

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

**SUB-PROJETO: Monitoramento cetáceos a partir de técnicas de sobrevoos,
imageamento subaquático e hidroacústica**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Agnaldo Silva Martins	Coordenador temático Anexo 6 - coordenador do subprojeto de sobrevoos e acústica - coordenador e executor do projeto de monitoramento do uso de habitats com drones e ROVs	UFES
Artur Andriolo	Coordenador do projeto de monitoramento hidroacústico de cetáceos	UFJF
Profissional Mestre II /Profissional sênior II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II /Profissional sênior II	Pesquisador	UFES
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFJF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFJF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Técnico nível médio	Pesquisador	UFJF
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

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*) (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.

Para o acompanhamento de tartarugas marinhas, o censo aéreo não é a metodologia mais adequada, mas o registro dos quelônios eventualmente detectados por estes sobrevoos serão registrados (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio). Para o monitoramento de aves, por sua vez, o Anexo 6 não prevê em nenhum momento o uso de veículos aéreos tripulados para estudar aspectos de distribuição, área de vida ou abundância de aves, as quais, por suas características biológicas são incompatíveis com essas metodologias.

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).

3. OBJETIVO

- 1) Avaliar e monitorar, por um período de 12 meses a distribuição, abundância e área de vida de 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 12 meses, associação de 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.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 (objetivo 1) - Estudos de distribuição e abundância de toninhas por censos aéreos tripulados

Avaliar e monitorar, por um período de 12 meses a distribuição, abundância e área de vida de toninhas 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. Realização dos sobrevoos, estimativas de abundância, elaboração de relatórios. Censo aéreo de toda a área realizado em 45 dias no verão/início de outono.

Meta 2 (objetivo 1) - Estudos de distribuição e abundância de baleia jubarte por censos aéreos tripulados

Avaliação e monitoramento, por um período de 12 meses da distribuição, abundância e área de vida de baleia jubarte 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. Realização dos sobrevoos, estimativas de abundância, elaboração de relatórios. Censo aéreo de toda a área realizado em 60 dias no inverno/início de primavera .

Meta 3 (objetivo 2) - Monitoramento de associação de cetáceos com micro-habitats costeiros

Determinar e monitorar por um período 12 meses, associação 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. Realização de sobrevoos regulares, realização de sobrevoos de oportunidade, processamento dos vídeos, análises numéricas, elaboração de relatórios. Campanhas mensais.

Meta 4 (objetivo 2) - Identificação e descrição de micro-habitats

Identificar micro-habitats costeiros associados a concentrações de cetáceos 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. Realização de campanhas de mar com filmagens subaquáticas com o uso de ROV, processamento dos vídeos, análises numéricas, elaboração de relatórios. Campanhas semestrais.

Meta 5 (objetivo 2) - Avaliações acústicas de cetáceos

Determinação do uso da área pelos animais, através da interpretação de seus sinais sonoros (taxa e períodos de emissão das vocalizações e dos sons de ecolocalização). Avaliação das 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. Realização das campanhas de mar, análise dos resultados, elaboração de relatórios. Realização de campanhas anuais.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>Registros de ocorrência de toninha (posição geográfica por indivíduo identificado).</p> <p>Registros de ocorrência de baleia jubarte (posição geográfica por indivíduo identificado).</p> <p>Registro de ocorrência de grupos de cetáceos (espécie, número de indivíduos e posição geográfica)</p> <p>Identificação e descrição dos habitats de maior associação com grupos de cetáceos</p> <p>Descrição da composição de cada grupo de cetáceos registrado, tipo e o comportamento. Lista de categorias comportamentais de acordo com os etogramas empregados para cada espécie</p>	<p align="center">Agnaldo Silva Martins (Daniel Danilewicz – GEMARS)</p> <p align="center">Agnaldo Silva Martins</p> <p align="center">Artur Andriolo</p>
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>Análise da densidade de indivíduos utilizando o estimador Horvitz-Thompson</p> <p>Análise da distribuição espacial das espécies através de modelos de estimativa superficial da densidade</p> <p>Análise da distribuição espacial de grupos de cetáceos usando técnicas de SIG ao redor da foz do Rio Doce</p> <p>Análise espacial da associação de habitats identificados com grupos predominantes.</p> <p>As análises das emissões sonoras e a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento</p>	<p align="center">Agnaldo Silva Martins (Daniel Danilewicz – GEMARS)</p> <p align="center">Agnaldo Silva Martins</p> <p align="center">Artur Andriolo</p>

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Distribuição e abundância

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

Os sobrevoos serão realizados 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. Os sobrevoos destinados aos pequenos mamíferos e tartarugas terão como limite oceânico a isóbata de 25m, e os destinados a baleia-jubarte a isóbata de 500m.

Os sobrevoos deverão ser realizados usando o método de amostragem por distâncias ao logo de 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 largura 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 sobrevoo. Dois observadores posicionados na frente (janelas-bolha) e dois atrás (janelas-plana) deverão trabalhar simultaneamente e de forma independente, não havendo comunicação (acústica ou visual) entre eles durante o esforço de observação. Para os sobrevoos dedicados a avaliação de pequenos mamíferos e tartarugas, a equipe deverá ser formada por observadores com experiência prévia de monitoramentos aéreos. Apesar da experiência prévia da equipe, um sobrevoo 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 - registrada visualmente como "turva" ou "clara", e (4) visibilidade. A 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, a espécie, o tamanho do grupo, presença de filhotes e o ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo detectado. Caso não seja possível determinar a espécie de mamífero marinho no momento da detecção e/ou tamanho do grupo, o esforço de observação poderá ser encerrado para realizar o registro fotográfico do grupo para posterior análise em laboratório. Este procedimento deverá ser avaliado caso a caso pelo coordenador do voo, levando em consideração tempo de voo, características da detecção e relevância para o escopo do estudo aqui proposto. O ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo avistado deverá ser coletado pelo observador com o auxílio de um inclinômetro assim que o grupo estiver perpendicular ao observador. A partir deste ângulo e da altitude da aeronave deverá ser calculada a distância perpendicular entre o grupo detectado e o transecto percorrido pelo avião. 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. Todas as informações deverão ser registradas em gravadores digitais individuais e georreferenciadas com base na hora do registro.

Ao longo do projeto, serão realizados um monitoramento anual para pequenos cetáceos e tartarugas e um monitoramento anual para grandes baleias. O monitoramento aéreo para pequenos cetáceos e tartarugas será realizado durante 45 dias no verão/início de outono. Será empregado um total de 60 horas de voo, incluindo esforço de observação e deslocamento da aeronave. O monitoramento destinado às baleias será realizado no inverno/início de primavera a fim de contemplar a sazonalidade de ocorrência deste grupo na região. O trabalho de campo será realizado em 60 dias e será empregado um total de 120 horas de voo, incluindo esforço de observação e deslocamento da aeronave. É importante notar que o registro e contagem de cetáceos e tartarugas a partir de aeronave é sensível ao estado do mar, devendo ser realizado apenas em condições meteorológicas (vento e chuva) apropriadas a fim de minimizar a perda de animais pelos

observadores. Neste sentido, parte dos dias alocados para o trabalho de campo deverão ser de espera por condições meteorológicas favoráveis pela equipe de observadores.

Para avaliar a densidade de mamíferos, a probabilidade de detecção será estimada utilizando os métodos de amostragem por distância convencional (CDS) e com multivariáveis (MCDS) (Buckland *et al.*, 2001; Marques & Buckland, 2003). Serão propostos os modelos "half normal" e "hazard rate" sem e com covariáveis para modelar as distâncias perpendiculares. O modelo com maior suporte será selecionado com base no Critério de Informação de Akaike (AIC). A densidade de indivíduos será estimada utilizando o estimador Horvitz-Thompson (Marques & Buckland, 2003).

Para avaliar a distribuição espacial das espécies, deverão ser utilizados os modelos de estimativa superficial da densidade (DSM) (Miller *et al.* 2013). Dados referentes as avistagens, transecções realizadas, informações geofísicas e de sensoriamento remoto serão importados para o programa ESRI ArcMap/ArcGIS® e será produzida uma série de camadas georreferenciadas. Grids serão sobrepostos as camadas georreferenciadas e serão extraídos os valores centrais de cada variável de interesse. A relação entre a densidade de animais (variável resposta) e as variáveis ambientais (variáveis explanatórias) deverá ser investigada através de modelos de habitat espécie-específicos construídos a partir de modelos aditivos generalizados GAMs. GAMs oferecem uma abordagem flexível e robusta para a exploração e caracterização de dados complexos, relações não lineares entre variáveis, e são largamente utilizados na modelagem de habitat de mamíferos e tartarugas marinhas.

A análise de dados será realizada através do uso do programa R utilizando os pacotes "mrds", "dsm", e "mgcv". A produção de mapas de distribuição espacial, assim como de outras figuras georreferenciadas, será feita com o uso do programa ESRI ArcMap/ArcGIS®.

No monitoramento aéreo deverá ser realizada a avaliação dos dados populacionais anteriores das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*) 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.

Metodologia para gravação acústica passiva de cetáceos

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.

O monitoramento acústico passivo (*Passive Acoustic Monitoring* - PAM) vem sendo cada vez mais utilizado pela comunidade científica para o estudo e levantamento de mamíferos marinhos, especialmente cetáceos, alguns dos quais estão mais disponíveis acústica que visualmente. Conduzido isoladamente ou em conjunto com o monitoramento visual (e.g. amostragem por transecções lineares), devido aos avanços recentes no processamento de sinais e na capacidade global de detecção, o método acústico fornece novas ferramentas para levantamento populacional. Portanto, é possível a obtenção de resultados de estimação de abundância confiáveis já que tendem a aumentar a probabilidade de detectar os indivíduos).

No Brasil esse método vem sendo empregado para levantamento de diversas espécies de cetáceos desde 2012 e o conhecimento estabelecido em nosso laboratório sobre acústica de toninha garante que o uso de sistema de monitoramento acústico é adequado à espécie atenderá plenamente os objetivos propostos.

Cruzeiros

Serão realizados uma campanha de campo com duração de 90 dias. O estudo será conduzido 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. Cada etapa será composta por cruzeiros de 5-10 dias de navegação com intervalo para descanso da equipe. Será utilizada uma embarcação de baixo ruído, permitindo a aproximação dos cetáceos com mínimo efeito de alteração comportamental.

Coleta de dados

Para a coleta dos dados acústicos durante os cruzeiros será usada um cabo de 80 metros de

comprimento composto por uma matriz de 3 elementos de hidrofones omnidirecionais distantes dois e um metro entre si e dispostos a um metro a partir da extremidade do cabo (para manter a estabilidade do sistema). Os sinais acústicos são coletados de forma contínua durante o período de amostragem. Os sinais registrados pelos hidrofones (três canais) são transmitidos a uma placa digitalizadora (modelo *Iotech-Personal Daq/3000 Series*) com frequência de amostragem de 400kHz/24 bits e resposta de frequência até 200kHz e posteriormente gravados em um computador portátil e automaticamente salvo como arquivos de segurança em HD externo.

Processamento e análise dos dados acústicos:

Para detecção dos cliques de ecolocalização de cetáceos (ANDRIOLO et al. 2014) serão utilizados três detectores já disponíveis na literatura: (1) Trial 2 (Software PAMGuard); (2) Xbat (YACK et al., 2009); e (3) Triton (os dois últimos através do Software MATLAB). Para cada detecção registrada nos arquivos de som analisados serão determinados o tempo inicial e final e duração das detecções. Amostras de falso-positivo e falso-negativo serão conduzidas para avaliar a ocorrência de possíveis erros associados à detecção. Para isso, um minuto a cada 10 minutos dos arquivos de som analisados serão visualmente inspecionados através de espectrogramas, gerado pelo software Raven Pro 1.5 ou Triton, dependendo da qualidade do gráfico gerado. Os resultados relacionados aos números de detecções, falso-positivos e falso-negativos gerados por detector serão comparados estatisticamente avaliando, assim, qual detector melhor se ajusta ao banco de dados de sinais acústicos de toninha analisado.

Análises específicas

Será considerado um bloco de detecção a ocorrência consecutiva de sinais acústicos específicos da espécie com intervalo menor igual a 5 minutos. A partir de 5 minutos com ausência de sinais será considerado um outro bloco de detecção.

Dados acústicos e comportamentais serão coletados a partir de uma embarcação adequada para a atividade. Serão realizadas gravações sincrônicas de vídeo e áudio e também gravações de áudio independentes. Imagens serão 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.

Serão tomadas todas as providências para que os animais não se sintam demasiadamente perturbados ou encurralados pela proximidade do barco. As gravações serão iniciadas após o desligamento completo do motor da embarcação, caso esta esteja em uso. A distância mínima do grupo para o início dos procedimentos deverá ser de 500m. Juntamente com as gravações de imagem e som serão 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 serão descritos. Categorias comportamentais serão 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 3 unidades que deverá ser rebocado pela embarcação. A distância dos animais e sua angulação em relação ao azimute da embarcação serão 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 serão interrompidas e um novo grupo focal deverá ser eleito. Para tal, as rotas serão aleatórias, até que os animais sejam encontrados.

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

O indivíduo que emitir o sinal vocal terá, 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 ou similar,

o qual fornece o oscilograma e o sonograma e do software Adobe Premier 7 ou similar, 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 habitats e tendências de agregação (Objetivo 2)

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

Para as observações feitas com VANTs ou drones, serão utilizados equipamentos como o Phantom IV - Professional, da fabricante chinesa Dji ou equivalente. O Drone 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.

O Drone pode realizar voos de até 28 minutos com cada carga de bateria. Porém serão adquiridas quatro baterias extras, resultando na possibilidade de sessões ininterruptas de observações. 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 será 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, serão 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 serão 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 será 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 serão realizadas campanhas mensais de dois dias de duração. Observações extras serão 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, serão feitas campanhas de mapeamento e identificação dos micro-habitats com o auxílio de um ROV, Veículo remotamente operado (Smolowitz et al. 2015). O equipamento a ser utilizado poderá ser um micro-rov da marca Video-Ray ou equivalente. 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. São previstas duas campanhas anuais para a realização desse mapeamento e identificação, sendo que as campanhas terão a duração de 10 dias cada.

As informações georeferenciadas das ocorrências de espécies e micro-habitats, direções e velocidade de deslocamento dos organismos detectados serão compiladas em um SIG (Sistema de Informações Geográficas). Essas informações serão 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.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. Behaviour, n.49, p. 227-267. 1974.
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.
- BUCKLAND, S.T.; et al. 2001. Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations. 448 p. ISBN: 9780198509271
- 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.
- DUDZINDKY KM, CLARK CW, WURSIG B. (1995). A mobile video/acoustic system for simultaneous underwater recording of dolphin interactions. *Aquatic Mammals*, 21 (3): 187-193
- 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.
- 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.
- LAILOLO, P. (2010). "The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation," *Biological Conservation* 143, 1635-1645.
- 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.
- RUGH, D.J., BREIWICK, J.M., DAHLHEIM, M.E. AND BOUCHER, G.C. 1993. A comparison of independent, concurrent sighting records from a shore-based count of gray whales. *Wildl. Soc. Bull.* 21(4): 427-37.
- 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.
- 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.
- 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.

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

SUB-PROJETO: AVES

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dr. Leandro Bugoni	Coordenador geral do Sub-projeto Aves	FURG
Dr. Márcio Amorim Efe	Amostragens em abrolhos para coleta de dados de rastreamento e amostras biológicas.	UFAL
Dr. Guilherme Tavares Nunes	Responsável pela administração da equipe, análise de dados genéticos e de ecologia trófica	UFRGS
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas

2. ESCOPO

Monitoramento ambiental dos impactos causados pelo desastre ocorrido em Mariana (MG). O monitoramento em campo será semestral englobando diferentes espécies de aves em Abrolhos, região costeira, marinha, estuário e manguezal na Foz do Rio Doce. Amostras de sangue, penas e alimento das aves serão coletadas para análises de metais e ade isótopos estáveis; espécies selecionadas serão rastreadas com equipamentos e será feita análise genéticas de populações de aves, com ênfase em espécies ameaçadas de extinção. As aves serão amostradas em 5 áreas: estuarina, manguezais, costeira e marinhas (a bordo e em Abrolhos). nas áreas descritas acima após capturas com redes de neblina, puçá e tarrafa, dependendo do local e espécie. Amostragens de potenciais presas serão realizadas a partir de regurgitados espontâneos durante o manuseio. As metodologias para as amostragens e as análises mencionadas acima estão descritas no Anexo 6 do TR 4.

3. OBJETIVO

Monitorar dos parâmetros biológicos e ambientais das aves ou associados a estas, em cumprimento ao Anexo 6 do Termo de Referência nº 04/2016 – Monitoramento de Mamíferos, Tartarugas e Aves Marinhas, bem como Deliberações, Notas Técnicas e Pareceres relacionados. Neste contexto o presente projeto engloba os seguintes objetivos, conforme TR mencionado:

- 1) Avaliar e monitorar, por uns 12 meses a distribuição, abundância e área de vida das aves marinhas em áreas potencialmente impactadas adjacentes à foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas próximas, incluindo unidades de conservação da região.

- 2) Determinar e monitorar por 12 meses, associação das aves com microhabitats 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 12 meses, os encalhes de aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível causa *mortis* e obter amostras biológicas.
- 4) Descrever, 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 espécies de aves marinhas selecionadas, com foco nas que se reproduzem em Abrolhos, ameaçadas de extinção e/ou com forrageamento costeiro.
- 6) Monitorar a evolução das dosagens de metais em tecidos de aves marinhas em encalhes e de aves marinhas vivas na área de estudo.
- 7) Descrever a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis das aves marinhas de espécies-chave.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Determinar as áreas de vida, associações com características ambientais e forrageamento de aves durante o período reprodutivo.

Definição dos modelos de aparelhos para rastreamento e da época de reprodução de cada espécie; Colocação dos rastreadores e obtenção dos dados; Obtenção de dados oceanográficos e fisiográficos em plataformas online e boias; Análise dos dados de rastreamento prévias ao evento; Análise descritiva dos dados de rastreamento. Serão rastreados 20 indivíduos de cada uma das espécies *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus* e *Pterodroma arminjoniana*.

Meta 2- Determinar as áreas de vida, associações com características ambientais e forrageamento de aves durante o período não-reprodutivo

Colocação dos rastreadores nas aves; Recuperação dos rastreadores ou dados; Obtenção de dados oceanográficos e fisiográficos em plataformas online e boias; Análise descritiva dos dados de rastreamento.

Meta 3- Determinar parâmetros reprodutivos e demográficos das aves

Realização de censos de indivíduos ou ninhos nos locais de reprodução. A execução deste acompanhamento é função da necessidade de inferir o momento adequado para a realização do rastreamento ou a remoção de equipamentos colocados previamente nas aves;

Meta 4- Determinar a distribuição e abundância de aves marinhas no mar

Realização de cruzeiros para contagem das aves; Análise dos dados de abundância e distribuição espacial;

Meta 5- Monitorar os encalhes de aves nas praias do litoral do Espírito Santo

Obtenção de dados de encalhes de aves nas praias adjacentes à Foz do Rio Doce fornecidos por Programa de Monitoramento de Praias; Análise da abundância relativa das espécies, sazonalmente, e distribuição espacial.

Meta 6- Determinar os padrões sanitários das aves de Abrolhos, Trindade* e praias adjacentes à Foz do Rio Doce

Coleta de amostras de aves nas colônias; Coleta de amostras de aves capturadas a partir de embarcações; Coleta de amostras de tecidos de aves mortas ou debilitadas nas praias; Análise laboratorial de patógenos das amostras; Análise molecular de amostras de aves prévias ao evento; Análise dos dados.

Meta 7- Determinar os parâmetros genéticos das populações de aves

Coleta de amostras de sangue para análise molecular; Sequenciamento das amostras; Análise dos dados para obtenção de parâmetros genético-populacionais.

Meta 8- Determinar os níveis de contaminação por metais nas aves

Coleta de amostras de penas e sangue de aves nas ilhas*, mar e praia; Análise das amostras prévias ao evento; Análise das amostras coletadas; Análise dos dados.

Meta 9- Determinar a ecologia trófica de aves a partir de isótopos estáveis

Coleta de amostras para análise de isótopos estáveis em tecidos de aves nas ilhas*, mar e praia; Análise das amostras prévias ao evento; Análise das amostras coletadas; Análise dos dados.

**Considerando que Pterodroma aminjorniana, uma das espécies-alvo do Anexo 6, se reproduz no Brasil apenas na Ilha da Trindade, existe a possibilidade de termos que fazer coleta na ilha, uma vez que durante parte do período reprodutivo a espécie ocorre na região entre Trindade e a costa brasileira. Entretanto, existe a necessidade de esclarecimento sobre a coleta de dados sobre esta espécie na referida ilha, porque o TR4 aponta para a atuação das equipes de monitoramento na chamada "Área Ambiental I", que não compreenderia, por todas as áreas de estudo apresentadas nos diferentes anexos, pontos na Ilha da Trindade. Desta maneira, esta questão será discutida na reunião de alinhamento a ser realizado no I Workshop Renova-CTBio-FEST em Agosto de 2018.*

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Lista de modelos de rastreadores e seus respectivos fabricantes, com detalhe acerca dos custos. Matriz com dados de contagens de ninhos de frequência mensal.	Profs. Leandro, Guilherme e Márcio, Bolsista pós-doc
Lista dos indivíduos rastreados com informações sobre conteúdo e localização do ninho. Matrizes de dados espaciais dos indivíduos rastreados.	Profs. Guilherme e Márcio
Matrizes de dados físicos com médias para os últimos 15 anos e dados atuais referentes ao período do rastreamento.	Prof. Guilherme; Doutor (análise de dados espaciais)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de contagens de ninhos com determinação do conteúdo de cada ninho	Profs. Márcio e Guilherme
Matrizes de contagens de ninhos atuais e pretéritas	Profs. Márcio e Guilherme
Matrizes de censos embarcados com localização geográfica das avistagens	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Matrizes de censos embarcados com localização geográfica das avistagens	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Dados de encalhes de aves recebidos de equipes de monitoramento organizados e repassados às instituições	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Lista de números de tombamento das aves em coleções de referência ou bancos de amostras.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro, bolsista responsável pela curadoria
Lista de amostras obtidas em campo para cada espécie	Projeto Albatroz, Profs. Leandro, Márcio, Guilherme

Matriz com patógenos analisados para cada indivíduo amostrados nas colônias, no mar, e na praia.	Projeto Albatroz, Prof. Guilherme
Matriz com sequências moleculares dos microorganismos analisados.	Prof. Guilherme e bolsista geneticista
Matrizes de dados quantitativos e qualitativos dos microorganismos observados	Prof. Projeto Albatroz, Prof. Guilherme
Matrizes de sequências obtidas antes e após o evento.	Prof. Guilherme e bolsista geneticista
Tabela com concentrações dos metais analisados para cada espécie de ave marinha e tecido	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Tabela com razões isotópicas de carbono e nitrogênio para cada indivíduo amostrado	Profs. Leandro e Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise da fenologia reprodutiva das espécies que se reproduzem em Abrolhos.	Profs. Leandro, Guilherme e Márcio
Mapas com distribuição espacial dos indivíduos rastreados. Análise prévia para verificação do sucesso do rastreamento; cortes das viagens de interesse (forrageamento).	Profs. Guilherme e Márcio
Sobreposição dos dados com os trajetos realizados pelas aves marinhas para identificar potenciais influências do ambiente físico sobre a distribuição espacial das aves.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais)
Recorte dos diferentes comportamentos ao longo do trajeto e interpolação dos pontos identificados com comportamento de forrageio. Comparação da localização das áreas de alimentação identificadas antes e depois do evento. Comparação dos parâmetros da viagem entre os dados obtidos antes e depois do evento. Sobreposição das viagens com os dados físicos obtidos.	Prof. Guilherme; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Mapas com distribuição espacial dos ninhos dos indivíduos rastreados.	Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático); Prof. Guilherme
Análise prévia para verificação do sucesso do rastreamento; cortes das viagens de interesse (forrageamento).	Doutor (análise de dados espaciais); Prof. Márcio
Identificação de áreas de invernagem e sobreposição com dados físicos obtidos.	Prof. Leandro; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Estimativa do tamanho populacional.	Profs. Márcio e Guilherme
Comparação com dados de contagem de ninhos pretéritos; análise da fenologia reprodutiva de cada espécie que se reproduz em Abrolhos.	Prof. Márcio e Guilherme
Construção de mapas de distribuição da comunidade de aves marinhas que utiliza a Foz do Rio Doce e adjacências, sobrepostos aos dados físicos obtidos para a região.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Mapas dos locais de ocorrência (e densidade das espécies mais abundantes) ao longo das praias amostradas.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Número total de indivíduos por espécie em cada mês de amostragem	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Porcentagem das populações de aves contempladas pela amostragem.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Quantificação da prevalência de patógenos observados para cada espécie de ave marinha amostrada Em Abrolhos, no mar, ou na praia.	Projeto Albatroz; Prof. Guilherme

Análise da representatividade das populações em relação ao tamanho populacional estimado.	Prof. Guilherme; Mestre (especialista em genética)
Refinamento e alinhamento das sequências	Prof. Guilherme; Mestre (especialista em genética)
Análise de gargalo de garrafa populacional utilizando amostras obtidas antes e depois do evento; cálculo dos índices de variabilidade genética.	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Mapa com distribuição espacial dos pontos de amostragem	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Concentração de Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As nas espécies de aves marinhas que utilizam a área atingida	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Combinação dos resultados de contaminação com as áreas de vida das aves marinhas identificadas por rastreamento remoto	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Análise de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ nas espécies de aves marinhas que utilizam a área atingida	Prof. Leandro; Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)
Análise comparativa das razões isotópicas médias e da amplitude dos nichos isotópicos entre amostras obtidas antes e depois do evento	Profs. Leandro e Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Meta 1- Para a definição das zonas de forrageamento e comportamento de alimentação das aves de Abrolhos (*Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus*) durante o período reprodutivo, serão utilizados equipamentos registradores de posição satelital com frequência de amostragem de 1 posição a cada 10 segundos (modelos igot-U, <<http://www.i-gotu.com/>>) e acelerômetros tri-axiais de aceleração estática e dinâmica com frequência de amostragem de até 100 Hz (Axy-trek <<http://www.technosmart.eu>>). Inicialmente, os ninhos das espécies serão numerados com fitas coloridas como forma de facilitar a localização noturna dos ninhos e organização do desenho amostral. As aves serão capturadas à noite quando estão descansando no ninho, manualmente ou com auxílio de varas equipadas com rede ou laço, dependendo da necessidade de cada caso. Os equipamentos de GPS (após impermeabilizados com tubos termocontráteis) e acelerômetros (os quais já vêm impermeabilizados de fábrica, com resina tipo epóxi) serão acoplados nas quatro penas centrais da cauda dos adultos utilizando fita especial da marca TESA, modelo 4651 (<http://www.tesatape.com.br/>). Os adultos selecionados terão ninhegos de aproximadamente um mês de idade, os quais são caracterizados pela ausência de rêmiges e retrizes e corpo coberto apenas por plumas (Nelson 2005). Os equipamentos (mais fita adesiva e anilha) terão cerca de 25 g, o que corresponde a uma medida abaixo dos 3% da massa corporal média das respectivas espécies, o que é considerado seguro e sem efeitos adversos para aves marinhas. Após o processo de fixação do aparelho, que dura aproximadamente 5 minutos, a ave será solta no ninho onde foi capturada. A recaptura para recuperação dos aparelhos será feita na noite seguinte, através do mesmo procedimento referido acima, quando a ave retornar da viagem de alimentação diurna e estiver novamente descansando no ninho. Os instrumentos colocados nas aves podem ser facilmente recuperados e reutilizados, logo após a transferência dos dados para um computador portátil e recarga da bateria.

Serão coletados dados de rastreamento para cada uma das espécies em duas expedições ao longo de um ano, considerando como satisfatório um mínimo de duas viagens de alimentação para cada indivíduo. A partir das matrizes de dados com posição geográfica obtidas, serão extraídas informações que descrevem cada viagem, como distância máxima percorrida, distância máxima da colônia, duração da viagem, e sinuosidade dos movimentos. Serão utilizados modelos lineares mistos para identificar pontos com comportamento de alimentação no mar, como descrito em Michelot et al. (2016), os quais serão interpolados para identificação de áreas potenciais de alimentação. Dados oceanográficos serão obtidos por imagens de satélite a partir do sistema Aqua MODIS, NASA/GSFC, utilizando o algoritmo Ocean Color Index (OCI), e pelo Programa Nacional de Boias, através da Boia Oceanográfica de Porto Seguro (15.99°S e 37.95°O). Análise

de ondas (wavelet analysis) será utilizada para definir comportamentos das aves marinhas durante viagens de forrageio e calcular orçamentos de tempo e atividade, a partir dos dados de acelerometria.

A equipe coordenada pelo Prof. Dr. Leandro Bugoni possui dados de rastreamento de *Phaethon aethereus* em Abrolhos para os anos de 2011 e 2012, de *Sula leucogaster* em Abrolhos para 2013, e de *Pterodroma arminjoniana* em Trindade para 2014 e 2015, viabilizando comparações de padrões de viagens de alimentação em período reprodutivo antes e depois do desastre ambiental. Diversos equipamentos foram empregados ao longo dos anos e serão utilizados para comparação na presente proposta. Será dada ênfase ao período pré-reprodutivo, quando a espécie desloca-se em direção ao continente, utilizando áreas costeiras sobre a plataforma continental brasileira e Cadeia Vitória-Trindade (Leal et al. 2017).

Meta 2- As aves marinhas serão rastreadas em período não-reprodutivo através de geolocalizadores e PTT's-GPS (do inglês *Platform Transmitter Terminal*). Geolocalizadores são equipamentos de pequeno porte que registram a intensidade de luz em intervalos curtos de tempo (minutos) e possibilitam o cálculo de duas posições diárias (latitude e longitude) aproximadas, por longos períodos. Para determinação das áreas de invernagem de *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus*, e *P. arminjoniana* serão colocados geolocalizadores modelo MK4093 ou equivalentes, com sensores de temperatura e úmido/seco (www.biotrack.co.uk), os quais têm capacidade para registro de dados a cada 5 minutos, durante 2 anos, e possuem massa de 1,5 g, ou seja, abaixo dos 3% da massa corporal das aves, conforme recomendado. As aves serão capturadas no ninho, manualmente, e o equipamento será aderido à anilha colorida com lacre plástico. Após a fixação do aparelho, processo que dura cerca de cinco minutos, a ave será solta onde foi capturada. Quando do retorno das aves no ano seguinte ao de sua marcação, a ave será recapturada no ninho, o equipamento será removido, e os dados descarregados em computador. O equipamento registra ainda imersão na água (sensor úmido/seco), permitindo inferir períodos de voo e de mergulho ou pouso na água, bem como temperatura superficial da água. Estas informações serão um complemento fundamental aos dados oceanográficos e de censos obtidos de aves e cetáceos no âmbito deste projeto. Para determinação das áreas de invernagem de *Thalassarche chlororhynchos* serão utilizados PTT's, 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. Os equipamentos deverão ser de tamanho reduzido, 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. As análises de distribuição no mar e sobreposição com variáveis oceanográficas seguirá a metodologia descrita na Meta 1.

A equipe coordenada pelo Prof. Dr. Leandro Bugoni possui dados de rastreamento em período não-reprodutivo de *Pterodroma arminjoniana* em Trindade para 2014 e 2015 e de *Thalassarche chlororhynchos* na plataforma continental do sul do Brasil em 2015, viabilizando comparações de interação com variáveis oceanográficas em período não-reprodutivo entre antes e depois do desastre ambiental. Devido à ampla área de uso do oceano por esta espécie o rastreamento em áreas relativamente distantes não deverá ser um impeditivo para comparações pré/pós desastre.

Meta 3- Serão realizadas buscas ativas de ninhos e contagens diretas de indivíduos de *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus* em Abrolhos, e *Pterodroma arminjoniana* em Trindade* durante o período reprodutivo, incluindo contagens de aves em voo em áreas de referência para *P. arminjoniana*, conforme protocolo de monitoramento definido pelo PLANACAP. Os ninhos encontrados serão identificados e georeferenciados. A definição do tempo de incubação será obtida através do acompanhamento dos ninhos ao longo de uma temporada reprodutiva, desde a postura até o nascimento dos filhotes. Individualização de adultos e filhotes será feita com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio. Além da individualização das informações sobre cada espécime, o anilhamento permitirá verificar, a partir da captura e recaptura da ave marcada, outras informações como sobrevivência, fidelidade ao ninho e ao parceiro reprodutivo. Além disso, será realizado acompanhamento do período reprodutivo de *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus* em Abrolhos quantificando os ovos postos, ovos eclodidos, filhotes nascidos e filhotes recrutados.

Meta 4- 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 um ano 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 transecções 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 6 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.

Meta 5- A metodologia a ser executada deverá ser o “Itinerário Fixo” (Branco et al. 2010), a ser percorrido por veículo motorizado e estabelecido pelo menos quatro trilhas a serem percorridas na praia, pelo menos uma vez a cada campanha mensal. 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. A metodologia de censo será complementada pelas metodologias internacionalmente aceitas, descritas em Bibby et al. (1997). A metodologia deve incluir também o atendimento aos chamados de encalhes de aves nas praias realizados pela comunidade e/ou pelo Projeto de Monitoramento de Praias. 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, serão analisados. As carcaças recolhidas serão tombadas e depositadas na Coleção de Aves da FURG (CAFURG), após identificação, coleta de dados morfométricos e kit histológico, e preparação de pele por taxidermia.

Meta 6- 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 há a disponibilidade de amostras de sangue armazenadas destes locais (Abrolhos e Trindade), que podem nos trazer um diagnóstico pré-acidente, ressalta-se a iminente necessidade de avaliar aves de interesse como biomonitoras quanto ao incremento da presença de doenças e prevalência de patógenos devido a fatores imunes e de degradação ambiental que afetem a ecologia parasitas-hospedeiros.

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 nas capturas a bordo, em Abrolhos, em Trindade* e no monitoramento de encalhes nas praias. 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, a laboratórios comerciais e/ou parceiros da Rede Albatroz, criada no âmbito do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis – PANACAP, pelo Projeto Albatroz. As amostras de sangue total deverão ser processadas para realização dos parâmetros hematológicos e extração de DNA. Padrões hematológicos serão obtidos pelos profissionais de medicina veterinária em campo ou até 24-48 h após a colheita das amostras. As amostras de DNA extraídas 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 h até processamento no laboratório (cultura e isolamento das bactérias para posterior extração de DNA e sequenciamento genético). Um segundo suabe de cloaca e orofaringe deverá ser processado diretamente para detecção molecular de patógenos, sendo mantido congelado em tubos tipo plásticos, tipo *ependorf*, 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, covariância 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).

Meta 7- As capturas das aves serão realizadas conforme metodologia descrita na Meta 1. 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, serão utilizados kits específicos de extração. Ao final do processo, o DNA deverá ser ressuspenso com a adição de 20 μL de água mili-q e armazenado na geladeira a 4°C . As amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro disponível no Instituto de Ciências Biológicas da FURG.

Para a amplificação por PCR e sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA), cada amostra deverá ser submetida a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com *primers* específicos. Para purificação e sequenciamento dos fragmentos, será utilizada a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos. Para a análise das seqüências mitocondriais as mesmas deverão ser alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) por meio do programa MEGA v.6. Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier e Lischer 2010) deverão ser calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA), baseada no FST com 1000 permutações.

A análise de microssatélites seguirá os *primers* e condições de PCR descritos por Humeau et al. (2011) para *Phaethon aethereus*, por Taylor et al. (2010) para *Sula leucogaster*, e por Brown e Jordan (2009) para *Pterodroma arminjoniana*. Os produtos de PCR serão purificados e genotipados. Uma alternativa para a análise de DNA nuclear é o sequenciamento em massa (metagenômica), o qual utiliza uma porção maior do DNA e produz resultados mais acurados. Embora não indicada no Termo de Referência em questão, o rápido desenvolvimento das técnicas de análise molecular, a redução dos custos e os resultados mais precisos, pode representar inúmeras vantagens sobre a técnica indicada inicialmente e, portanto, deve ser considerada como uma alternativa mais adequada para o monitoramento das populações de aves. Para isso, uma biblioteca genômica é construída utilizando a técnica de ddRADseq (*double digest restriction-site-associated DNA*) (Peterson et al., 2012), que faz uso de duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro e outra de corte frequente, com o objetivo de padronizar e otimizar o tamanho dos fragmentos gerados. São utilizados 4,0 μL de DNA (totalizando 200 ng), que são digeridos com 0,1 μL (1 U) das enzimas de restrição (Thermo Scientific) SdaI (corte frequente) e Csp6I (corte raro), respectivamente. Essas enzimas criam pontas coesivas em ambas as extremidades das moléculas de DNA digerida, que permitem a ligação aos adaptadores. O adaptador P1 (comum a todas as amostras) se liga à ponta gerada pela enzima SdaI e o adaptador AY 2,0 μL (*barcode* único de cada amostra) se liga à ponta gerada pela enzima Csp6I. Estes adaptadores se ligam inicialmente por pontes de hidrogênio à molécula de DNA digerida. A enzima T4 ligase 0,5 μL (5 U), permite a ligação fosfodiéster com o auxílio de 0,5 μL ATP (5 mmol) e 5 μL Tampão Tango 10X. As condições do tempo de digestão serão conforme especificações do fabricante. Na etapa de enriquecimento as condições de PCR

ocorreram em volume final de 25 μL , sendo 12,4 μL de H_2O , 2,0 μL MgCl_2 (25 mM), 2,0 μL de dNTPs (10 mM), 2,5 μL de tampão NH_4SO_4 10X (Fermentas), 2,5 μL de *primer* P1 (2 mM), 2,5 μL de *primer* A-amp (2 mM), 0,1 μL de Taq (0,5 U KlenTaq DNA Polymerase Technology) e 1 μL de DNA digerido. As reações de PCR ocorrem em um ciclo inicial de 68 °C por 1 minuto seguido por 18 ciclos iniciando a 93°C por 10 segundos, 52°C por 35 segundos, 68°C por 1 min e 30 segundos e um ciclo final e único de 68°C por 7 minutos.

Após o término, as amostras serão purificadas em coluna do kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit (Ge Healthcare Life Science, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, todas as amostras contribuirão de forma equimolar para a formação de um pool genômico em um único tubo, as quais serão designadas para corte e seleção dos fragmentos alvos a serem sequenciados. Estes serão definidos por modelos computacionais no programa R, que levam em consideração um genoma completo como referência (aqui, serão utilizadas genomas de *Phaethon aethereus*, *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, ou espécies filogeneticamente próximas), depositadas no GenBank. Esta etapa será realizada no seletor de fragmentos em gel de agarose 2% Pippin Prep (Sage Science), em parceria já estabelecida com o Prof. Dr. Tomas Hrbek, coordenador do Laboratório de Evolução e Genética Animal, da Universidade Federal do Amazonas. Após a construção da biblioteca, serão seguidas as recomendações dos fabricantes para o sequenciamento no sequenciador Ion Torrent (PGM, Life Technologies) com a utilização do kit de sequenciamento 318 Ion PGM chip de 400 pb.

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 e 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, e índices de 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 ($P \leq 0,05$). Estimativas de tamanho efetivo da população serão realizadas no software OneSamp v.2, considerando sistema monogâmico de acasalamento e frequência alélica de 0,02 como ponto de corte. Serão ainda ajustados GLMs bayesianos no programa GESTE, e análise de ordenamento a partir de análises de redundância no programa R (pacote *vegan*), para determinar quais variáveis ambientais influenciam na variabilidade genéticas das populações.

De posse desses dados, será comparada a variabilidade genética entre as amostras obtidas ao longo da execução da presente proposta, e amostras obtidas previamente ao desastre ambiental no Rio Doce pela equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni. Através dessas comparações, será possível avaliar se a descaracterização do ambiente na Foz do Rio Doce está influenciando no potencial evolutivo e na variabilidade genética das aves marinhas selecionadas, ocorrentes na região. A FURG possui a infraestrutura requerida para o imediato início das análises genéticas (freezer, geladeira, estufa, centrífuga, banho-maria, agitador, termociclador, cuba de eletroforese, jogo de pipetas, autoclave), necessitando apenas de complementação de infraestrutura, devido à elevada e repentina demanda das análises propostas.

Meta 8- Serão 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 encontradas mortas durante os monitoramentos de praia, serão realizadas análises de penas e músculo, prioritariamente. Este material deverá ser congelado para posterior análise, ou as carcaças inteiras encaminhadas para necropsia na FURG e preparação das peles e tombamento em coleção científica. 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. Estes últimos grupos da fauna incluem potenciais presas das aves e, ao usar o mesmo procedimento, comparações entre os grupos serão possíveis, para um melhor 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 (HNO_3) 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 à 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 $\mu\text{g/g}$ 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, Brasil), 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, Canadá) 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.

A partir disso, será possível comparar as concentrações de elementos-traço e metais entre as amostras obtidas ao longo da execução da presente proposta, e amostras obtidas previamente ao desastre ambiental no Rio Doce, pela equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni. Através dessas comparações, será possível dimensionar o real impacto do lançamento de rejeitos de minério na área de ocorrência das aves marinhas. A FURG possui a infraestrutura requerida para o imediato início das análises de contaminantes, necessitando apenas de reposição de materiais de consumo e reagentes. As análises dos contaminantes citados serão realizadas em conjunto com o Prof. Dr. Adalberto Bianchini (FURG).

Meta 9- Para a análise dos isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N , serão coletadas amostras de músculo das aves mortas nas praias e sangue e penas das aves vivas, e músculo das potenciais presas das aves marinhas. As amostras de músculo das presas serão lavadas em solução de éter de petróleo no condensador tipo Soxhlet para extração de lipídios, durante 3 sessões de 6 h cada. Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras serão maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 0,9 mg de amostra será pesada e envelopada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos será feita em um espectrômetro de massa de razão isotópica acoplado a um analisador elementar para C e N. As razões isotópicas serão 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 Peedee Belemnite) e ao nitrogênio atmosférico, respectivamente. Deverão ser utilizados 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 e 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 MixSIAR (Stable Isotope Analysis in R) (Stock e Semmens, 2013), no qual os modelos de mistura permitem inferir a composição de dieta a partir de várias fontes potenciais de alimento, o pacote SIBER para estimativa de amplitude do nicho trófico.

É importante destacar que a equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni possui análises de relações tróficas de todas as aves marinhas de Abrolhos e Trindade já realizadas em período prévio ao desastre ambiental ocorrida no Rio Doce. Além disso, a FURG possui a infraestrutura necessária para imediato processamento de amostras (freezer, estufa, liofilizador, condensador Soxhlet, balança de precisão) e espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) em fase final de instalação, possibilitando que todo o processo de preparação e análise de amostras seja feito na FURG. Desse modo, serão necessárias apenas reposição de materiais de consumo e reagentes específicos, considerando alguns equipamentos para reposição e para evitar sobrecarga de trabalho nos aparelhos já existentes.

****Considerando que Pterodroma aminjorniana, uma das espécies-alvo do Anexo 6, reproduz no Brasil apenas na Ilha da Trindade, existe a possibilidade de termos que fazer coleta na ilha, uma vez que durante parte do período reprodutivo a espécie ocorre na região entre Trindade e a costa brasileira. Entretanto, existe a necessidade de esclarecimento sobre a coleta de dados sobre esta espécie na referida ilha, porque o TR4 aponta para a atuação das equipes de monitoramento na chamada "Área Ambiental 1", que não compreenderia, por todas as áreas de estudo apresentadas nos diferentes anexos, pontos na Ilha da Trindade. Desta maneira, esta questão será discutida na reunião de alinhamento a ser realizado no I Workshop Renova-CTBio-FEST em Agosto de 2018.***

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bibby C.J., Burgess N.D., Hill D.A. 1997. Bird census techniques. Academic Press, London.
- Branco J.O., Barbieri E., Fracasso H.A.A. 2010. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. Pp. 219-235, In: Ornitologia e Conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. von Matter S., Straube F.C., Cândido-Jr J.F., Piacentini V., Accordi I. (eds.). Technical Books Editora, Rio de Janeiro.
- Brown R.M., Jordan W.C. 2009. Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology* 150:925-929.
- Cornuet J.M., Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Ellison A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7:509-520.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Gennari S.M., Soares H.S., Niemeyer C., Catão-Dias J.L., Musso C.M., Siqueira G.C.C., Dubey J.P. 2013. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves marinhas do arquipélago de Abrolhos-Bahia, Brasil. In: *Wildlife Disease Association Latin America*. I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.
- Goudet J. 2001. FSTAT, version 2.9.3: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne.
- Gould P.J., 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.
- Heinemann D. 1981. A range finder for pelagic bird censusing. *Journal of Wildlife Management* 45:489-493.
- Humeau L., Silva D., Jaquemet S., Requier J.-B., Le Corre M. 2011. Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed Tropicbird (*Phaethon lepturus*) (Phaethontidae). In *Permanent Genetic Resources Note* (Agostini et al.), *Molecular Ecology Resources* 11:418-421.
- Leal, G.R., Furness, R.W., McGill, R.A.R., Santos, R.A., Bugoni, L. 2017. Feeding and foraging ecology of Trindade petrels *Pterodroma arminjoniana* during the breeding period in the South Atlantic Ocean. *Marine Biology* 164:211.
- Michelot, T., Langrock, R., Patterson T.A. 2016. moveHMM: an R package for the statistical modelling of animal movement data using hidden Markov models. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1308-1315.
- Nelson, J.B. 2005. Pelicans, cormorants, and their relatives: The Pelecaniformes. Oxford University Press, New York.
- Niemeyer C., Musso C.M., Siqueira G.C.C., Catão-Dias J.L. 2013. Weights, hematology and plasmatic chemistry of 33 free-ranging *Phaethon* tropical pelagic seabirds. In: *Wildlife Disease Association Latin America*. I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.
- Onley D., Scofield P. 2007. Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters of the world. Christopher Helm Publishers Ltd, London.
- Peterson B.J., Fry B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review on Ecology and Systematics* 18:293-320.

- Post D.M., Layman C.A., Arrington D.A., Takimoto G., Quattrochi J., Montaña C.G. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152:179-189.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Spear L.B., Ainley D.G., Hardesty B.D., Howell S.N.G., Webb S.W. 2004. Reducing biases affecting at-sea surveys of seabirds: use of multiple observer teams. *Marine Ornithology* 32:147–157.
- Stock B.C., Semmens B.X. 2013. MixSIAR GUI user manual, version 1.0. Disponível em: <http://conserver.iugo-cafe.org/user/brice.semmens/MixSIAR>.
- Tasker M.L., Jones P.H., Dixon T., 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.
- Taylor S.A., Morris-Pocock J.A., Sun Z., Friesen V.L. 2010. Isolation and characterization of ten microsatellite loci in blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151:525-528.

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

**SUB-PROJETO: “Cetáceos: Genética, Saúde, Dieta, Reprodução,
Uso do habitat e Interação com a pesca”**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Ana Paula Cazerta Farro	Coordenadora parte do Anexo 6	CEUNES/UFES
Leonardo Serafim	Monitoramento das histopatologias e análises bacteriológicas em cetáceos	UENF
José Lailson Brito Jr.	Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos	UERJ
Tatiana Lemos Bisi	Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis	UERJ
Alexandre Azevedo	Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade	UERJ
Profissional Sênior	Pesquisador	UENF
Profissional Mestre II	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UENF
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UERJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	CEUNES-UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES-UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	CEUNES-UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UENF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UERJ

2. ESCOPO

Os grandes vertebrados marinhos como mamíferos, tartarugas e aves têm sido reconhecidos como bons organismos bioindicadores das condições e dos impactos no meio ambiente. Por serem animais frequentemente no topo da cadeia alimentar, representam bem diversos contaminantes do ecossistema, os quais bioacumulam ou biomagnificam ao longo da cadeia trófica. Adicionalmente, são animais de fácil visualização e identificação, além de possuírem grande mobilidade, servindo assim como amostradores de áreas maiores do ambiente, além de responderem rapidamente a impactos através da mudança de comportamento ou de áreas utilizadas para alimentação e reprodução.

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 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.

Os vertebrados marinhos podem ainda ser utilizados como amostradores do ambiente, sendo 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, 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).

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 às 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, no litoral brasileiro a toninha e boto-cinza 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.

3. OBJETIVOS

- 1) Monitorar os encalhes de cetáceos nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível causa *mortis*.
- 2) Avaliar e monitorar o uso de mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas adjacentes a foz do Rio Doce (comportamento e uso do habitat), a partir de monitoramento embarcado e por ponto fixo.
- 3) Monitorar a diversidade genética de cetáceos do litoral do ES.
- 4) Avaliar a prevalência de patógenos em cetáceos da área de estudo, para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.
- 5) Monitorar a evolução das dosagens de contaminantes e histopatologias em tecidos de cetáceos em encalhes na área de estudo.
- 6) Descrever a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis de *S. guianensis* e *P. blainvillei*.

- 7) Estimar a idade dos cetáceos, de sua primeira maturação e analisar a taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias;
- 8) Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 – Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

Atendimento aos chamados de encalhes de cetáceos nas praias realizados pela comunidade e / ou pelo Projeto de Monitoramento de Praias (PMP);

Meta 2 - Monitoramento do uso de cetáceos em áreas adjacentes e foz do Rio Doce

Monitoramento da foz do Rio Doce e áreas adjacentes ou de interesse a partir de pontos fixos e embarques;

Meta 3 - Diversidade genética de cetáceos

Monitoramento da diversidade genética de cetáceos (que tiverem número amostral suficiente), a partir de marcadores moleculares tradicionais.

Meta 4 - Monitoramento das histopatologias e análises bacteriológicas em cetáceos

Monitorar a variação nas prevalências de patógenos e histopatologias associados a área de encalhe mais próximas à foz do Rio Doce ao longo do período de monitoramento e em relação à distância da foz.

Meta 5 - Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis

Descrever a ecologia trófica através de isótopos estáveis.

Meta 6 - Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

Determinação de taxas de contaminantes nos tecidos de animais encontrados mortos ou de animais vivos biopsados;

Meta 7 - Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade

Estimar a idade do indivíduo, idade da maturação, estágio reprodutivo e taxa de fecundidade dos animais mortos encontrados.

Meta 8 – Interação dos pequenos cetáceos com a pesca

Obter respostas sobre o tipo de pesca desenvolvido na região, aparato utilizado, captura acidental, frequência, espécie afetada, etc.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Número de visitas as praias. Número de cetáceos atendidos (até 50), com localidade, data, biometria dos animais. Número de necrópsias realizadas. Número de cetáceos removidos (até 50) e destinação. Tipos de tecidos coletados e para que tipo de análise. Laudo com possível causa mortis dos cetáceos necropsiados (até 50).	Instituto ORCA (sul do Rio Doce) e Instituto Baleia Jubarte (norte do Rio Doce)
Localização dos pontos fixos. Tempo de observação em cada ponto; espécies observadas; número e composição de grupos; comportamento realizado.	Ana Paula Cazerta Farro
Localização do percurso realizado no monitoramento embarcado e pontos onde foram realizadas as visualizações dos cetáceos. Pontos de avistagens; tempo de observação em cada ponto de avistagem; espécies observadas; local onde foi observado; número e composição de grupos; comportamento realizado.	Ana Paula Cazerta Farro
Número de tecidos (amostras) que tiveram o DNA extraído e qual a	Ana Paula Cazerta Farro

concentração quantificada para cada amostra; número de amostras amplificadas com sucesso para cada marcador testado; tamanho do fragmento amplificado e após edição. Índices de diversidade genética para cada marcador. Índice de estruturação genética, quando for possível, pois dependerá do número amostral de cada espécie. <i>Com a continuidade do projeto essa análise se torna mais completa.</i>	
Lista com patógenos encontrados em tecidos de até 50 cetáceos, alterações osteológicas e/ou indícios de afecções que podem estar afetando a saúde de cada indivíduo.	Leonardo Serafim
Relação Carbono:Nitrogênio para cada amostra de até 50 cetáceos; Espécies componentes da dieta de até 50 cetáceos.	Tatiana Lemos Bisi
Taxas de micropoluentes, elementos traços, compostos organoclorados e organocromados, e HPAs encontradas nos tecidos de até 50 cetáceos.	José Lailson Brito Jr.
Número de cassetes e lâminas preparadas; idade dos indivíduos, peso das gônadas, caracterização dos ovários.	Alexandre Azevedo
Pontos de desembarque visitados. Número de entrevistas e saídas com pescadores; Faixa etária, principal atividade, tipo de embarcação, etc, dos entrevistados; Principais dados coletados nas entrevistas a respeito da interação pescaXcetáceos; Dados de vestígios de aparatos encontrados em cetáceos mortos.	Instituto Baleia Jubarte

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Avaliação de quais as espécies que mais encalharam, estado de desenvolvimento do animal (filhote, jovem ou adulto), qual a localidade que deteve o maior número de ocorrências e qual o provável motivo para a maioria das mortes.	Instituto ORCA e Instituto Baleia Jubarte
Identificação dos locais onde estão ocorrendo cetáceos; caracterização dos grupos e comportamento observados.	Ana Paula Cazerta Farro
Identificação dos locais onde estão ocorrendo cetáceos; caracterização dos grupos e comportamento observados.	Ana Paula Cazerta Farro
Avaliação se a diversidade genética dos cetáceos da região é baixa, pois desta forma, o efeito sobre ela pode ser considerado mais grave. <i>*Com a continuidade será possível verificar se essa diversidade está diminuindo e se existe mais de uma população na região, o que poderia afetar de forma diferente cada uma delas.</i>	Ana Paula Cazerta Farro
Identificação da principal causa mortis dos animais e detecção de patógenos responsáveis pela saúde de cada indivíduo. Verificação de espécie mais afetada, sexo ou estado de desenvolvimento. Discussão sobre quais fatores poderiam estar favorecendo a prevalência de cada patógeno.	Leonardo Serafim
Descrição da ecologia trófica para cada espécie de cetáceo encontrado.	Tatiana Lemos Bisi
Deteção e Identificação de contaminantes que podem afetar a saúde de cada indivíduo. Verificação de espécie mais afetada, sexo ou estado de desenvolvimento. Discussão sobre quais fatores poderiam estar aumentando cada taxa.	José Lailson de Brito Jr.
Determinação da idade, estágio reprodutivo e taxa de fecundidade de até 50 cetáceos encontrados mortos.	Alexandre Azevedo
Avaliação de como é a interação das atividades pesqueiras e os cetáceos na região e se essa foi modificada com a chegada da lama.	Instituto Baleia Jubarte

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

Após o recebimento de informação sobre encalhe de algum cetáceo ou tartaruga marinha nas praias do litoral norte capixaba, prontamente serão 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.

O monitoramento das praias é atualmente realizado no Espírito Santo por uma empresa contratada (CTA), mas que já apresenta parcerias 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.

Quando a equipe de resgate vai até o local, ela avalia a situação. Em se tratando de animal vivo, o médico veterinário realiza os primeiros-socorros e procura orientar o procedimento de devolução do animal para o mar. No caso de se tratar de um animal morto de até 3 metros de comprimento, a carcaça é colocada no carro de resgate e removida para a base de Caravelas (IBJ) ou Guarapari (ORCA). Caso o animal tenha mais de 3 metros, o exame da carcaça e a coleta de material são realizados no local do encalhe.

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

Todos os animais recebem um número de registro. Este mesmo número é utilizado para identificar as amostras biológicas coletadas.

Conforme o estado da carcaça, são coletados dados biométricos e realiza-se a necrópsia, a fim de se estabelecer a causa mortis. Durante as necrópsias, registraram-se os dados biológicos dos exemplares. São levantados dados referentes à classificação taxonômica, comprimento total, peso, medidas alométricas, sexo, estágio de maturação, estado da carcaça e marcas de interação com artefatos de pesca. A carcaça é fotografada, posteriormente descarnada e os ossos coletados e acondicionados para maceração. Amostras de tecidos para análise de DNA também foram coletadas.

Todos os dados coletados são registrados em fichas padronizadas, armazenados em um banco de dados e interpretados. O material osteológico coletado é examinado buscando-se evidências de alterações patológicas. A limpeza do material osteológico é realizada através da técnica de maceração, para posterior tombamento nos acervos do IBJ e do ORCA.

Um fator limitante nesse procedimento é o avançado estado de decomposição no qual muitos animais chegam às 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 são 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.

Monitoramento do uso de cetáceos em áreas adjacentes e foz do Rio Doce

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

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

Quando forem avistados indivíduos serão registrados: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localização exata (GPS), e outras informações que sejam julgadas pertinentes. Estes dados serão inseridos em uma planilha pré-formulada.

Serão 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 o período serão realizadas observações naturalísticas dos comportamentos utilizando o método de amostragem "Ad Libitum" (Lehner, 1996). Para as observações serão 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, 1996).

Os dados serão agrupados em uma tabela no Excel e para os pontos de coleta serão 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 serão avaliadas para as diferentes áreas.

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

Diversidade genética de cetáceos

Serão utilizadas amostras de músculo ou pele dos cetáceos encontrados encalhados nas praias do Espírito Santo. Outras espécies poderão ser incluídas nas análises dependendo do número de amostras encalhadas no período de estudo.

Os tecidos para as análises genéticas serão armazenados em microtubos e conservados em álcool 70%. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES (São Mateus), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

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

Amplificação por PCR e sequenciamento: Cada amostra será submetida à PCR (Polymerase Chain Reaction) e reações de sequenciamento e genotipagem para avaliação de marcadores mitocondriais e nucleares (microssatélites).

Purificação e sequenciamento: Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos. Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados.

Análise das sequências mitocondriais: As sequências serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013).

Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão 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 serão construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999). Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) e os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microssatélites a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

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

Para as análises intrapopulacionais serão 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) será realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional será 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, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também serão 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 serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Sexagem molecular de cetáceos: 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 serão 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 será usado o gene

CHD (Fridolfsson e Ellegren, 1999). As reações de PCR serão 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 será aplicado 0,06 μ M. O volume final será de 25 μ L. A amplificação será 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 serão separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética será realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas será realizada com o auxílio de luz UV e estas serão fotografadas.

Análise histopatológica e microbiológica

Após a eutanásia, será realizada necropsia dos cetáceos para colheita de material e avaliação histopatológica no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Durante a necropsia os órgãos serão avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies. Fragmentos de tecidos com até 1 cm de espessura serão colhidos e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%, excetuando-se o coração, que será colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Todo o material será fixado por um período mínimo de 48 horas. Após a fixação dos corações, estes, serão pesados em balança digital de precisão. A seguir todas as amostras serão clivadas em fragmentos menores de até 2-3 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica®1 TP1020), onde serão desidratadas em cinco banhos seqüenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em seqüência o material será incluído no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos serão resfriados e cortados em seções de 5 μ m de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica®1 RM2145). Os cortes serão colocados em banheira histológica, de onde serão coletados por lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica. Ainda, outras histotécnicas especiais poderão ser empregadas, para posterior observação pela microscopia óptica e análise de imagens com auxílio de um programa de morfometria digital (Software Image J, versão 1.33).

As fotomicrografias obtidas serão documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Nikon®² Coolpix 995, adaptada em microscópio óptico.

Para a microbiologia, no laboratório, as amostras serão semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Posteriormente, as amostras serão incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Após esse processo, será feita a identificação microbiana, com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os micro-organismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas para posterior confecção dos laudos.

Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

Após recolhidas as amostras de tecidos, o material de cetáceos e quelônios será enviado para o Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ, onde serão realizadas as análises de contaminantes.

Determinação e análise de micropoluentes - Mercúrio Total: 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, serão atacadas a frio com 1mL de H₂O₂. Após essa etapa será 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 serão resfriados por quinze minutos, sendo adicionado 10mL de KMnO₄ (5%). As amostras retornarão ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e serão resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte o extrato será reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH₃) 12%. O extrato final será avolumado com água Milli-Q até 14mL. As leituras serão 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 será

feita por meio de materiais certificados DOLT-2 (fígado de Dogfish) e DORM-3 (músculo de Dogfish) do National Research Council do Canadá. Todas as amostras serão analisadas em duplicata e serão usados brancos analíticos em todas as baterias.

A determinação das concentrações de elementos-traço (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, As) será 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 ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) será utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta será 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 será 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 serão realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60mL e balões volumétricos de 125 mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Serão adicionados às amostras os padrões internos PCB 103 e PCB 198. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação com a adição de H_2SO_4 (Santos-Neto et al., 2014). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os pesticidas e as bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) Agilent 7890. O hidrogênio será utilizado como gás de arraste e o nitrogênio como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade será 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 serão 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 será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Serão adicionados às amostras os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação. O método utilizado para purificação de amostras será o descrito e validado por Covaci et al. (2002) e Voorspoels et al. (2003). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os PBDEs e MeO-PBDEs serão 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). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadropólo e interface serão ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será 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 será 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 será 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 serão pesadas e extraídas em Soxhlet com metanol, seguidas pela reação de saponificação através da adição de hidróxido de potássio. Posteriormente será conduzida uma extração líquido-líquido com hexano, onde a amostra será transferida para um funil de separação, onde será 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 será então reduzido a cerca de 1 mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos serão purificados através do clean up, realizado em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap será adicionado o padrão interno, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs será realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometro 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 Analytik 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, materiais 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.

Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis

Essas análises serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ (quelônios e mamíferos).

Para a análise dos isótopos estáveis ^{13}C e ^{15}N , serão retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Das aves serão 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 serão congeladas e enviadas para a UERJ para análise. Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras serão maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 1,5 mg de amostra será pesada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos será 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: $\delta X = [(Ramostra/Rpadrão) - 1] \times 1000$, 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 Peedee Belemnite) e ao nitrogênio atmosférico, respectivamente. Serão usados materiais certificados de referência em todas as análises. Devido à 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), será 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, será 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.

Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade

A determinação de idade e análises reprodutivas serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

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, terão sua idade estimada a partir das GLGs do cemento; cada GLG corresponde a um ano de vida das toninhas. A determinação da idade será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por PINEDO & HOHN (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo serão colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, serão 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 serão colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados serão colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lamínula e selados com Entellan. As leituras serão realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas serão coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, serão fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Um fragmento da região central do testículo contendo 1 cm³ será emblocado em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos serão seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções serão coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras serão realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade será 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 serão avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al. 1985). Os ovários serão inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, serão 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 será baseada em Perrin & Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans serão consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteo ou albicans em um ovário serão consideradas maduras.

Interação dos pequenos cetáceos com a pesca

Serão realizadas entrevistas, saídas com pescadores e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

Serão 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 serão 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 serão 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. Nesta etapa quando autorizado, serão 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 serão 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 serão agrupados, de acordo com as respostas obtidas, evidenciando as convergências de informações sobre os diversos temas abordados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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.

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.

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.

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

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 acidental 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.; 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.

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.

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

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

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.

LEHNER, P. N. Handbook of ethological methods. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 672 p.

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.

MANN, J. 2000. Unraveling the dynamics of social life, p. 45-64. In: J. MANN; R.C. CONNOR; P.L. TYACK & H. WHITEHEAD (Eds). *Cetacean society – field studies of*

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.

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

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.

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

RICHARD, KR.; MCCARREY, SW.; WRIGHT, JM.; DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Canadian Journal of Zoology*, v. 72, p. 873-877, 1994.

ROBERT, CE. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources*, v. 32(5), p. 1792-1797, 2004.

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.

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

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

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

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

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

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

**SUB-PROJETO: DIVERSIDADE GENÉTICA E SAÚDE DAS TARTARUGAS
MARINHAS**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Sarah Maria Vargas	Doutor II - Coordenação Temática Tartarugas marinhas	UFES
Profissional Mestre - Juliana Justino	Bióloga, Mestre - Coordenação análises laboratoriais	UFES
Pós doutor	Pesquisador	UFES
Iniciação científica	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

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.

Este plano de trabalho refere-se ao monitoramento da diversidade genética, estrutura populacional, história demográfica, da saúde e estudo ecotoxicológico de tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo (Foz do Rio Doce, em Linhares, ES, impactadas pelos rejeitos de mineração provenientes do rompimento da barragem de Fundão em Mariana, MG)

O monitoramento permitirá avaliar os níveis de diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das espécies *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* na fase adulta reprodutiva (fêmeas), na foz do Rio Doce. Os indivíduos encontrados durante o período do estudo serão 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). Animais encontrados mortos e encalhados e indivíduos da espécie *Chelonia mydas* na fase juvenil também serão analisados. O monitoramento também avaliará o impacto da presença de rejeitos de mineração e contaminantes arrastados pelo seu fluxo sobre a saúde de *C. mydas* (na fase juvenil), *C. caretta* (nas fases adulta reprodutiva, ovos e filhotes neonatos) e *D. coriacea* (nas fases de ovos e filhotes neonatos) e na eficiência reprodutiva de *C. caretta* e *D. coriacea* na foz do Rio Doce.

Neste contexto o subprojeto de tartarugas marinhas inclui parte dos objetivos 5 e 11 do Anexo 6, TR4, com as seguintes atividades:

3. OBJETIVOS

Monitorar e comparar com dados anteriores, a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo. Avaliar o efeito da presença de contaminantes sobre a saúde das tartarugas marinhas e sua eficiência reprodutiva.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Avaliação da diversidade genética das tartarugas marinhas

Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo.

Meta 2- Avaliação da saúde de tartarugas marinhas

Avaliar a presença de contaminantes 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 e se há transmissão vertical de contaminantes (da fêmea para ovos e filhotes) em *C. caretta* e observar

Purificação e sequenciamento: Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos.

Análises de bioinformática e estatísticas:

As sequências da região controle do DNA mitocondrial serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) por meio do programa MEGA v.6.

Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão 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 serão construídas com cálculos de Median Joining no programa Network.

Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados serão 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 será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também serão testados quanto à presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos stutter utilizando-se o programa Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al. 2004), com correção de Bonferroni.

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001) e Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010).

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

Para determinar provável estrutura populacional será 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, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.5. Também serão 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 serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Meta 2 - Avaliação da saúde de tartarugas marinhas

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras

O monitoramento de tartarugas-marinhas em reprodução será realizado na Foz do Rio Doce durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. Área controle será a Praia do Forte (Ba). A temporada reprodutiva se estende de setembro a abril, porém as campanhas de coleta de sangue das fêmeas serão feitas de outubro a dezembro de 2018. As coletas de sangue e ovos serão realizadas à noite durante a temporada reprodutiva em dias alternados. A coleta de ovos e filhotes natimortos será feita diariamente, pela manhã de novembro a janeiro.

As praias serão monitoradas das 20 às 4h em busca de fêmeas em desova.

A captura das *Caretta caretta* será manualmente após a postura. Após capturados, todos os animais serão devidamente contidos por meio da contenção física para tomada de dados biométricos e coleta de material biológico necessário para o desenvolvimento do trabalho.

Após serem capturados, serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também será obtida massa com dinamômetro analógico com capacidade de 200 Kg com escala mínima de 0,2 Kg para.

Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Os ovos serão coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, totalizando 60, e até 45 ovos de *D. coriacea*) sem contato com o solo, que serão armazenados congelados a -80°C em sacolas

plásticas. O ninho será georreferenciado e monitorado para que filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) sejam coletados após a eclosão, armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C (SAKAI et al., 1995; ROE et al., 2011). O monitoramento dos ninhos e coleta de filhotes natimortos será realizado em conjunto com a equipe do Projeto TAMAR que também obterá os dados de eclodibilidade.

Serão coletadas amostras de sangue de 60 *Caretta caretta* ao longo da temporada reprodutiva em Linhares e na Praia do Forte. Não serão coletadas amostras sanguíneas de *D. coriacea* devido à dificuldade de obtenção e o estresse excessivo dos animais. As amostras sanguíneas serão centrifugadas para obtenção de plasma e soro, que serão congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 40 x 1,2 mm e seringas descartáveis, obtendo-se um volume de 10 mL, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, será realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina sódica e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo.

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*.

Quadro 1: Número e tipo de amostras que serão coletadas na Foz do Rio Doce e nas áreas controle.

Amostra	Número de amostras	Total de amostras na temporada
Plasma (C. caretta)	120 fêmeas	120 amostras
Plasma (C. mydas)	60 juvenis	60 amostras
Ovo (C. caretta)	180 (3 por ninho)	60 pools
Ovo (D. coriacea)	45 (3 por ninho)	15 pools
Natimorto (C. caretta)	180 (3 por ninho)	60 pools
Natimorto (D. coriacea)	45 (3 por ninho)	15 pools
Total		360

Serão realizadas 4 campanhas de captura de *Chelonia mydas juvenis* na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 4 campanhas no Recife de Coroa Vermelha - Ba (Quadro 1). Por ano serão capturados 45 indivíduos em cada área de alimentação, portanto serão 90 amostras de plasma.

A captura de *Chelonia mydas juvenis* será por busca ativa ou com uso de rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento (SANTOS, 2005). A rede será lançada a partir de um barco motorizado e fixada ao fundo com âncora a uma distância de 30 a 200 metros da praia. Após armada, a rede será monitorada continuamente para evitar lesões nos animais que forem capturados. O tempo de esforço será de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

Após serem capturadas, serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também será obtida a massa de juvenis de *C. mydas* com uso de dinamômetro digital com capacidade para 50Kg com escala mínima de 0,1g.

Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

É importante salientar que as análises genéticas e de saúde precisam dos dados de captura e, portanto, o monitoramento referente às tartarugas será feito em parceria com a Fundação Pro-Tamar, mas não haverá sobreposição nas coletas, uma vez que estas atividades já são realizadas por meio de contrato com a Fundação Pró-Tamar.

Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 25 x 0,7 mm em juvenis e seringas descartáveis, obtendo-se um volume entre 3 e 30 mL de acordo com o tamanho dos animais, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, será realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina sódica e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo.

Métodos de determinação e análise dos parâmetros de interesse para o monitoramento

Hemograma

Os hemogramas serão realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) será realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm em centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos será realizada em câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) será feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 µl de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias será realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (THRALL et al., 2004).

A contagem diferencial dos leucócitos será feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Serão contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

Análises bioquímicas

Será analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fosforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises serão realizadas no sistema automatizado Beckman Coulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

Análises de contaminantes orgânicos e elementos traço

A extração dos contaminantes orgânicos do plasma será feita por um protocolo líquido-líquido por centrifugação usando ciclohexano grau HPLC como solvente e cis heptacloropóxido a 1 ppm como padrão interno. O sobrenadante é filtrado a 0,2 µm e evaporado em corrente de nitrogênio e resuspendido a 0,4 ml em ciclohexano (CAMACHO et al., 2013a).

A separação cromatográfica a gás será feita acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo ou equivalente disponível na RRDM, segundo Camacho et al. (2012). O limite de detecção será de 0,01 ng/mL definido como três vezes a média do sinal de fundo.

Serão analisados os seguintes contaminantes:

- a) 18 pesticidas organoclorados (OCPs): metoxiclor; quatro isômeros de hexaclorociclohexano (α -, β -, γ -, e δ - HCH); p,p'-dicloro-difenil-tricloroetano (p,p'-DDT) e metabólitos (p,p'-DDE, e p,p'-DDD); hexaclorobenzeno (HCB); aldrin; dieldrin; endrin; clordane (cis- e trans-isômeros); mirex; endosulfan (α -e β -isômeros) e endosulfan-sulfato;
- b) 18 congêneros de bifenis policlorados (PCB): 6 marcadores (M-PCB = PCBs #52, 101, 118, 138, 153 e 180) e 12 dioxin-like PCBs (DL-PCB=PCBs #77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189), numerados de acordo com a IUPAC;
- c) 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos prioritários para a US-EPA: naftaleno; acenaftileno; acenafteno; fluoreno; antraceno; fenantreno; fluoranteno; pireno; benzo[a]antraceno; criseno;

benzo[b]fluoranteno; benzo[k]fluoranteno; benzo[a]pireno; indeno[1,2,3,-cd] pireno; dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno.

A dosagem de elementos traço será realizada por Espectrometria de Emissão com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP/EOS ou equivalente disponível na RRDM após digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente (CAMACHO et al., 2013c).

Avaliação do Sucesso Reprodutivo

Para avaliar a relação entre os contaminantes e o sucesso reprodutivo será necessário aguardar a emergência dos filhotes (aproximadamente 60 dias). O sucesso reprodutivo é medido pela taxa de sucesso de eclosão e emergência. Após este período os ninhos serão abertos e contabilizados o número de ovos não eclodidos, cascas, filhotes natimortos e filhotes retidos. Ninhos com maior quantidade proporcional de cascas e filhotes viáveis apresentarão maior sucesso reprodutivo dado em percentual de nascidos. Também será calculado o percentual de natimortos e ovos inviáveis. Esses dados deverão ser obtidos junto ao Projeto TAMAR/ICMBio.

Análises estatísticas

Os valores bioquímicos e de contaminantes serão analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilks. Grupos de dados com distribuição normal serão comparados (por exemplo local, temporada reprodutiva) por ANOVA (soma dos quadrados tipo IV) com teste de Games-Howell *post-hoc*, ou por ANOVA não paramétrica com teste de Mann-Whitney *post-hoc* se não forem normais. Correlações de Spearman serão utilizadas para verificar se há correlação entre parâmetros bioquímicos e as concentrações de contaminantes. Os níveis de contaminantes serão comparados entre tartarugas na primeira desova e as posteriores por anova de medidas repetidas. A avaliação do sucesso de eclosão com os contaminantes nos ovos, filhotes e tartarugas será avaliada por modelo linear generalizado. Todas as análises estatísticas serão feitas com significância de $<0,05$ usando o pacote IBM SPSS 17.0.

Apresentação dos resultados

Os resultados serão apresentados em 1 relatório final ao término do programa ou de acordo com as regras da RRDM.

Os resultados dos analitos serão expressos em tabelas de estatística descritiva apresentando média e desvio padrão de dados com distribuição normal e mediana e erro padrão da média para dados com distribuição assimétrica. Também serão expressos os valores máximo e mínimo.

Serão utilizados gráficos de box-plot apresentando percentis 2,5 e 97,5, média, outliers e extremos para representação dos valores obtidos.

Correlações de Spearman serão representados por gráficos de correlação apresentando a equação da reta e valor de r^2 obtidos.

Análises estatísticas comparativas serão apresentadas com valores do teste estatístico utilizado e o valor de p para um intervalo de confiança de 95%.

7. REFERÊNCIAS

CAMACHO, M.; BOADA, L. D.; ORÓS, J.; CALABUIG, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 9, p. 1974–80, set. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748504>. Acesso em: 10 jul. 2014.

CAMACHO, M.; LUZARDO, O. P.; BOADA, L. D.; LÓPEZ JURADO, L. F.; MEDINA, M.; ZUMBADO, M.; ORÓS, J. Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles. **The Science of the total environment**, v. 458–460, p. 283–9, 1 ago. 2013a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665416>. Acesso em: 10 jun. 2014.

CAMACHO, M.; ORÓS, J.; BOADA, L. D.; ZACCARONI, A.; SILVI, M.; FORMIGARO, C.; LÓPEZ, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Potential adverse effects of inorganic pollutants on clinical parameters of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Results from a nesting colony from Cape Verde, West Africa. **Marine Environmental Research**, v. 92, p. 15–22, 1 dez. 2013b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665416>. Acesso em: 10 jun. 2014.

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.

- EDGAR R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32:1792–1797.
- 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.
- 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.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, and T. C. MARSHALL, 2007 Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Mol. Ecol.** 16: 1099–1106.
- PARK, S. D. E. 2001. MSTools: Microsatellite toolkit for MS Excel. Trinity College, Dublin. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>
- REIS EC, SOARES LS, VARGAS SM, SANTOS FR, YOUNG RJ, BJORN DAL 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.
- ROE, J. H.; SILL, N. S.; COLUMBIA, M. R.; PALADINO, F. V. Trace Metals in Eggs and Hatchlings of Pacific Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) Nesting at Playa Grande, Costa Rica. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 10, n. 1, p. 3–9, 2011.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELL Y, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, n. 155, p. 945-959, 2000.
- SAKAI, H.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, H.; TATSUKAWA, R. Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 347–353, maio 1995. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0025326X9400185C>.
- SANTOS, M. R. de D. **Parâmetros bioquímicos, hematócrito e condição corporal no monitoramento da saúde de tartarugas marinhas Chelonia mydas (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens no Espírito Santo, Brasil.** 2005. Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.
- SANTOS, M. R. de D.; FERREIRA, L. S.; BAPTISTOTTE, C.; GROSSMAN, A.; BELLINI, C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas Chelonia mydas (Linnaeus , 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha , Pernambuco , Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal science**, v. 46, n. 6, p. 491–499, 2009.
- SANTOS, M. R. de D.; SILVA MARTINS, A.; BAPTISTOTTE, C.; WORK, T. M. Health condition of juvenile Chelonia mydas related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 115, n. 3, p. 193–201, 20 ago. 2015. Disponível em: <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v115/n3/p193-201/>.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
- SHAMBLIN, BM, AB BOLTEN, FA ABREU-GROBOIS, KA BJORN DAL, 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.
- 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.
- 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