineamento amostral hierárquico.

Dados acústicos e comportamentais deverão ser coletados a partir de uma embarcação adequada para a atividade. Deverão ser realizadas gravações sincrônicas de vídeo e áudio e também gravações de áudio independentes. Imagens deverão ser gravadas a partir de uma câmera de vídeo portátil conectada a um hidrofone e a um microfone. Gravações de sons independentes deverão ser realizadas com hidrofone e um gravador de estado sólido portátil. Após a avistagem, a aproximação ao grupo de cetáceos deverá ser realizada.

Deverão ser tomadas todas as providências para que os animais não se sintam demasiadamente perturbados ou encurralados pela proximidade do barco. As gravações deverão ser iniciadas após o desligamento completo do motor da embarcação. A distância mínima do grupo para o início dos procedimentos deverá ser de 500m. Juntamente com as gravações de imagem e som deverão ser coletados dados de caráter ambiental tal qual temperatura da água, direção do vento, existência de correntes no local da gravação e profundidade.

A composição do grupo, tipo e o comportamento deverão ser descritos. Se possível, os animais deverão ser posteriormente identificados por meio das imagens coletadas. Categorias comportamentais deverão ser estabelecidas de acordo com os etogramas empregados para a espécie.

Para assegurar que os sons gravados estão de fato sendo produzidos pelo grupo focal deverá ser utilizado para a determinação do ângulo de origem do som, um arranjo de hidrofones de 4 unidades que deverá ser rebocado pela embarcação. A distância dos animais e sua angulação em relação ao azimute da embarcação deverão ser determinadas por um laser finder e uma bússola. Se determinado que os animais estão muito próximos da embarcação, se estiverem apresentando sinais de stress devido a aproximação do barco ou se o grupo iniciar natação constante para longe da

embarcação, as observações deverão ser interrompidas e um novo grupo focal deverá ser eleito. Para tal, as rotas deverão ser aleatórias, até que os animais sejam encontrados.

A partir da aproximação dos golfinhos, o motor do barco deverá ser desligado para que sejam iniciadas as gravações. As gravações deverão ser feitas seguindo o método de Dudzinski *et al.* (1995). As emissões sonoras deverão ser gravadas por meio de um hidrofone C54 (Technology Research Cetáceos, Inc., Seattle, WA, EUA; 008-100 kHz; - 165 dB re 1 V / MPA) implantado em cerca de 2 metros de profundidade. Este hidrofone deverá ser acoplado a entrada de microfone de um gravador M-Audio MicroTrack 24/96 (96 kHz; 24 bit arquivos .wav) e de sua saída deverá ser acoplada a entrada de microfone de uma filmadora digital SONY DCR-SX40 protegida por uma caixa estanque, para que se possa fazer filmagens subaquáticas.

O indivíduo que emitir o sinal vocal deverá ter, além da sua vocalização, seu comportamento registrado pela câmera (adaptado de Dudzinski *et al.*, 1995). Paralelamente, outro membro da equipe deverá registrar em planilha de campo dados ambientais, tomados a cada hora. Seguindo a técnica de amostragem de grupo-focal (ALTMANN, 1974) informações sobre a composição do grupo, comportamento aéreo dos golfinhos, localização geográfica do grupo e tempo de permanência na área, deverão ser registrados a intervalos de 5 minutos.

As análises das emissões sonoras deverão ser feitas utilizando o programa Raven Pro 1.3 o qual fornece o oscilograma e o sonograma e do software Adobe Premier 7, que mostrará a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento. As emissões sonoras deverão ser classificadas inicialmente em cliques, sons pulsantes ou assovios. Os assovios deverão ser classificados em tipos, conforme a similaridade de seus contornos.

Associações com habitat e tendências de agregação (Objetivo 2)

Para a realização dos estudos de associação com micro-habitats, tendências de agregação e deslocamento deverão ser utilizadas observações diretas a partir de ponto fixo e com o uso de veículo não tripulados (VANT ou Drone).

Para as observações em pontos fixos, deverão ser realizadas saídas prévias a campo para se determinar pelos dois pontos fixos de observação nos estuários do rio Doce em Linhares. Como comparativo deverá ser realizado um monitoramento também no rio Piraqueçu em Aracruz, ES ou em outras áreas que os drones identifiquem como áreas principais de uso.

Com o auxílio de binóculos deverá ser realizado o monitoramento dos estuários. Deverão ser realizadas quatro observações mensais, sendo uma por semana, onde o tempo de observação diária deverá ser de seis horas por ponto. O período do dia de observação entre os pontos deverá ser alternado para evitar repetições de marés.

Quando forem avistados, os indivíduos deverão ser registrados quanto a: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento,

localização exata (GPS), e outras informações que sejam julgadas pertinentes. Estes dados deverão ser inseridos em uma planilha pré-formulada.

Deverão ser considerados parte de um mesmo grupo os indivíduos que nadarem próximos uns dos outros, com atividades coordenadas, mas não necessariamente deslocando-se na mesma direção (Mann, 2000).

Durante este período deverão ser realizadas observações naturalísticas dos comportamentos utilizando o método de amostragem “Ad Libitum” (Lehner, 1997). Para as observações deverão ser realizados os métodos “animal focal”, quando o indivíduo é o foco das observações durante um determinado período, mas não necessariamente o único a ser focalizado pelo período de amostragem, e o de “amostragem sequencial”, quando o foco corresponde a uma sequência de comportamentos de um ou mais indivíduos (Lehner, 1997).

Os dados deverão ser agrupados em uma tabela no Excel e para os pontos de coleta deverão ser testadas relações entre a presença e tamanho de grupo e as variáveis: nível de maré (alta, média e baixa); tipo de maré (enchente e vazante); variação de maré; mês; estação do ano; status comportamental e tempo máximo. Além disso, as relações deverão ser avaliadas para as diferentes áreas.

Para se avaliar o grau de significância dos resultados, deverão ser empregados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) ao nível de 0,05 de significância (Zar, 1984) do pacote STATISTICA Versão 5 ®.

Para as observações feitas com VANTs ou drones, deverão ser utilizados equipamentos como o Phantom IV – Professional, da fabricante chinesa Dji. O Drone é um quadróptero capaz de capturar vídeos em resolução 4K e capturar fotos com resolução de 12 mega pixels. É dotado de GPS, sistemas de estabilização de imagem, sensores para evitar colisões e tem sinal de rádio que permite que o aparelho voe a uma distância de até 5km do controle remoto. Caso ocorra perda de link de comunicação com o controle remoto, o Drone retorna automaticamente para o local de partida sem necessidade de intervenção do operador até que o link seja reestabelecido.

Considerando que o Drone especificado pode realizar voos de até 28 minutos com cada carga de bateria deverão ser adquiridas quatro baterias extras, resultando na possibilidade de sessões ininterruptas de observações. O modelo recomendado pode operar em condições de vento de até 36km/h, o que permite sua utilização durante todo o ano na maior parte do litoral do Brasil.

Para cada operação do Drone deverá ser obtido uma autorização do Departamento de Controle do Espaço Aéreo de acordo com instruções contidas na Circular de Informações Aeronáuticas (AIC- N21/10) de 23 de setembro de 2010.

Após testes operacionais e treinamento de equipe para o manuseio do equipamento, deverão ser feitas aferições de equivalência entre o tamanho dos pixels registrados nas filmagens e fotos e distância real em diversas altitudes. Dessa forma, os organismos identificados dentro do campo de visão, bem como suas estruturas (escudos pré-frontais por exemplo) poderão ser medidas e identificadas. Com isso, acredita-se ser possível realizar foto-identificações de tartarugas marinhas a partir da distinção dos escudos

cefálicos, tal como é realizado rotineiramente com as nadadeiras de mamíferos marinhos (Dunbar *et al.*, 2014).

As campanhas de coletas de imagens e filmes deverão ser realizadas em diversos pontos do litoral do Espírito Santo seguindo padrões metodológicos conhecidos de busca e varredura (Bevan *et al.*, 2016) ou localizados durante as estimativas de abundância com censos aéreos. Ao encontrar um alvo de observação, o organismo ou grupo deverá ser registrado de forma a se determinar a espécie, tamanho, direção e velocidade de deslocamento, ritmo de mergulho, tamanho do grupo, número de juvenis e adultos, comportamentos de alimentação, deslocamento, interações intra e inter-específicas, dentre outros, sendo que ao redor da foz deverão ser realizadas campanhas mensais de dois dias de duração. Observações extras deverão ser realizadas quando forem detectadas agregações nos censos aéreos tripulados, sendo estimadas seis novas campanhas anuais associadas a estes censos aéreos.

Uma vez detectadas agregações ou identificadas uma relação de determinada espécie com uma área, deverão ser feitas campanhas de mapeamento e identificação dos micro-habitats com o auxílio de um ROV (Smolowitz *et al.*, 2015). O equipamento a ser utilizado é um micro-rov da marca Video-Ray. Devido a seu pequeno peso e baixas exigências em relação a energia este equipamento tem uma configuração ideal para permitir a realização de campanhas de curta duração para identificar e mapear micro-habitats. Deverão ser previstas duas campanhas anuais para a realização desse mapeamento e identificação, sendo que as campanhas terão duração de 10 dias cada.

As informações georeferenciadas das ocorrências de espécies e micro-habitats, direções e velocidade de deslocamento dos organismos detectados deverão ser compiladas em um SIG (Sistema de Informações Geográficas). Essas informações deverão ser submetidas a diversos tipos de algoritmos ecológicos de análise de distribuição espacial, bem como análises visuais e de interpolação e análises estatísticas tradicionais de forma a definir níveis de abundância das espécies observadas e suas variações no tempo, padrões de associação com habitats e sua variação no tempo e tendências de deslocamento e suas variações temporais.

A associação das aves marinhas com determinados habitats deverá ser determinada através de análise de *kernel*, no qual áreas com uso mais intenso são determinadas a partir da interpolação de pontos próximos. Os dados das aves deverão ser provenientes dos dois métodos de amostragens, censo a partir de embarcação e rastreamento remoto. A associação com determinadas características fisiográficas e oceanográficas (batimetria, temperatura superficial do mar, distância da costa, distância de Abrolhos no caso de aves que reproduzem nesta ilha, distância da foz do rio Doce, produtividade primária, inferida a partir de clorofila-a), deverão ser determinadas através da correlacionadas entre abundância e as variáveis ambientais citadas.

Os dados deverão ser obtidos a bordo, bem como a partir de informações obtidas posteriormente em cartas náuticas ou bancos de dados digitais como General Bathymetric Chart of the Ocean - GEBCO (http://www.bodc.ac.uk/data/online_delivery/gebco/), sobre temperatura superficial do mar e produtividade primária (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>).

A correlação entre a distribuição e abundância dos cetáceos e aves e variáveis ambientais poderá ser investigada através de métodos estatísticos tradicionais (e.g. análises de variância, co-variância e canônica) ou alternativamente, utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos generalizados (GAM). A variação na composição e abundância (ou taxas de encontro) da fauna de cetáceos e aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas), por estações do ano deverá ser verificada através de análises de variância (ANOVA).

Monitoramento de encalhes e prevalência de patógenos (objetivos 3 e 4)

Cetáceos e tartarugas marinhas

Após o recebimento de informação sobre encalhe de algum cetáceo ou tartaruga marinha nas praias do litoral norte capixaba, prontamente deverão ser realizadas visitas ao local para a obtenção das seguintes informações: condição climática e de maré, localização exata com GPS, identificação da espécie, existência de marcas de aparatos de pesca, registro fotográfico, medições dos animais e coleta de material biológico para análises futuras.

Quando a equipe de resgate estiver no local de ocorrência ela deverá avaliar a situação e em se tratando de cetáceo vivo, o médico veterinário deverá realizar os primeiros-socorros, coletas (sanguíneas e de pele), marcação (a critério do pesquisador, sugere-se que cada indivíduo receba uma marca temporária plástica, colorida e numerada tipo cattle ear-tag ou uma marca de longa duração feita com nitrogênio líquido, marca criogênica, em forma de letras, números ou combinação dos dois), registro fotográfico (podem ser reconhecidos individualmente pelos padrões de marcas e cicatrizes existentes na nadadeira dorsal (Santos *et al.*, 2010) e procurar orientar o procedimento de devolução do animal para o mar.

As amostras de sangue de cetáceos que encalharem vivos deverão ser retiradas com agulhas e seringas hipodérmicas descartáveis, a partir dos vasos superficiais na nadadeira caudal, veia da nadadeira peitoral ou veia da nadadeira dorsal. Os procedimentos para coleta e preservação das amostras para microbiologia, genética, toxicologia, histopatologia e parasitologia deverão ser realizados de acordo com Geraci & Lounsbury (1993), Dierauf (1994) e Amos & Hoelzel (1991). O tempo de manejo não deve exceder 10 (dez) minutos.

O monitoramento das praias é atualmente realizado no Espírito Santo por uma empresa contratada (Scitech, do RJ, no âmbito do licenciamento ambiental da PETROBRAS – Processo Administrativo nº 02022.001407/2010 CGPEG/DILIC/IBAMA – PMP-BC/ES), atuando em parceria com o Instituto Baleia Jubarte e Organização Consciência Ambiental (ORCA), que após serem chamados realizam o atendimento aos animais nas praias, ou recebem os animais e dados gerais dos encalhes coletados pela empresa. A instituição executora deste Projeto deverá atuar em parceria e compatibilizar as metodologias com estas instituições no sentido de haver prejuízo para as atividades de coleta.

No caso de se tratar de um animal morto de até 3 metros de comprimento, a carcaça poderá ser removida para uma base de apoio a fim de executar as atividades necessárias. Caso o animal tenha mais de 3 metros, o exame da carcaça e a coleta de material poderão ser realizados no local do encalhe.

Os procedimentos de resgate e necrópsia de baleias e golfinhos deverão seguir o Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE).

Todos os animais deverão receber um número de registro. Este mesmo número deverá ser utilizado para identificar as amostras biológicas coletadas.

Conforme o estado da carcaça, deverão ser coletados dados biométricos e realizada a necropsia, a fim de se estabelecer a causa *mortis*. Durante as necropsias, deverão ser registrados os dados biológicos dos exemplares e levantados dados referentes a classificação taxonômica, comprimento total, peso, medidas alométricas, sexo, estágio de maturação, estado da carcaça e marcas de interação com artefatos de pesca. A carcaça deverá ser fotografada, posteriormente descarnada e os ossos coletados e acondicionados para maceração. Amostras de tecidos para análise de DNA também deverão ser coletadas.

Todos os dados coletados deverão ser registrados em fichas padronizadas, armazenados em um banco de dados e interpretados. O material osteológico coletado deverá ser examinado buscando-se evidências de alterações patológicas. A limpeza do material osteológico deverá ser realizada através da técnica de maceração, para posterior tombamento em acervos de coleções científicas.

Um fator limitante nesse procedimento é o avançado estado de decomposição no qual muitos animais chegam as praias. O estado de decomposição das carcaças limita o tipo de amostras que podem ser coletadas e o tipo de análises que podem ser realizadas. As carcaças deverão ser classificadas seguindo o padrão proposto por Geraci & Lounsbury (2005), em códigos de 1 a 5, onde 1 corresponde ao animal vivo e 5 a restos de esqueleto ou carcaça mumificada.

Aves

As aves são susceptíveis a várias doenças, sendo que a suscetibilidade a patógenos pode ser influenciada por condições ambientais que venham a interferir em seu sistema imune e defesas naturais. São, portanto, boas sentinelas da saúde dos ecossistemas (Siciliano et al., 2005). Nas aves de vida livre há sempre forte influência do fator ambiental na saúde das populações, uma vez que as doenças variam de acordo com a qualidade do ambiente utilizado (Chazar et. al., 2009; Shivaprasad, 2002). Considerando que estudos prévios já abordaram prevalência de alguns microrganismos considerados de risco, infectando aves da região de estudo, notadamente na região de Abrolhos (Gennari et al., 2013; Niemeyer et al., 2013) e também a disponibilidade de amostras de sangue armazenadas

destes locais, que podem nos trazer um diagnóstico pré-acidente, ressalta-se a iminente necessidade de avaliar aves de interesse como biomonitores quanto a presença de doenças e patógenos. O que servirá para compreender o impacto da alteração ambiental nas relações ecológicas e evolutivas das aves marinhas com doenças e microrganismos.

As iniciativas proativas de diagnóstico de enfermidades e exames clínicos e complementares são essenciais para reduzir o efeito de ameaças de doenças a conservação das espécies e entender os padrões epidemiológicos de infecção (Friend; Thomas, 1992). Programas de monitoramento de doenças que envolvam metodologias de vigilância de populações podem elucidar mudanças na sanidade destas, antes da ocorrência de alterações significativas no tamanho ou estrutura das populações (Karesh et al., 1997).

A obtenção de amostras biológicas de aves (sangue e suabes cloacais e de orofaringe) ao longo da área deste estudo deverá se dar através de parceria com instituições ligadas a Rede Albatroz, criada como parte da implementação do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis (PLANACAP) e ao PMP acima mencionado para os cetáceos. A análise das amostras de aves arribadas na região deverá ser subsídio para elaboração de base de dados de avaliação sanitária, parâmetros hematológicos, bioquímicos e microbiológicos das espécies de aves marinhas biomonitoras da condição ambiental e sua evolução. Esta avaliação epidemiológica será essencial para determinar o status de saúde das populações e servir como referência para o monitoramento e avaliações futuras dessas aves, além de potencialmente embasar decisões de manejo, contribuindo nas iniciativas de conservação dos táxons ameaçados (Koleniskovas et al., 2012). As causas das doenças nas aves podem ser bacterianas, como as causadas por *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridia*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Erysipelas*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, entre outras. As principais enfermidades aviárias zoonóticas importantes são a Doença de New Castle (DNC), causada por cepas virulentas do Paramyxovírus aviário tipo 1 e 2, a Influenza Aviária (IA), causada pelo vírus do gênero Influenza A, subtipos H5 ou H7, e a Febre do Oeste do Nilo (FON), causada por Flavivirus.

A presente proposta objetiva avaliar a sanidade das aves, com exames hematológicos (pesquisa de hemoparasitas, relação H:L), exames bioquímicos e pesquisa molecular de agentes infecciosos como *Chlamydophila psittaci*, Paramyxovirus-1 e Paramyxovirus-2, Adenovirus, Avipoxvirus e Flavivirus, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* sp., *Borrelia* sp., entre os principais. Para tanto deverão ser obtidas amostras de sangue e suabes de todas as aves que forem manipuladas tanto nas capturas a bordo quanto no monitoramento de encalhes nas praias que venham a manipular aves recém mortas ou ainda vivas.

As coletas de sangue deverão ser realizadas por venopunção da veia ulnar ou da jugular. No máximo 1% do peso corporal de sangue de cada ave deverá ser coletado, utilizando agulhas descartáveis acopladas em seringas heparinizadas. Imediatamente após a coleta do sangue deverá ser realizada uma extensão sanguínea e em seguida o sangue deverá ser transferido para microtubos (tipo Eppendorf), previamente identificados. Após a coleta, os microtubos deverão ser mantidos em caixas refrigeradas para serem encaminhados sob refrigeração ao Laboratório de Análise de Água e Análises Microbiológicas da Estação Ecológica de Carijós e do CEMAVE, parte integrante também da Rede Albatroz. As amostras de sangue total deverão ser processadas para realização dos parâmetros hematológicos e extração de DNA. As amostras de DNA extraídos por kits comerciais, tanto das amostras de sangue quanto das amostras de suabes cloacais e de orofaringe, deverão ser mantidas congeladas a -80°C para posterior utilização nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético para a identificação do patógeno.

As amostras de cloaca e orofaringe para análise microbiológica e PCR deverão ser coletadas das aves utilizando-se suabes estéreis específicos e mantidas refrigeradas em meio de transporte Stuart por até 48 horas até processamento no laboratório (cultura e isolamento das bactérias). Um segundo suabe de cloaca e orofaringe deverá ser processado diretamente para detecção molecular de patógenos, sendo mantidos congeladas em tubos tipo eppendorf contendo meio PBS, antibiótico e antifúngico desde imediatamente após a colheita até análise laboratorial. Estas amostras também poderão ser utilizadas no sequenciamento em massa (metagenômica) para identificação da presença dos patógenos de escolha. A correlação entre a presença e prevalência dos patógenos em aves e variáveis ambientais poderá ser investigada através de métodos estatísticos tradicionais (e.g. análises de variância, co-variância e canônica) ou alternativamente, utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos generalizados (GAM). A variação na composição da microbiota e na prevalência de doenças/patógenos de aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas), por estações do ano, deverá ser verificada através de análises de variância (ANOVA).

Análises genéticas (objetivo 5)

Atualmente, uma das maiores preocupações existentes na implementação de planos de conservação e manejo de espécies ameaçadas de extinção é a identificação da estrutura genética das populações e seus atuais níveis de contaminação. Considerando que as ameaças a uma espécie podem ocorrer em diferentes níveis ao longo de sua distribuição, é essencial o reconhecimento da identidade das populações, a fim de que sejam conduzidos procedimentos de conservação e manejo em âmbito local.

Nas últimas décadas, diversos marcadores moleculares têm sido utilizados para auxiliar na identificação da estrutura genética das populações, na determinação da diversidade genética existente dentro delas e sua relevância para a viabilidade dessas populações (e.g. Dizon *et al.*, 1997). Marcadores moleculares têm sido também empregados em

estimativas de tamanho populacional efetivo e variações populacionais históricas (Rooney *et al.*, 2001).

Para que decisões sobre manejo com a finalidade de proteção de diferentes estoques de uma espécie sejam efetivas, é também desejável que se tenha o conhecimento a respeito da proporção sexual dos indivíduos e tamanho efetivo das populações (para uma revisão em mamíferos aquáticos ver Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, in press). Contudo, uma vez que a maioria das espécies de cetáceos não apresenta dimorfismo sexual acentuado, a possibilidade da utilização de técnicas moleculares na determinação do sexo dos indivíduos passou a ser uma alternativa bastante importante em estudos de populações (Pasbøll *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2009, Oliveira *et al.*, in press).

Amostras de músculo dos cetáceos, tartarugas marinhas encontradas em áreas de desova e de espécies de aves de interesse deverão ser utilizadas como biomonitores, como *Sula leucogaster* e *Thalassarche chlororhynchos*, encontrados encalhados nas praias do Espírito Santo. Os indivíduos encontrados durante o período do estudo deverão ser avaliados, bem como, de períodos anteriores para comparações (Reis *et al.*, 2010, Vargas *et al.*, 2008, Vargas *et al.*, 2013 e Shamblin *et al.*, 2014). Para as espécies *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* já estão disponíveis cerca de 100 amostras de cada espécie. Esse número amostral poderá ser ampliado de acordo com novos eventos de encalhes que possam ocorrer durante o período de estudo. Outras espécies poderão ser incluídas nas análises dependendo do número de amostras encalhadas no período de estudo.

Aves marinhas poderão ser amostradas através de captura a bordo, atraindo-as com peixes e vísceras e usando captura com tarrafa. Amostragens também poderão ser realizadas em Abrolhos, para coleta de sangue da veia tarsal ou ulnar. Cerca de 300 amostras de sangue das aves de Abrolhos e de Trindade já foram coletadas em período anterior ao desastre ocorrido no rio Doce.

Os tecidos para as análises genéticas deverão ser armazenados em microtubos e conservados em álcool 70%.

Para extração de DNA e quantificação do DNA um pequeno pedaço de músculo deverá ser picotado e colocado em um microtubo no qual com o auxílio de reagentes e centrifugações deverá ser realizada a extração do DNA pelo método de solução salina. Ao final do processo o DNA deverá ser ressuspendido com a adição de 20 µL de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. As amostras de DNA deverão ser quantificadas em espectrofotômetro.

Para a amplificação por PCR e sequenciamento, cada amostra deverá ser submetida a PCR (Polymerase Chain Reaction) e reações de sequenciamento e genotipagem para avaliação de marcadores mitocondriais e nucleares (microsatélites).

Para purificação e sequenciamento dos fragmentos, as reações deverão ser purificadas após a amplificação, utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos deverão ser submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos. Deverá ser feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados.

Para a análise das sequências mitocondriais as mesmas deverão ser alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6.

Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) deverão ser calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações.

As redes de haplótipos deverão ser construídas com cálculos de Median Joining no programa Network. Deverá ser feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Para as análises dos microssatélites, os locos deverão ser identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos deverá ser estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados deverão ser comparados para os locos de microssatélites com o programa Mstools v. 3.1 (Park, 2001) a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

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

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

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) deverá ser realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996).

Para determinar provável estrutura populacional deverá ser realizada uma análise de cluster bayesiana a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microssatélites e dos locais de coleta utilizando o software Structure v.2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000).

Após a alocação dos indivíduos em cada cluster, deverá ser realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também deverão ser calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001). Valores de P deverão ser considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os primers a serem utilizados deverão ser: ZFX0582, ZFX0923 (Bérube & Palsboll 1996), PMSRYF (Richard *et al.*, 1994) e TtSRYR (Rosel *et al.*, 2003). Para a sexagem molecular das espécies de ave que não possuem dimorfismo sexual externo deverá ser usado o gene CHD (Fridolfsson e Ellegren, 1999). As reações de PCR deverão ser confeccionadas com: Tampão 10x, 150 μ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,3 μ M de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que deverá ser aplicado 0,06 μ M. O volume final deverá ser de 25 μ L. A amplificação deverá ser realizada nas seguintes condições: 92°C por 30 seg., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos deverão ser separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética deverá ser realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas deverá ser realizada com o auxílio de luz UV e estas deverão ser fotografadas.

Análises microbiológicas de cetáceos

Os mamíferos aquáticos dependem de ecossistemas saudáveis para sua sobrevivência e manutenção do frágil equilíbrio nas relações com microrganismos que podem estar em altas concentrações nesses ambientes (ELLIS, 2001; MOORE, 2008; AVALOS-TÉLLEZ *et al.*, 2010). O surgimento de doenças infecciosas emergentes e de neoplasias nas últimas décadas está intimamente relacionado a fatores antropogênicos (BOSSART *et al.*, 2007).

A degradação ambiental, incluindo a contaminação química e biológica, mudanças climáticas, impactos da pesca, poluição sonora e tráfego de embarcações, podem comprometer a função imune de populações e diminuir a oferta de alimentos, aumentando o estresse e favorecendo a introdução de patógenos exóticos (VAN BRESSEM *et al.*, 2009). Essas doenças refletem a deterioração da saúde dos ecossistemas aquáticos e podem ter relevância direta ou indireta sobre a saúde humana (BOSSART, 2007; BUREK *et al.*, 2008).

Para as análises bacteriológicas, os materiais deverão ser remetidos refrigerados em caixa isotérmica com meio de transporte adequado para cada análise (PAIVA *et al.*, 2006), ao laboratório imediatamente após o término das colheitas, para facilitar o

isolamento do agente infeccioso. Para a detecção de vírus as amostras deverão ser mantidas em microtubos de polipropileno e congelados a -20°C até o envio para o laboratório. Em caso de observação de lesão característica de papilomavírus a verruga deverá ser devidamente retirada e congelada até a chegada ao laboratório.

Os exames sorológicos de bactéria e viral deverão ser centrifugados após a colheita e em seguida mantido congelados até o momento da análise. Para o exame sorológico de toxoplasmose deverá ser utilizado o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) utilizando taquizoítas inativados pela formalina e 2-mercaptoetanol, conforme descrito por Dubey e Desmonts (1987). Os exames fúngicos para detecção de micoses superficiais, subcutâneas, ou oportunistas deverão ser realizados utilizando fragmentos da borda da lesão de pele e o swab nasal deverá ser enviado em meio de cultivo para a análise no laboratório.

Os vírus coronavírus e rotavírus deverão ser pesquisados. A detecção do coronavírus deverá ser realizada mediante as amostras fecais colhidas com swab estéril e processadas utilizando uma reação de transcrição reversa utilizando duas etapas de amplificação. Para a detecção de rotavírus, deverá ser utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) descrita por Herring *et al.* (1982).

As amostras de sangue e swabs deverão ser testadas quanto a presença de agentes infecciosos e parasitários. Para a detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii, deverá ser realizado o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987) utilizando amostras de soro. A detecção de anticorpos anti-T. gondii deverá ser feita com o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) devido ao fato deste exame não necessitar de conjugado específico para a espécie animal. O título de 1:20 deverá ser considerado indicativo para uma prévia infecção por T. gondii (DUBEY *et al.*, 2003). Extração de DNA e caracterização molecular:

Cryptosporidium spp.: A extração do DNA deverá ser realizada diretamente das fezes por meio de um kit comercial, sendo posteriormente armazenado a -20°C até o uso nas análises moleculares (PAZ e SILVA, 2007). As amostras deverão ser submetidas ao isolamento e amplificação do DNA do parasita através da técnica de NESTED-PCR (XIAO *et al.*, 2001).

Ao que concerne a pesquisa para *Giardia* spp., as amostras coletadas deverão ser submetidas a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (APPELBEE *et al.*, 2010). Todas as amostras positivas, decorrentes do processamento do material fecal, deverão ser submetidas a confirmação através da técnica de imunofluorescência direta (MACHADO, 2006). Após os cistos de *Giardia* spp. serem isolados por meio da técnica do gradiente de sacarose, estes deverão ser lavados e submetidos a extração de DNA. O DNA obtido deverá ser submetido a PCR padronizada para os iniciadores GGL405-433/GGR592-622 e ABB97F/ABB220R (PAULINO, 2005).

A pesquisa de hemoparasitos (*Rickettsia*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. e hemoparasitas do gênero *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*) deverá ser realizada por PCR utilizando sangue total (AGUIAR *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013; LABRUNA *et al.*, 2004).

A pesquisa do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) também deverá ser feita por PCR após a realização da cultura do swab de orifício respiratório (WARREN *et al.*, 2006). Para os testes sorológicos de *Brucella* deverão ser utilizados soros conservados a -80°C que deverão ser testados em duas fases: (1) fase de screening com o teste rosa de bengala (RB) e (2) a fase confirmatória, onde deverão ser realizados os testes: (A) 2-mercaptoetanol (2-ME) e (B) soroaglutinação lenta (SAL). Também poderão ser realizadas análise moleculares dos animais positivos através de PCR convencional utilizando dois primers para alcançar maior sensibilidade (BAILY *et al.*, 1992; BRICKER *et al.*, 2000; KEID *et al.*, 2007).

Para a pesquisa de morbilivírus (família *Paramyxoviridae*) deverão ser utilizados swabs colhidos do orifício respiratório, preservados congelados a -80°C negativos até o processamento. Após extração do RNA e RT-PCR, iniciadores para amplificação de porções conservadas do genoma viral deverão ser utilizados (BARRET *et al.*, 1993; BELLIERE *et al.*, 2011). As amostras de secreção coletadas com os swabs estéreis deverão ser submetidas a protocolos de cultura microbiológica e, posteriormente, todos os microrganismos presentes na cultura deverão ser identificados.

Também deverá ser realizada a pesquisa de agentes virais em pele e mucosas, tanto de biópsia de áreas aparentemente saudáveis quanto com lesões. Deverão ser realizados PCR com alvo em fragmento de herpesvírus (VANDEVANTER *et al.*, 1996) e de poxvírus (BRACHT *et al.*, 2006).

Para o isolamento das leveduras deverão ser coletados, com o auxílio de swabs de algodão estéreis, material clínico dos tratos respiratório (narina / espiráculo), digestório (cavidade oral e reto) e genital de mamíferos aquáticos, os quais deverão ser mantidos em tubos estéreis com solução salina até o processamento. As amostras clínicas coletadas deverão ser semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose 2%, acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L). As placas deverão ser incubadas a 25 °C, durante um período de dez dias. As leveduras isoladas deverão ser identificadas, por meio da avaliação da micromorfologia e do perfil bioquímico, quanto a produção de urease e a capacidade de assimilar diferentes fontes de carboidrato e de nitrogênio (BRILHANTE *et al.*, 2010). Os isolados de *Candida* spp. deverão ser submetidos ao teste de sensibilidade a antifúngicos. O teste deverá ser realizado por meio do método de Microdiluição em Caldo. As drogas testadas deverão ser a anfotericina B e os derivados azólicos fluconazol e itraconazol (BRILHANTE *et al.*, 2012). Os isolados de *Candida* spp. submetidos ao teste de sensibilidade *in vitro* deverão ser avaliados quanto a produção de fosfolipases, a qual deverá ser avaliada por meio da semeadura em ágar

gema de ovo. A atividade de fosfolipase (Pz) deverá ser determinada como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total (colônia + zona de precipitação) e deverão ser considerados positivos os isolados que apresentarem $Pz < 1$ (VIEIRA *et al.*, 2009). Para avaliação do potencial patogênico das cepas de *Candida* spp., estas deverão ser repicadas em placas contendo ágar BHI, acrescido de canamicina (45 mg/mL) e incubadas a 35 °C, durante sete dias. Em seguida, após o crescimento de uma camada uniforme de colônias de *Candida* spp., 30 a 40 espécimes de *Caenorhabditis elegans* deverão ser adicionados a cada placa. Os animais deverão ser diariamente classificados como vivos ou mortos, após serem gentilmente tocados com uma alça de platina. Nesta etapa experimental, também deverá ser realizada a exposição a cepas inativadas pelo calor, como controle negativo de patogenicidade. Raspados de pele e swabs de lesões suspeitas de infecção fúngica deverão ser também coletados.

Análises de contaminantes (objetivo 6)

Os cetáceos geralmente ocupam altos níveis tróficos, possuem longevidade e massa corpórea robusta. Estas características os conferem a capacidade de acumular altas concentrações de contaminantes em seus tecidos e então refletir os processos de bioconcentração de um determinado ecossistema (DAS *et al.*, 2003)

Após recolhidas as amostras de tecidos, o material de cetáceos e quelônios deverá ser enviado para um laboratório especializado em análises de contaminantes.

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras frescas, cerca de 0,4g de músculo, 0,2g de fígado e 0,2g de rim, deverão ser atacadas a frio com 1mL de H₂O₂. Após essa etapa deverá ser adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃) v/v, passando então ao aquecimento em Banho Maria a 60°C por 2 horas até a solubilização completa da amostra. Os extratos deverão ser resfriados por quinze minutos, sendo adicionado 10mL de KMnO₄ (5%). As amostras deverão retornar ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e então deverão ser resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte o extrato deverá ser reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH₃) 12%. O extrato final deverá ser avolumado com água Milli-Q até 14mL. As leituras deverão ser realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (FIMS-400 Perkin Elmer) (Malm *et al.*, 1989; Bastos *et al.*, 1998). A certificação do método de determinação do HgT deverá ser feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de Dogfish) e DORM-4 (músculo de Dogfish) do National Research Council do Canadá. Todas as amostras deverão ser analisadas em duplicata com utilização de brancos analíticos em todas as baterias.

A determinação das concentrações de elementos-traço (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, As) deverá ser realizada através de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS), utilizando-se de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman, da Analytik Jena. Para tal, uma solução de nitrato de paládio

(Pd(NO₃)₂) deverá ser utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta deverá ser preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck No.B9366989 710). O controle de qualidade deverá ser efetuado através do uso de materiais certificados de referência do USA National Institute of Standards and Technology e do National Research Council do Canadá.

Para a determinação de compostos organoclorados, as extrações deverão ser realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes deverá ser hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Deverá ser utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Os padrões internos PCB 103 e PCB 198 deverão ser adicionados as amostras. O volume final deverá ser reduzido para prosseguir a etapa de purificação com a adição de H₂SO₄ (Santos-Neto *et al.*, 2014). O conteúdo lipídico deverá ser quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais deverão ser corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os pesticidas e as bifenilas policloradas deverão ser mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) Agilent 7890. O hidrogênio deverá ser utilizado como gás de arraste e o nitrogênio como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade deverá ser realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

Para a determinação de compostos organobromados, as extrações deverão ser realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes deverá ser hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Deverá ser utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209 deverão ser adicionados as amostras. O volume final deverá ser reduzido para prosseguir a etapa de purificação. O método utilizado para purificação de amostras deverá ser o descrito e validado por Covaci *et al.*, (2002) e Voorspoels *et al.*, (2003). O conteúdo lipídico deverá ser quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais deverão ser corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os PBDEs e MeO-PBDEs deverão ser mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS) Agilent 7890. O GC operará no modo de ionização química negativa (ECNI). Deverá ser utilizado o metano como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólo e interface deverão ser ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS deverá ser utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons m/z = 79 e 81 (de tri- a hepta-BDEs) e 484,7/486,7 e 494,7/496,7 (para BDE 209 e 13C-BDE 209, respectivamente) monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade deverá ser realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

A metodologia de análise de HPAs deverá ser adaptada e otimizada a partir de procedimento descrito pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, Environmental Protection Agency) e em Barros (2014). Resumidamente, alíquotas das amostras liofilizadas deverão ser pesadas e extraídas em Soxhlet com metanol, seguidas pela reação de saponificação através da adição de hidróxido de potássio. Posteriormente deverá ser conduzida uma extração líquido-líquido com hexano, onde a amostra deverá ser transferida para um funil de separação, onde deverá ser adicionado hexano e através de agitação manual o extrato de hexano separado e recolhido em novo balão. Tal procedimento se repetirá 3 vezes e todo o extrato de hexano recolhido deverá ser então reduzido a cerca de 1 mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos deverão ser purificados através do clean up, realizado em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap deverá ser adicionado o padrão interno, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs deverá ser realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS, Agilent). Recursos materiais: sistema de produção de água ultra pura da marca Milipore, espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (AAS ZEE nit 650P), da marca Analytic Jena, banho-maria, Espectrômetro de Absorção Atômica com geração de vapor frio (modelo FIMS 400, Perkin Elmer), sistemas de condensadores acoplados a soxhlet, rotoevaporador da marca Marconni, modelo MA-120, Centrífuga modelo 5702, da marca Eppendorf, um miniconcentrador/evaporador de nitrogênio um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS), da marca Agilent Technologies, modelo 5975 C e acoplado ao injetor automático da Agilent Technologies, modelo G4513A; um cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (CG-ECD), da marca Agilent Technologies, modelo 7890, com fonte radioativa de ^{63}Ni , acoplado ao injetor automático da Agilent Technologies, modelo 7683B, além de reagentes (e.g.: hexano, diclorometano, ácido sulfúrico, ácido nítrico, cloridrato de hidroxilamina, entre outros) padrões internos e padrão cromatográfico, matérias certificados de referência, luvas, vidraria (e.g: bequeres, tubo de ensaio, proveta, pipetas volumétricas, balão volumétrico, entre outros), tubos falcon, micropipetas, funil de separação, colunas grossa e fina, entre outros.

Além das metodologias descritas acima, deverão ser realizadas coletas sanguíneas de cetáceos que encalharem vivos para a análise de contaminantes. As coletas deverão ser realizadas em tubos contendo heparina e EDTA, sendo posteriormente encaminhados para o laboratório. As amostras de soro sanguíneo deverão ser estudadas. A quantificação de Mercúrio (Hg) e Selênio (Se) deverá ser obtida através do Método Calorimétrico - Espectrometria de Absorção Atômica. Para obtenção da concentração sérica de Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Cobalto (Co), Molibdênio (Mo) e Chumbo (Pb) a técnica adotada deverá ser a Espectrometria de Emissão Atômica (ICP OES). Quanto a determinação de Cálcio (Ca), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Potássio (K) e Cloro (Cl) deverá ser feita pelo analisador automatizado para testes bioquímicos e imunoquímicos (Labmax® 240) seguindo as recomendações sugerida pelo fabricante.

Para detecção de metais pesados amostras de 1ml de sangue deverão ser coletadas em tubos contendo ácido nítrico ultrapuro em "36-well hotblock a aproximadamente 95°C. Peróxido de nitrogênio ultrapuro 30% deverá ser acrescentado em cada amostra de

sangue para oxidação da matéria orgânica. A amostra de sangue deverá ser evaporada, secada e dissolvida com água deionizada até um volume 15ml de solução. A análise deverá ser realizada através da técnica de espectrofotometria de emissão atômica por ICP-MS. Deverá ser coletado 5 ml de sangue total colhido em frasco contendo EDTA. O exame deverá ser realizado no mesmo dia da coleta, através de um contador automático de células sanguíneas, deverá ser também realizada análise manual através de esfregaço e contagem por câmara de Neubauer. Medição da Atividade da Acetilcolinesterase. Esse parâmetro deverá ser avaliado em amostras de sangue de animais segundo o protocolo proposto por Wilson e Henderson, 2007. As amostras deverão ser imediatamente congeladas em ácido nítrico e encaminhadas ao laboratório. O material deverá ser pesado e homogeneizado com quatro vezes o volume de tampão de homogeneização (Tris HCl 50 mM, KCl 0,15M, pH 7,4), utilizando homogeneizador "Tissue tearor (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado deverá ser centrifugado a 9.000xg por 30 minutos a 4°C. No sobrenadante deverá ser analisada a atividade da enzima acetilcolinesterase. Esta atividade deverá ser determinada pelo método colorimétrico de Ellman et al., (1961) modificado para um leitor de microplacas.

Se os resultados das análises de contaminantes detectarem altas concentrações de metais pesados, os responsáveis deverão entrar em contato imediatamente com o CMA/ICMBio para avaliar a possibilidade de captura de espécimes de cetáceos nativos, não ameaçados de extinção, para análise de parâmetros sanguíneos e demais exames que forem pertinentes.

Nas aves marinhas deverão ser analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As, de amostras de sangue e penas das aves vivas (debilitadas encontradas nas praias, capturadas a bordo das embarcações ou nas ilhas onde reproduzem). Das aves mortas nas praias da região deverão ser realizadas as mesmas análises de duas espécies costeiras, uma residente, o atobá-marrom (*S. leucogaster*) e o migratório (*T. chlororhynchos*). Destas amostras deverão ser realizadas análises de penas, fígado, músculo, rim e ossos. Este material deverá ser congelado para posterior análise. As análises das concentrações destes elementos deverão ser realizadas no mesmo laboratório onde serão realizadas as análises de metais em água, zooplâncton, invertebrados e peixes na região, como parte do anexo 2 deste Termo de Referência. Estes últimos grupos da fauna incluem potenciais presas das aves e desta forma ao usar-se o mesmo procedimento comparações entre os grupos serão possíveis, para um menor entendimento da dinâmica dos elementos contaminantes na região.

As amostras de material biológico das aves deverão ser previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro (Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. As amostras deverão ser então submetidas a digestão ácida em tubos plásticos tipo Eppendorf devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até sua completa digestão. As amostras de material biológico digerido deverão ser avolumadas a 1 mL com água tipo Milli-Q. Imediatamente antes da análise da concentração dos metais, as amostras deverão ser diluídas, conforme a necessidade, utilizando-se água tipo Milli-Q. As amostras de

material biológico, preparadas conforme descrito acima, deverão ser analisadas, em triplicata, por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado (HR-CS-AAS; ContrAA 700 Analytik Jena, Alemanha). As concentrações dos metais no material biológico deverão ser expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido).

Para verificar a acurácia e exatidão das análises, deverão ser realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, deverão ser analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras deverão ser realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, deverão ser utilizadas soluções padrões dos metais analisados (SpecSol®, QuimLab Química & Metrologia, Jacareí, SP, Brazil), rastreadas ao "National Institute of Standards and Technology" (NIST, Gaithersburg, MD, EUA), para verificar a acurácia das medidas. Por sua vez, a exatidão dos resultados obtidos deverá ser avaliada utilizando-se os seguintes materiais de referência certificados para análise de metais traços: proteína de peixe DORM-4 (National Research Council Canada) e tecido de mexilhão ERM-CE278 (European Reference Material). Amostras destes materiais de referência certificados deverão ser tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado, conforme descrito anteriormente.

Análises de ecologia trófica (objetivo 7)

Para a análise dos isótopos estáveis ^{13}C e ^{15}N , deverão ser retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Em aves deverão ser coletados músculos das aves mortas nas praias e sangue das aves vivas. Já existem informações sobre os itens mais frequentes na dieta das principais espécies ocorrentes na região (Di Benedetto *et al.*, 2004, Di Benedetto *et al.*, 2009, Cremer *et al.*, 2012, Lopes *et al.*, 2012, Girundi 2013, Pansard *et al.*, 2010, Rodrigues, 2014). As amostras coletadas deverão ser congeladas e enviadas para análise em laboratório. Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras deverão ser maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 1,5 mg de amostra deverá ser pesada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos deverá ser feita em um espectrômetro de massa DELTA V Thermo Fisher Scientific 17 acoplado a um analisador elementar para C e N (Flash HT Plus). As razões isotópicas são expressas pela notação delta em partes por mil, de acordo com: $\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As razões isotópicas do carbono e nitrogênio são expressas em relação ao padrão V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite) e ao nitrogênio atmosférico, respectivamente. Deverão ser usados materiais certificados de referência em todas as análises. Devido a presença de lipídio ser variável nos tecidos de animais e por apresentar valores depreciados em ^{13}C em relação a todo o corpo (Peterson & Fry, 1987), deverá ser calculado a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra (Post *et al.*, 2007). Caso parte das amostras apresente relação C:N maior do que 3,5, deverá ser feita a normalização matemática dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, segundo a equação: $\delta^{13}\text{C}_{\text{normalizado}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{sem tratamento}} - 3,32 + 0,99 \times \text{C:N}$ (Post *et al.*, 2007).

As análises estatísticas terão enfoque bayesiano (Ellison 2004), utilizando o pacote SIAR (Stable Isotope Analysis in R) (Parnell *et al.*, 2010), no qual os modelos de mistura permitem inferir a composição de dieta a partir de várias fontes potenciais de alimento.

Estudos de idade, crescimento e maturação (objetivo 8)

A idade dos odontocetos é estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, Growth Layer Groups), depositados na dentina e/ou cemento do dente desses animais. Porém, no caso das toninhas, os dentes são extremamente pequenos e por isso a oclusão da cavidade pulpar ocorre muito cedo na vida do indivíduo, fazendo com que 10 as camadas de dentina ali depositadas sejam cada vez mais estreitas, dificultando a contagem destas (Botta 2005). Por isso, os exemplares que apresentarem mais que três GLGs na dentina, deverão ter sua idade estimada a partir das GLGs do cemento; cada GLG corresponde a um ano de vida das toninhas. A determinação da idade deverá ser realizada de acordo com o protocolo estabelecido por PINEDO & HOHN (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo deverão ser colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, deverão ser realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, com cerca de 25 micrometros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento. Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente deverão ser colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados deverão ser colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lamínula e selados com Entellan. As leituras deverão ser realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas deverão ser coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, deverão ser fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Um fragmento da região central do testículo contendo 1 cm³ deverá ser emblocado em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos deverão ser seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções deverão ser coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras deverão ser realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade deverá ser avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também deverão ser avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn *et al.*, 1985). Os ovários deverão ser inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, deverão ser realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os corpora e folículos resultantes

da ovulação foram registrados. A determinação da maturidade sexual deverá ser baseada em Perrin & Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans deverão ser consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteo ou albicans em um ovário deverão ser consideradas maduras.

Interação com a pesca (objetivo 8):

Durante os quatro primeiros anos do projeto os pesquisadores trabalharão diretamente com as comunidades pesqueiras. Entrevistas e saídas com pescadores deverão ser realizadas e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

Deverão ser escolhidos seis pontos de desembarque em comunidades pesqueiras. Num primeiro momento a equipe irá percorrer toda a área de estudo para conhecer o local e contatar as associações e colônias de pesca apresentando-se e fazendo um levantamento preliminar, com base nas informações das colônias e associações, do número atual de pescadores e embarcações existentes em cada comunidade.

Após a fase de levantamento preliminar iniciar-se-á a aplicação de um questionário pré-formulado Felix (2011) para os mestres das embarcações onde deverão ser coletadas informações acerca do perfil dos pescadores e locais em que atuam, características da embarcação (dimensões, tripulação e autonomia), artefatos e técnicas utilizadas, etc. Embora o questionário seja elaborado de forma a permitir a tabulação e análise dos dados, as entrevistas deverão ser conduzidas de forma informal, através de um diálogo entre os agentes de campo e os mestres das embarcações, podendo este diálogo ser interrompido e retomado em outro momento até que toda a informação necessária seja coletada. Estes diálogos poderão ser gravados ou não, dependendo da anuência do entrevistado e as informações só deverão ser incluídas no estudo com a autorização do mesmo.

Nesta etapa quando autorizado, deverão ser fotografados os tipos de embarcação e apetrechos de pesca utilizados.

Nesta primeira fase as entrevistas terão como foco as atividades de pesca em si, não sendo trabalhada diretamente a questão das capturas, embora este assunto possa surgir de forma espontânea durante a entrevista. As comunidades deverão ser visitadas regularmente.

Ao final pretende-se ter informações a respeito de avistamentos, ocorrência de capturas acidentais de cetáceos e das características dos artefatos pesqueiros (tipo de rede, malha, etc.).

Os questionários aplicados deverão ser agrupados, de acordo com as respostas obtidas, evidenciando as convergências de informações sobre os diversos temas abordados.

Após os quatro primeiros anos de projeto deverão ser realizados acompanhamentos para se identificar possíveis mudanças a médio e longo prazos.

Monitoramento de áreas de desova de Tartarugas marinhas (objetivo 10)

A área de estudo reprodutivo de quelônios marinhos (monitoramento dos ninhos e das fêmeas) localiza-se nas praias do entorno da foz do rio Doce, 37 km a sul e 110 km a norte. Esta é uma área de reprodução com maior ocorrência de ninhos e por isso sua relevância para o equilíbrio das populações das espécies alvo. Os indivíduos adultos chegam na região da foz do rio Doce para acasalamento e desova entre setembro a março de cada ano.

No trecho sul está localizada, a praia de Comboios, incluindo a Reserva Biológica de Comboios e a Terra Indígena de Comboios. Ao norte, localizam-se as praias de Povoação, Monsarás, Cacimbas, Ipiranga, Ipiranguinha, Pontal do Ipiranga e Boca da Barra Seca, Campo Grande. Barra Nova e Guriri.

A execução das atividades previstas nesta proposta, a partir dos objetivos estabelecidos, deverá ser baseada na metodologia padrão do Centro Tamar, que possibilite os estudos de avaliação de localização dos ninhos, identificação das espécies e avaliação do sucesso reprodutivo, entre outros como meios para avaliar o impacto deste evento, incluindo estudos que avaliem a contaminação dos animais e alterações do habitat que limitem ou impeçam a reprodução destas espécies.

A área de abrangência do monitoramento noturno deverão ser as praias ao sul (37 km) e ao norte (110 km) da foz do rio Doce onde estudos pretéritos de 30 anos já são realizados pelo Centro Tamar e a comparação com a série histórica possibilitará através da análise de alguns parâmetros reprodutivos, a avaliação do possível impacto do desastre ambiental, sobre o comportamento reprodutivo das fêmeas.

Este estudo irá requerer o monitoramento noturno das praias para flagrar as fêmeas em processo de desova. Quando encontradas, as fêmeas deverão ser marcadas com anilhas metálicas, ou, se já existentes, deverá ser registrado o número da marca. Outros dados também deverão ser coletados, conforme ficha padrão do Centro Tamar, com adicionais que se julgar necessário.

As informações buscadas deverão estabelecer o período e deslocamento internidal, retornos interanuais, locais de preferência para desovas, com acompanhamento de longo prazo das fêmeas, entre outros, visando a observação de possíveis impactos. O flagrante da fêmea deverá permitir a coleta de tecido e/ou de sangue para os estudos da análise de contaminantes ou genéticos.

Todas as manhãs, nos cerca de 147 km de praias, deverão ser monitorados os ninhos da noite anterior, com o registo de sua localização geográfica por GPS, dados coletados em planilha específica. Quando necessário, o ninho deverá ser protegido por telas contra predadores ou transferido para local mais seguro (por exemplo, quando houver muita iluminação artificial que possa desorientar os filhotes, ou quando o ninho estiver muito próximo da preamar). Todos os ninhos deverão ser protegidos e monitorados até sua eclosão, a fim de garantir os dados reprodutivos. Após o ninho eclodido, o mesmo deverá ser aberto e outros dados são coletados, como a espécie, número de filhotes nascidos, natimortos, ovos não viáveis e data de eclosão, conforme protocolo do Centro Tamar-ICMBio.

Além do monitoramento dos ninhos, ações de proteção dos ovos e filhotes contra predadores e outras ações antrópicas (fotopoluição, coleta dos ovos, degradação da praia

e destruição dos ninhos) são necessárias para obtenção dos dados reprodutivos, e assim garantirem o nascimento dos filhotes e a continuidade do ciclo de vida das tartarugas marinhas.

A variação temporal e espacial dos ninhos e sua taxa de eclosão são informações relevantes para a análise de alterações comportamentais e fisiológicas. Estes dados deverão ser comparados com a série histórica de 35 anos de dados do TAMAR e com a alteração das características físicas locais, numa análise integrada com outros estudos de sedimentologia, qualidade da água, entre outros.

Para uma melhor avaliação de possíveis mudanças de comportamento das fêmeas relacionadas ao vazamento de rejeitos de mineração da Samarco, sua distribuição e uso da área (vertical e horizontal) além de identificar áreas de alimentação e áreas de uso internidal de *Caretta caretta*;, 20 transmissores de monitoramento satelital deverão ser instalados em fêmeas desta espécie durante a estação reprodutiva.

Os transmissores deverão ser instalados no início do período reprodutivo em fêmeas flagradas durante o monitoramento noturno, visando o acompanhamento durante todo o período de desovas. A instalação deverá seguir o protocolo de fixação de transmissores de satélite elaborado pelo projeto TAMAR. Deverão ser utilizados marcadores que possibilitam obtenção de dados como tempo e profundidade do mergulho, associados aos dados de posicionamento geográfico.

Os dados deverão ser coletados via sistema de satélite Argos (<http://argosinc.com>). A plataforma Argos retransmite automaticamente as mensagens que são recebidas por satélite para centros de processamento da Argos, que por sua vez disponibiliza através de um site onde os dados são exibidos em mapas, tabelas ou gráficos. Os sinais obtidos, após filtragem deverão ser analisados quanto a distribuição em relação a área de influência da pluma de rejeitos e ao longo das demais áreas de uso registradas no estudo. As informações geradas por animais que continuem a transmitir sinais após deixarem a área reprodutiva deverão ser utilizadas na descrição de rotas migratórias assim como para identificação de áreas de alimentação ou mesmo para avaliar o comportamento de retorno para área reprodutiva em períodos subsequentes.

Saúde e eficiência reprodutiva de Tartarugas marinhas (objetivo 11)

Este estudo deverá abranger as três espécies principais que utilizam a região afetada como área reprodutiva ou de alimentação, que são:

Chelonia mydas na fase juvenil;

Caretta caretta na fase adulta reprodutiva (fêmeas), ovos e filhotes neonatos;

Dermochelys coriacea na fase de ovo e filhotes neonatos.

O estudo deverá ser realizado na área de reprodução de *C. caretta* e *D. coriacea* no limite sul da Reserva biológica de Comboios em Regência até o limite norte da lagoa Monsarás em Povoação, Linhares. O monitoramento deverá contemplar para fins de comparação, a amostragem em área de reprodução controle da Praia do Forte, BA.

A área de alimentação a ser considerada deverá incluir minimamente a zona de amortecimento da APA Costa das Algas a partir da foz do Rio Piraquê-açu. Para fins de

comparação, o monitoramento deverá contemplar a região do banco dos Abrolhos, no entorno da ilha de Coroa Vermelha, Nova Viçosa, BA.

O monitoramento da fase reprodutiva deve ser diário ao longo de toda a temporada reprodutiva para amostragem de ovos, filhotes e fêmeas adultas e deve contemplar no mínimo 5 temporadas reprodutivas completas ou até quando persistir o efeito dos rejeitos sobre o ambiente marinho. O monitoramento de *C. mydas* juvenis deve ser no mínimo a cada 4 meses (trimestral) para obtenção de amostras com verificação de sazonalidade e deve durar no mínimo 5 anos ou até quando persistir o efeito dos rejeitos de mineração sobre o ambiente marinho.

O estudo deverá avaliar as seguintes questões:

- 1- A presença de contaminantes provenientes do fluxo de rejeitos de mineração no ambiente ou mobilizados pelo fluxo de rejeitos no organismo das tartarugas juvenis (*C. mydas*) e adultas (*C. caretta*) a ponto de afetar os parâmetros clínico-laboratoriais de saúde da população a curto, médio e longo prazo.
- 2- A transmissão vertical de contaminantes (da fêmea para ovos e filhotes) em *C. caretta* e observar o efeito dos níveis de contaminantes sobre o sucesso de eclosão dos ninhos durante as temporadas reprodutivas enquanto houver influência dos rejeitos sobre o meio marinho. Em razão da dificuldade de obtenção de amostras sanguíneas de *D. coriacea*, estimar o grau de contaminação das fêmeas a partir dos níveis encontrados nos ovos e filhotes bem como a influência dos níveis detectados sobre o sucesso de eclosão.
- 3- Avaliar se o impacto sobre o meio afetou ou afetará a abundância da espécie, a disponibilidade de alimento e o status nutricional de *C. mydas* juvenis através de parâmetros clínico-laboratoriais na área afetada a curto, médio e longo prazo.

A avaliação deverá ser realizada através de meios minimamente invasivos, utilizando amostras sanguíneas, ovos e filhotes neonatos vivos ou natimortos. Para a obtenção dos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e toxicológicos de juvenis e adultos deverá ser examinado um n amostral mínimo de 60 amostras sanguíneas por temporada reprodutiva, distribuídas ao longo da temporada de indivíduos diferentes. Deve-se obrigatoriamente considerar todas as eventuais recapturas sem prejuízo para o n mínimo de 60 indivíduos diferentes. Para juvenis, deverá ser obtido um n amostral mínimo de 15 indivíduos por trimestre, totalizando 60 por ano. Deve-se obrigatoriamente considerar todas as eventuais recapturas sem prejuízo para o n mínimo de 15 indivíduos diferentes.

Para ovos e filhotes deverá ser obtido um n mínimo de 3 ovos e filhotes por ninho, que podem ser avaliados individualmente ou em pool, totalizando 60 ninhos por temporada para *Caretta caretta* e 45 para *Dermochelys coriacea*.

Em adultos e juvenis os seguintes parâmetros deverão ser coletados:

Exame clínico realizado por médico veterinário

Hemograma realizado “in loco”.

Perfil bioquímico plasmático: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fosforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato amino- transferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase.

Elementos traço ao nível de partes por bilhão: As, Ni, Cd, Mn, Fe, Cu, Al, Se, Hg, Pb, Zi, Cr, V, Es, Ti.

Poluentes orgânicos persistentes ao nível de partes por bilhão: Bifenilas policlo- radas (PCBs) totais e específicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) totais e específicos, pesticidas organoclorados (OCs) totais e específicos.

Em ovos e natimortos:

Elementos traço ao nível de partes por bilhão: As, Ni, Cd, Mn, Fe, Cu, Al, Se, Hg, Pb, Zi, Cr, V, Es, Ti.

Poluentes orgânicos persistentes ao nível de partes por bilhão: Bifenilas policlo- radas (PCBs) totais e específicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) totais e específicos, pesticidas organoclorados (OCs) totais e específicos.

Periodicidade e intervalos amostrais

| Objetivo | Área de atuação | Periodicidade | Duração | Habitats atingidos |
|---|---|--|----------------|------------------------------------|
| <i>Avaliar e monitorar a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce (objetivo 1)</i> | Do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos até a APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz | Uma vez por ano | 3 meses | Plataforma continental |
| <i>Monitorar os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES (objetivo 3 e fonte de amostras para os objetivos 4 a 8)</i> | | Diária | Contínua | Praias arenosas |
| <i>Determinar e monitorar a associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce (objetivo 2)</i> | Estuário do Piraquê-Acú e Rio Doce, áreas costeiras adjacentes ao Rio Doce | Semanal para censos visuais e mensal para drones | 5-10h | Estuários e plataforma continental |
| <i>Identificação de micro-habitats com ROV (parte do objetivo 2)</i> | Áreas costeiras adjacentes ao Rio Doce | Mensal | 10 dias | Plataforma continental |
| <i>Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES (objetivo 9)</i> | Itaúnas, Conceição da Barra, Guriri, Barra Nova, Uruçuquara, Barra Seca, Pontal do Ipiranga, Povoação, Regência, Barra do Riacho e Santa Cruz | Mensal | 10 dias | Estuários e praias arenosas |
| <i>Monitorar as áreas de desova de <i>Caretta</i>, <i>caretta</i> e <i>Dermochelys coriácea</i> ao redor da foz do Rio Doce (objetivo 10).</i> | 37 km ao sul e 110 km ao norte do foz do Rio Doce | Diariamente de Setembro a março de cada ano | 210 dias | Praias arenosas |

Tipo de produto em relação ao impacto sobre a foz do Rio Doce e adjacências.

Produtos gerais

- 1) Determinação dos efeitos crônicos do impacto dos rejeitos de minério associados a foz do Rio Doce através das alterações da distribuição e abundância dos organismos em relação as áreas mais impactadas. Espera-se, que os efeitos crônicos, se verificados, resultarão em diminuição gradual da abundância nas áreas investigadas e alterações no padrão de distribuição que impliquem em menor ocupação dos organismos em áreas mais impactadas.
- 2) Possível alteração do padrão de ocupação dos micro-habitats ao longo do tempo associado aos impactos dos rejeitos de minério, a qual pode ser verificado pela diminuição da ocupação de micro-habitats próximos a foz do rio Doce.
- 3) Variação nas concentrações de contaminantes, prevalências de patógenos e histopatologias associados a área de encalhe mais próximas a foz do Rio Doce ao longo do período de monitoramento e em relação á distância da foz.
- 4) Estudo da diversidade genética dos cetáceos nas áreas estudadas sob influência do impacto dos rejeitos de minério da foz do Rio Doce para identificar diferenciação populacional, determinar parâmetros demográficos e evolutivos dessas populações e monitorá-las ao longo do tempo.

Avaliações Desejadas/Produtos

- Número de grupos, número de indivíduos por grupo, tempo de uso, comportamentos realizados, tipo de maré, estação do ano, entre outros itens, que caracterizará a ocorrência e o uso do estuário do rio Doce, bem como da área posterior a foz e áreas adjacentes;
- Os animais continuam a usar o estuário do rio Doce mesmo após o impacto da chegada da lama? Para alimentação? Pra desova? Com que frequência? Em que época do ano?
- Número de cetáceos, quelônios e aves encontrados mortos nas praias do ES durante o estudo, espécie, sexo, biometria, localização, causa *mortis*, etc;
- Serão encontrados mais cetáceos, quelônios e aves mortos após a chegada da lama? Qual espécie sofrerá mais?
- Índices de diversidade (nucleotídica, haplotípica, número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade observada, endogamia, etc.), estruturação genética (*Fst*, *Rst*, AMOVA, etc);
- Qual o número de populações de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*? Qual o tamanho das populações de desova de *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea*? Qual o tamanho e a diversidade genética destas populações? Populações menores sofreram mais o impacto.
- Idade do indivíduo, idade de maturação, estágio reprodutivo e taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias dos Espírito Santo, durante o período de estudo;
- Os filhotes ou indivíduos mais jovens sofrerão mais com o impacto? O tempo de maturação ou fertilidade destes animais serão afetados?
- Patologias encontradas cetáceos encontrados mortos nas praias do ES durante o estudo;
- Alguma histopatologia será encontrada com maior frequência após o impacto? Estas poderão estar relacionadas com a morte do animal?

- Isótopos e estáveis e Taxas de micropoluentes (mercúrio total), elementos-traço, compostos organoclorados, compostos organobromados e HPAs;
- Respostas sobre o tipo de pesca desenvolvido na região, aparato utilizado, captura acidental, frequência, espécie afetada, etc
- O tecido dos cetáceos encontrados mortos no ES apresenta taxas maiores destes componentes após o impacto? Qual a diferença entre as espécies? E quanto ao sexo e idade dos indivíduos? Como está o fluxo destes contaminantes na cadeia trófica dos pequenos cetáceos? Se houver estruturação genética entre os indivíduos e forem detectadas populações isoladas e /ou de baixa diversidade genética, como está a taxa destes contaminantes nestas?

4. Referências Bibliográficas

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 1, p. 2007.
- ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, n.49, p. 227-267. 1974.
- AMOS W, HOELZEL AR (1991). Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. *Rep Int Whal Commn Spec Issue* 13: 99-103.
- AMOS, B. AND HOELZEL, A.R. (1991). Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. Pages 99-103 in A.R. Hoelzel and G.P. Donovan (Eds). *Genetic Ecology of Whales and Dolphins - Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*. IWC, Cambridge.
- APPELBEE, A. J.; et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Vet. Parasitol.*, 173: 19-23, 2010.
- ARGOS. 1996. User's manual. CLS/Service Argos, Toulouse.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile FOR polychlorinated biphenyls (PCBs)*, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 948 p, 2000.
- AVALOS-TÉLLEZ, R.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; CARRILLO-CASAS, E.M.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. 2010. Bacteria and yeast normal microbiota from respiratory tract and genital area of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). In: MENDÉZ-VILAS, A. (Ed). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol 1, Formatex, pp. 666-673.
- BAILY, G. G., KRAHN, J. B., DRASAR, B. S., STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 95, 271-275, 1992.
- BARRET, T.; VISSER, I. K.; MAMAEV, L.; GOATLEY, L.; VAN BRESSEM, M. F.; OSTERHAUST, A. D. 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012.
- BASTOS, W. R.; MALM, O. ; PFEIFFER, W. C. ; CLEARY, D. 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.
- BELLIÈRE, E. N.; ESPERON, F.; FERNANDEZ, A.; ARBELO, M.; MUNOZ, M. J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. 2011. Phylogenetic analysis of a new Cetacean

morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res Vet Sci* 90: 324-328.

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.

BEVAN, ELIZABETH, THANE WIBBELS, ERICA NAVARRO, MANUEL ROSAS, BLANCA M. Z. NAJERA, LAURA SARTI, FRANCISCO ILLESCAS, JAVIER MONTANO, LUIS J. PEÑA AND PATRICK BURCHFIELD. Using unmanned aerial vehicle (UAV) technology for locating, identifying, and monitoring courtship and mating behavior in the Green Turtle (*Chelonia mydas*). *Herpetological Review* 47 (1): 27-32, 2016.

BOSSART, G. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees. *Microbe*, v.2, n.11, p.544-549, 2007.

BOTTA, S. Reprodução e crescimento dos machos de toninha (*Pontoporia blainvillei*) do Rio Grande do Sul, Brasil. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

BRACHT, A.J., BRUDEK, R.L., EWING, R.Y., MANIRE, C.A., BUREK, K.A., ROSA, C., BECKMEN, K.B., MARUNIAK, J.E., ROMERO, C.H. (2006). Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds. *Archives of Virology*, 151: 423-438.

BRICKER, B. J., EWALT, D. R., MACMILLAN, A. P., FOSTER, G., BREW, S. Molecular characterization of *Brucella* strains isolates from marine mammals. *Journal of clinical microbiology*, 38:1258-1262, 2000.

BRILHANTE, R.S.N.; CASTELO BRANCO, D.C.S.; SOARES, G.D.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C. ; ROCHA, M.F.G. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, n.6, p.718-723, 2010.

BUCKLAND, S.T.; ANDERSON, D.R.; BURNHAM, K.P.; LAAKE, J.L.;

BUREK, K.A.; GULLAND, F.M.D.; O'HARA, T.M. Effects of climate change on arctic marine mammal health. *Ecological applications*, v.18, n.2, p.126-134, 2008.

CANDIA-GALLARDO C., AWADE M., BOSCOLO D., BUGONI L. 2010. Rastreamento de aves através de telemetria por rádio e satélite. Pp. 255-280, In: *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. VON MATTER S, STRAUBE FC, CÂNDIDO JR JF, PIACENTINI V, ACCORDI I (eds.). Technical Books Editora, Rio de Janeiro.

CHAZAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 4121-4133, 2009.

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 years old 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.

CUNHA, H. A.; MEDEIROS, B. V.; BARBOSA, L. A.; CREMER, M. J.; MARIGO, J.; LAILSON-BRITO, J.; AZEVEDO, A. F.; SOLÉ-CAVA, A. M. Population structure of the endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing management units. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, e85633, 2014.

DANILEWICZ, D.; MORENO, I.B.; OTT, P.H.; TAVARES, M.; AZEVEDO, A.F.; SECCHI, E.R.; ANDRIOLO, A. Abundance estimate for a threatened population of franciscana dolphins in southern coastal Brazil: uncertainties and management implications. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 90, p. 1659-1666, 2010.

DANILEWICZ, D.; ZERBINI, A.N.; ANDRIOLO, A.; SECCHI, E.R.; SUCUNZA, F.; FERREIRA, E.; DENUNCIO, P.; FLORES, P.A.C. Abundance and distribution of an isolated population of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in southeastern Brazil: red alert for FMA I? Paper SC/64/SM17 presented to the IWC Scientific Committee. Panama 2012.

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 prey species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 89, 903-905.

Diamond, J.M. 'Normal' extinction of isolated populations. *Extinctions* (ed. M.H. Nitecki), pp. 191-246. Chicago University Press, Chicago, 1984.

DIZON, A.E.; S.J. CHIVERS & W.F PERRIN. (1997). Molecular genetics of marine mammals. Special publication Number 3 of the Society for Marine Mammalogy. 388p.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serologic responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal*, v. 19, n. 4, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*. v. 116, p. 275–296, 2003.

DUNBAR, S.G., ITO, H.E., BAHJRI, K., DEHOM, S., SALINAS, L. Recognition of juvenile hawksbills *Eretmochelys imbricata* through face scale digitization and automated searching. *Endangered Species Research*. 26: 137 – 146, 2014.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*, v.25, p.827-839, 2001.

ELLISON, A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7:509–520.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR, AND FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961.

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.

FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. 618p, 2010.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, 2002.

FRIDOLFSSON AK, ELLEGREN H (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116–121.

FRIEND, M.; THOMAS, N. Disease prevention and control in endangered avian species: Special considerations and needs. *Acts Congressus Internationalis Ornithologici*, v. 20, p. 2331-2337, 1992.

GENNARI, S. M. ; SOARES, H. S. ; NIEMEYER, Claudia ; CATÃO-DIAS, JOSÉ LUIZ ; MUSSO, C. M. ; SIQUEIRA, G. C. C. ; DUBEY, J. P. . Ocorrência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em aves marinhas do arquipélago de Abrolhos-Bahia, Brasil. In: *Wildlife Disease Association Latin America*, 2013, São Paulo. I *Wildlife Disease Association Latin America*, 2013.

GERACI, J. R. AND LOUNSBURY, V.J. (1993) *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*. Texas A&M Sea Grant.

GIRUNDI, I. S., Dieta de Sotalia guianensis (VAN BÉNÉDEN, 1864) (Cetácea, Delphinidae), no estado do Espírito Santo, Brasil. Monografia de graduação. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

GOUDET, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.

GOULD, P.J. E FORSELL, D.J. 1989. Techniques for shipboard surveys of marine birds. Pp.1-23. Washington, D.C.: Fish and Wildlife Service 25.

HARRISON, P. 1985. *Seabirds, an identification guide*. Houghton Mifflin, Boston.

HATCH, L. T., CLARK, C. W., VAN PARIJS, S. M., FRANKEL, A. S., AND PONIRAKIS, D. W. (2012). "Quantifying loss of acoustic communication space for right whales in and around a U.S. National Marine Sanctuary," *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology* 26, 983-994.

HEINEMANN, D. 1981. A range finder for pelagic bird censusing. *Journal of Wildlife Management* 45 :489-493.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, p. 473-477, 1982.

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

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação. Versão II. Brasília, DF, Brasil, 2001.

International Whaling Commission, v. 6, p. 1-24, 1984.

KARESH, W.B. et al. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.28, p.368-377, 1997.

KEID, L.B., SOARES, R.M., VIEIRA, N.R., MEGID, J., SALGADO, V.R., VASCONCELLOS, S.A., DA COSTA, M., GREGORI, F., RICHTZENHAIN, L.J. Diagnosis of canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Veterinary Research Communications*, 31 (2007) 951-965, 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 1073-1081, 2004.

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

LAILOLO, P. (2010). "The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation," *Biological Conservation* 143, 1635-1645.

LOPES, X. M., SILVA, E., BASSOI, M., SANTOS, R. A.; SANTOS, M. C. O. Feeding habits of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from southeastern Brazil: new items and a knowledge review. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 92, 1723-1733, 2012.

MACHADO, E. C. L. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE. Tese em Nutrição. 141p. 2006

MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; BASTOS, W. Utilização do acessório de vapor frio para investigação de mercúrio em amostras ambientais por espectrofotometria de absorção atômica. *Ciência e Cultura*, [S.l.], v. 41, p. 88-92, 1989.

MARQUES, F.F.C.; BUCKLAND, S.T. Incorporating covariates into standard line transect analyses. *Biometrics*, v. 59, p. 924-935, 2003.

MARQUES, T. A., THOMAS, L., MARTIN, S. W., MELLINGER, D. K., WARD, J. A., MORETTI, D. J., HARRIS, D., AND TYACK, P. L. (2013). "Estimating animal population density using passive acoustics," *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88, 287-309.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2014. Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Portaria No. 444, de 17 de dezembro de 2014.

- MOORE, S. E. Marine mammals as ecosystem sentinels. *J. Mammalogy*, 89 (3): 534-540. 2008.
- NIEMEYER, Claudia; MUSSO, C. M. ; SIQUEIRA, G. C. C. ; CATÃO-DIAS, JOSÉ LUIZ . Weights, hematology and plasmatic chemistry of 33 free-ranging *Phaeton* tropical pelagic seabirds. In: Wildlife Disease Association Latin America, 2013, São Paulo. I Wildlife Disease Association Latin America, 2013. v. 1.
- OLIVEIRA, L. R.; OTT, P. H.; FLORES, P. A. C.; SICILIANO, S.; ALMEIDA, R. S.; BONNATO, S. L. First molecular estimate of sex-ratio of southern right whale calves (*Eubalaena australis*) for Brazilian waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 89, n. 5, p. 1003-1007, 2009.
- ONLEY, D. & SCOFIELD, P. 2007. Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters of the world. Christopher Helm Publishers Ltd.
- PAIVA, J. B.; STERZO, E. V.; RIBEIRO, S. A.; PEREIRA, E. A.; BERCHIERI-JÚNIOR, A. Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto por amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 3, p. 236-269, 2006.
- PANSARD K. C. A., GURGEL H. C. B., ANDRADE L. D. A., YAMAMOTO M. E. Feeding ecology of 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.
- PASBØLL, P. J.; VADER, A.; BAKKE, I.; EL-GEWELY, M. R. Gender determination in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology*, v. 70, p. 2166-2170, 1992.
- PAULINO, R. C. Detecção molecular de *Giardia* sp. em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. Tese de doutorado. 122p., 2005.
- PAZ E SILVA, F. M. Diagnóstico e caracterização de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos. Dissertação (Mestrado) , 2007.
- PERRIN, W. F.; G. P. DONOVAN. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth.
- 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.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, n. 155, p. 945-959, 2000.
- REIS EC, SOARES LS, VARGAS SM, SANTOS FR, YOUNG RJ, BJORNDAL KA, BOLTEN AB, LÔBO-HAJDU G. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics* 11, 1467-1477, 2010

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.

ROONEY, A.P.; RODNEY, L.H. & DERR, J.N. (2001). Historical Population Size Change of Bowhead Whales Inferred from DNA Sequence Polymorphism Data. *Evolution*, 55(8): 1678-1685.

ROSEL, P.E. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*, v.4, p. 647-649, 2003.

SANTOS, M. C. O.; OSHIMA, J. E. F.; PACÍFICO, E. S.; SILVA, E. Guiana dolphins, *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae), in the Paranaguá Estuarine Complex: insights on the use of area based on the photo-identification technique. *Zoologia*, v. 27, n. 3, p. 324-330, 2010.

SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; OTT, P.H. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. *Journal Cetacean Research Management*. v.5, n. 1, p. 61–68, 2003a.

SHAMBLIN, BM, AB BOLTEN, FA ABREU-GROBOIS, KA BJORNDAL, L CARDONA, C CARRERAS, M CLUSA et al. Geographic patterns of genetic variation in a broadly distributed marine vertebrate: New insights into loggerhead turtle stock structure from expanded mitochondrial DNA sequences. *PLoS ONE* 9: e85956. doi:10.1371/journal.pone.0085956. 2014.

SHIVAPRASAD H.L. Pathology of birds – an overview. Presented at the C.L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals, AFIP, Washington DC, 2002.

SICILIANO, S.; ALVES, V.; HACON, S. Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: Uma revisão do conhecimento brasileiro. *Cadernos Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 927 - 946, 2005.

SMOLOWITZ RJ, PATEL SH, HAAS HL, MILLER SA. Using a remotely operated vehicle (ROV) to observe loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) behavior on foraging grounds off the mid-Atlantic United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 471: 84-91, 2015.

SPEAR, L.B., AINLEY, D.G., HARDESTY, B.D., HOWELL, S.N.G. E WEBB, S.W. 2004. Reducing biases affecting at-sea surveys of seabirds: use of multiple observer teams. *Marine Ornithology* 32:147-157.

TASKER, M.L., JONES, P.H., DIXON, T. E BLAKE, B.F. 1984. Counting seabirds at sea from ships: a review of methods employed and a suggestion for a standardized approach. *Auk* 101:567-577.

VAN BRESSEM, M.-F.; RAGA, J. A.; GUARDO, G. D. et al. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. Aquat. Org.*, v. 86, p. 143-157. 2009.

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.

VAN PARIJS, S. M., CLARK, C. W., SOUSA-LIMA, R. S., PARKS, S. E., RANKIN, S., RISCH, D., AND VAN OPZEELAND, I. C. (2009). "Management and research applications of real-time and archival passive acoustic sensors over varying temporal and spatial scales," *Marine Ecology Progress Series* 395, 21-36.

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

VARGAS SM, MOLFETTI E, VILAÇA ST, MONTEIRO D. ESTIMA SC, SOARES LS, ALMEIDA AP, de THIOSY B, NARO-MACIEL E, SANTOS FR. Mixed stock analysis of leatherback turtles feeding in Brazil: Records over four years. *Proceeding of the 33rd Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, Baltimore, Maryland, USA. 2013

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.

WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

WILSON, B.W. AND HENDERSON, J.D. Determination of Cholinesterase in Blood and Tissue. *Current Protocols in Toxicology*. 2007

XIAO, L.; et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (3): 1097-1101, 2001.

ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; ANDRIOLO, A.; LAAKE, J.L.; AZEVEDO, A.F. Abundance and distribution of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the Franciscana Management Area II (southeastern and southern Brazil). Paper SC/62/SM7 presented to the IWC Scientific Committee. Agadir, Morocco: 14p. 2010.