

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**Primeiros *insights* sobre a relação de parentesco entre botos-cinza
(*Sotalia guianensis* Van Bénédén, 1864) no litoral do Espírito Santo**

ALINE QUEIROZ CASTRO

São Mateus

2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**Primeiros *insights* sobre a relação de parentesco entre botos-cinza
(*Sotalia guianensis* Van Bénédén, 1864) no litoral do Espírito Santo**

ALINE QUEIROZ CASTRO

Monografia de conclusão de curso apresentada
ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para
obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS.

Orientador: Prof^ª. Dra. Ana Paula Cazerta Farro da Rosa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Aline Queiroz Castro**

Título: **Primeiros *insights* sobre a relação de parentesco entre boto-cinza (*Sotalia guianensis*, Van Bénéden, 1864) no litoral do Espírito Santo**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 20/08/2025

Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br VANESSA KUBOYAMA MARQUES DE OLIVEIRA
Data: 27/08/2025 19:50:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 1

Documento assinado digitalmente
gov.br VANDER CALMON TOSTA
Data: 28/08/2025 18:38:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 2 São Mateus
2025

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, por ter me sustentado durante todos os anos da graduação, por ter me direcionado a ser uma pessoa resiliente diante das dificuldades, perseverante no meu objetivo e permitido concluir essa etapa da minha vida.

Agradeço à minha família: mãe, pai e irmã, por todo o apoio ao longo dessa jornada e incentivo para que eu não desistisse, pelo suporte financeiro, emocional e pelas orações, que fizeram toda a diferença para que eu chegasse até aqui.

À Dra. Ana Paula Cazerta Farro, minha orientadora, agradeço a paciência em contribuir com meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico, sempre disposta a ajudar, ensinar, direcionar e acolher os seus orientandos. Uma profissional com uma excelência incomparável. Obrigada por tanto, professora! Não teria uma orientadora melhor.

A minha coorientadora, Me. Manoela da Silva Pereira Arraz, agradeço pela parceria que construímos, pela assistência fornecida para o desempenho da minha escrita da monografia e nas análises do meu trabalho. Obrigada pela paciência de sempre esclarecer minhas dúvidas, pelos momentos de conversa, apoio e, principalmente, por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço à Drienne por contribuir na compilação das informações dos encalhes e dos genótipos para elaboração desse trabalho. Obrigada Dri.

Aos laboratórios LAGEC e ao PMBA, onde tive a oportunidade de realizar estágio e atuar como bolsista de iniciação científica durante minha graduação, foi enriquecedor. Aprendi bastante sobre a rotina laboratorial e tive a oportunidade de vivenciar na prática todos os procedimentos, o que me permitiu também contribuir para as pesquisas do projeto.

Agradeço à FEST - Fundação Espírito-Santense de Tecnologia pela bolsa concedida durante a minha atuação de 1 ano e 5 meses como bolsista de iniciação científica.

Aos institutos IBJ e ORCA pela disponibilidade das amostras de encalhe, que possibilitaram a minha pesquisa.

As amigas que a graduação me deu, Gabi L., Ray e Gabi O., toda a minha gratidão e carinho! Vocês me fazem rir como ninguém e sou imensamente grata por todo o apoio e pelas memórias incríveis que estamos criando juntas. Em especial, quero agradecer à Gabi O. por sempre me ajudar, até nas dúvidas mais simples. Obrigada por tudo!

As meninas do laboratório, Vanessa, Fernanda, Mylla, Cecili, Manu, Dahi e Drienne Vanessa, por todos os ensinamentos com as práticas laboratoriais e experiência compartilhada, pelo acolhimento e carinho nos dias difíceis e por estarem sempre prontas para ajudar ou esclarecer qualquer dúvida.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), orgulho em ser aluna de uma universidade de referência, agradeço imensamente a todos os professores por contribuírem com a minha formação!

"Conservai a luz dos meus olhos para que eu possa ver as belezas da criação."
(Santa Luzia)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Área de Estudo	14
3.2 Coleta e armazenamento das amostras	15
3.3 Extração e Quantificação	16
3.4 Sexagem Molecular via PCR	16
3.5 Amplificação e análise do DNA mitocondrial	17
3.6 Genotipagem de Microssatélites	17
3.7 Análise de Parentesco	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Identificação do Sexo.....	19
4.2 mtDNA	19
4.3 nDNA	20
4. 4 Parentesco	20
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	32

SUMÁRIO DE FIGURAS

- Figura 1.** Boto-cinza (*Sotalia guianensis*). Fonte: Instituto Boto Cinza. 10
- Figura 2.** Distribuição do boto-cinza (*Sotalia guianensis*). Fonte: IUCN..... 11
- Figura 3.** Localização dos botos-cinza encontrados encalhados entre 2021 e 2023 (pontos rosas) nas praias do litoral do Espírito Santo. Mapa: Manoela da Silva Pereira..... 15
- Figura 4.** Número de relações par-a-par observadas ao analisar cinco locus microssatélites de 58 botos-cinza do litoral do Espírito Santo, compostas por pais e filhos, irmãos completos e meios-irmãos 21
- Figura 5.** Células familiares entre botos-cinza que encalharam nas regiões Norte e Sul do Espírito Santo, entre os anos de 2021 e 2023. Cada indivíduo é representado pelo ano de encalhe, número de identificação e haplótipo do mtDNA. Círculos lilás representam fêmeas, quadrados azuis machos e losangos bege indivíduos com sexo indeterminados. Setas pretas indicam as relações de pai/mãe e filhos, linhas vermelhas os irmãos completos e linha pontilhada as relações de meios-irmãos. Hexágonos amarelos representam os encalhes registrados na região Sul, enquanto os de cor verde corresponde à região Norte 22
- Figura 6.** Relações observadas nos encalhes de botos-cinza em datas coincidentes ou próximas, e em praias próximas dentro do mesmo município. Círculos lilás representam as fêmeas, quadrados azuis os machos, linhas vermelhas indicam os irmãos completos e linha pontilhada as relações de meio-irmão. Amarelo representa os encalhes registrados na região Sul, enquanto a cor verde corresponde à região Norte 23

SUMÁRIO DE TABELAS

- Tabela 1.** Locus microssatélites genotipados para determinar diversidade genética e as relações de parentesco dos indivíduos de *Sotalia guianensis* no litoral do Espírito Santo (PMBA, 2024). Locus= nome do marcador; Faixa de amplificação dos alelos = (pares de base – pb); Fluorescência= marcação do primer; T°C= temperatura de anelamento; Referências= estudo responsável pelo desenvolvimento do marcador 18
- Tabela 2.** Distribuição dos haplótipos (mtDNA) identificados nas 58 amostras de botos-cinza, indicando a quantidade de indivíduos por haplótipo e a porcentagem correspondente. Os nomes dos haplótipos foram os mesmos estabelecidos em PMBA(2024)..... 20
- Tabela 3.** Resultado dos cinco locos microssatélites genotipados para determinar as relações de parentesco dos indivíduos de *Sotalia guianensis* no litoral do Espírito Santo. Locus= nome do marcador; Faixa de amplificação dos alelos = (pares de base – pb); Fluorescência= marcação do primer; T°C= temperatura de anelamento; Referências= estudo responsável pelo desenvolvimento do marcador 20
- Anexo 1.** Tabela com os resultados dos cinco locos microssatélites avaliados (Sgui 003, Sgui 017, Sgui 018, GATA98, MK6) para se determinar diversidade genética do boto-cinza na área atingida pelo rejeito de minério de Fundão (PMBA, 2024). Número de alelos (K), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS)..... 32

RESUMO

Compreender as relações de parentesco entre indivíduos de uma população é fundamental para conhecer os aspectos da estrutura social e apoiar estratégias de conservação. *Sotalia guianensis*, pertencente à família Delphinidae, possui como característica marcante a coloração cinza escura na região dorsal. É uma espécie gregária que habita as águas quentes e costeiras do Atlântico, desde o norte de Honduras até o litoral brasileiro. Este estudo analisou regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) e do DNA nuclear (nDNA) para investigar conexões de parentesco entre botos-cinza encontrados encalhados no litoral do Espírito Santo, entre 2021 e 2023. Foram coletadas amostras de 58 indivíduos e realizada a extração do material genético pelo método de solução salina. Para analisar a diversidade mitocondrial, e as relações matrilineares, foi amplificada a região controle D-loop (600bp). Foram encontrados quatro haplótipos, porém um dos haplótipos apresentou alta frequência entre os indivíduos. Nas análises de cinco locos microssatélites (nDNA) verificou-se a identificação de 71 relações familiares, tanto de primeiro grau, como irmãos completos ou pai-filhos, quanto de segundo grau, meios-irmãos. O parentesco entre os indivíduos revelou uma baixa diversidade materna, com a maioria das amostras apresentando o mesmo haplótipo, o que sugere uma possível filopatria feminina. Ademais, a predominância de relações de segundo grau, entre meios-irmãos, sugere uma estrutura social com múltiplas conexões familiares, possivelmente resultante do sistema reprodutivo promíscuo e da permanência de grupos aparentados no mesmo espaço ao longo da vida. Com esse estudo foi possível inferir graus de relacionamento entre os indivíduos, aspectos da estrutura social e padrões de dispersão da população. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre a estrutura social genética da população, e consequentemente contribui com informações para futuras estratégias de conservação da espécie na região.

Palavras-chave: Cetáceo, D-loop, Matrilinearidade, Microssatélites.

ABSTRACT

Understanding the kinship relationships among individuals in a population is essential for assessing social structure and supporting conservation strategies. *Sotalia guianensis*, belonging to the family Delphinidae, is characterized by its dark gray coloration on the dorsal region. It is a gregarious species inhabiting warm, coastal waters of the Atlantic Ocean, ranging from northern Honduras to the Brazilian coast. This study analyzed mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) regions to investigate kinship connections among Guiana dolphins stranded along the coast of Espírito Santo, Brazil, between 2021 and 2023. Samples from 58 individuals were collected, and genetic material was extracted using the saline solution method. To assess mitochondrial diversity and matrilineal relationships, the D-loop control region (600 bp) was amplified. Four haplotypes were found, with one haplotype showing a high frequency among individuals. Analyses of five microsatellite loci (nDNA) identified 71 family relationships, including both first-degree (full siblings or parent-offspring) and second-degree (half-siblings) connections. Kinship patterns revealed low maternal diversity, with most samples sharing the same haplotype, suggesting possible female philopatry. Furthermore, the predominance of second-degree relationships among half-siblings suggests a social structure with multiple family connections, possibly resulting from a promiscuous mating system and the long-term cohabitation of related groups within the same area. With this study, it was possible to infer degrees of relationships among individuals, aspects of social structure, and patterns of population dispersion. These results enhance the knowledge about the genetic social structure of the population and consequently contribute information for future conservation strategies of the species in the region.

Keywords: Cetacean, D-loop, Matrilinearity, Microsatellite.

1. INTRODUÇÃO

Conhecido popularmente como boto-cinza ou golfinho da Guiana, a espécie *Sotalia guianensis* (Van Beneden, 1864) pertence à subordem Odontoceti (golfinhos com dentes) e é um dos menores cetáceos pertencentes à família Delphinidae. Caracterizam-se pela coloração de tom cinza escuro na região do dorso e nas laterais do corpo tonalidades de cinza mais claro (Figura 1). A região ventral apresenta pigmentação branca e rosada, sendo essa segunda mais comum na fase juvenil. Outra característica morfológica marcante é a nadadeira dorsal, que se encontra posicionada no centro do dorso, com um formato triangular (Da Silva & Best, 1996).



Figura 1. Boto-cinza (*Sotalia guianensis*). Fonte: Instituto Boto Cinza.

Esses golfinhos são encontrados amplamente distribuídos ao longo das águas costeiras do Oceano Atlântico tropical e subtropical das Américas do Sul e Central. Seu limite de distribuição abrange o norte de Honduras (15° N) e, ao sul, o Estado de Santa Catarina (27° S), no Brasil (Simões-Lopes, 1987; Da Silva & Best, 1996) (Figura 2). Ocorre principalmente em regiões como estuários protegidos, enseadas, baías e desembocaduras de grandes rios (Borobia et al., 1991). É uma espécie gregária, que apresenta grupos de 1 a 50 indivíduos, formados por indivíduos adultos, jovens e filhotes (Da Silva & Best, 1996). Essas agregações são importantes para várias atividades sociais, incluindo alimentação, reprodução e proteção contra predadores, além de beneficiar o acasalamento, tendo mais oportunidades de encontrar diferentes parceiros, característico de espécies com sistema reprodutivo promíscuo (Flores, 2002).



Figura 2. Distribuição do boto-cinza (*Sotalia guianensis*). Fonte: IUCN

Os golfinhos dessa espécie, quando filhotes, nascem medindo entre 91,2 e 106 cm, e quando adulto o comprimento médio é cerca de 190 cm (Ramos et al., 2000). O tamanho máximo registrado para adultos é 220 cm (Flores, 2002), podendo chegar ao peso corporal máximo de 121 kg, com uma expectativa de vida variando entre 30 e 35 anos (Rosas & Monteiro-Filho, 2002).

Após o desmame, as fêmeas atingem a maturidade sexual em torno de 5 a 8 anos, com um ciclo reprodutivo estimado de 2 anos. A gestação ocorre em um período de 11 a 12 meses, o tempo de lactação dura em torno de nove meses. Os machos são sexualmente maduros por volta dos 7 anos de idade (Rosas & Monteiro-Filho, 2002). Em relação ao sistema reprodutivo, apresenta um comportamento promíscuo, envolvendo múltiplos machos e, conseqüentemente, uma competição espermática (Silva, 2023).

Sua dieta consiste predominantemente de lulas e de peixes teleósteos, com uma forte preferência aos peixes pertencentes à família Sciaenidae e alguns gêneros de cefalópodes. Crustáceos pertencentes à família Panaeidae são eventualmente encontrados nos estômagos de *S. guianensis*, porém se trata de um item alimentar com baixa frequência de ocorrência (Di Benedito, 2000; Oliveira, 2003).

No estudo realizado por Rodrigues (2014) foi caracterizada a dieta e a ecologia alimentar do boto-cinza na área do Banco dos Abrolhos, com base na análise do conteúdo estomacal de 42 indivíduos encalhados. Foram identificados 37 táxons, sendo as principais presas *Isopisthus parvipinnis*, *Stellifer rastrifer*, *Bagre* sp., *Macrodon* sp., *Trichiurus lepturus* e *Mugil* sp., que representaram 85% da dieta. A estratégia alimentar foi classificada como generalista e oportunista, com uma ampla variedade de presas e poucas espécies específicas.

Em relação ao comportamento social dessa espécie, evidenciado pela coesão dos grupos, compostos por indivíduos de diferentes faixas etárias, esses grupos muitas vezes possuem estrutura familiar, como entre mães com filhotes e entre outros indivíduos aparentados, o que contribui para a coesão social e para as estratégias cooperativas de alimentação e proteção (Pinheiro, 2014). Conforme análise de Bicalho et al. (2018), pesquisa realizada no estuário dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim na costa do Espírito Santo, através de monitoramento por ponto fixo semanalmente e embarcações mensalmente nos anos de 2017 a 2018, 26% dos grupos eram compostos por adultos e filhotes, sendo sugeridos grupos compostos por indivíduos aparentados. Neste contexto, investigar relações de parentesco pode contribuir para uma melhor compreensão da organização social e auxiliar em estratégias de conservação.

Quanto a conservação, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) classifica a espécie *S. guianensis* como “Quase ameaçada”. No Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBio, 2018), ela é categorizada como “Vulnerável” (VU). Por apresentarem hábitos costeiros, as populações de boto-cinza estão vulneráveis a incidentes em redes de pesca e sujeitas a outras ameaças antropogênicas, como poluição causada por lixo sólido ou produtos químicos. Dias (2024) atesta que a captura incidental em atividades de pesca representa um risco para o táxon, e as consequências dessas interações impactam diretamente sua conservação.

Neste contexto, a utilização dos marcadores moleculares, DNA mitocondrial (mtDNA) e locos microssatélites tem favorecido para pesquisas com foco na conservação de cetáceos. O DNA mitocondrial, cuja herança é materna e que apresenta alta taxa de mutação, possibilita investigar padrões de filopatria, linhagem materna e história evolutiva. Enquanto, os microssatélites, por serem biparentais e altamente variáveis são aplicados em análises de parentesco e principalmente em estudos de diversidade genética (Wilson et al., 1985). Um dos primeiros estudos que aplicaram o uso desses marcadores foi o de Dizon et al. (1991), que demonstrou que a aplicação desses marcadores proporciona informações como, diferenciação

genética, fluxo gênico, e que o conhecimento de unidades para a conservação com base em dados genéticos é uma estratégia para contribuir na manutenção da diversidade genética das populações.

Os microssatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*) são pequenas sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos presentes no DNA nuclear, que são utilizados em diferentes aplicações como, análise de parentesco, identificação forense e análises de estrutura populacional (Wright & Bentzen, 1995; Ellegren, 2004).

Pereira (2023) utilizou sete loci de microssatélites para estimar relações de parentesco dos 191 golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*) no Arquipélago de Noronha. Esse tipo de marcador permite comparar os alelos em cada loco entre os indivíduos, tornando possível identificar combinações genéticas compatíveis com relações entre pais e filhos, irmãos completos e meios-irmãos. Na sua análise inferiu-se 164 relações de parentesco geral entre os indivíduos e a média de parentesco entre fêmeas foi mais elevada do que entre machos, corroborando com a ideia de filopatria pelas fêmeas na região, proposta por Faria et al. (2020).

A partir de análise da região controle do mtDNA (D-loop), De Oliveira (2023), investigou a estrutura genética de uma população isolada de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) no Espírito Santo, a fim de avaliar a diversidade genética materna, estrutura de parentesco e filiação materna. Entre 80 amostras de indivíduos encalhados, as diversidades haplotípica e nucleotídica foram baixas, 0,026 e 0,0008 respectivamente. Os resultados sugeriram uma baixa diversidade haplotípica, e sugeriu-se filopatria para essa espécie de golfinho.

Quanto a diversidade genética para a espécie de *Sotalia guianensis* na costa do Espírito Santo, análises do DNA mitocondrial e DNA nuclear, realizadas a partir de indivíduos encontrados encalhados, mortos nas praias do litoral capixaba, são conduzidas pelo Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA/FEST). Esse é um projeto criado a fim de monitorar toda a biota em ambientes dulcícolas, costeiros e marinhos que foram afetadas pelo rompimento da barragem de Fundão, em Mariana (MG). Os resultados dos testes de estruturação do mtDNA indicam a presença de duas populações regionais, divididas entre a Região Norte-Central, com diversidade haplotípica de $h = 0,615$ e o Extremo Sul do estado $h = 0,781$, bem como duas populações temporais, separadas em períodos pré e pós-rompimento da barragem. A análise da diversidade genética nuclear, baseada em 10 loci microssatélites, revelam uma população de baixa variabilidade genética, com valores médios de heterozigosidade de $h = 0,120$, e riqueza alélica média de $RA = 3,360$ (PMBA, 2024).

Estudo anterior com *S. guianensis*, que utilizou sequências de DNA mitocondrial de 203 indivíduos a fim de investigar a estrutura genética de populações desses golfinhos ao longo do litoral sul da Bahia e norte no Espírito Santo, evidenciou presença de 18 haplótipos, com diversidade haplotípica total de 0,8643 e nucleotídica de 0,004337, presença de haplótipos exclusivos nas diferentes regiões, com uma estruturação genética entre as três áreas amostradas estatisticamente significativa (Mendes, 2019).

Assim, considerando que a espécie é costeira, apresenta sugestão de filopatria, de presença de diferentes populações, e confirmação de diversidade genética baixa para a região, o presente estudo oferece uma contribuição complementar, buscando analisar sob uma nova perspectiva a organização social da espécie por meio da inferência de possíveis laços de parentesco entre indivíduos no litoral capixaba. Para isso, foram utilizadas sequências da região de controle do DNA mitocondrial, e marcadores nucleares microsatélites em análises que buscam comparar os graus de conexão genética entre os indivíduos, além de avaliar possíveis padrões de estrutura familiar dentro das células amostradas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar possíveis relações de parentesco e ampliar a compreensão da estrutura familiar de indivíduos de *Sotalia guianensis* no litoral do Espírito Santo.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar possíveis relações de parentesco entre os indivíduos amostrados;
- Avaliar se os golfinhos encalhados em locais e datas próximas são relacionados;
- Investigar se os grupos aparentados apresentam indícios de endogamia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O estado do Espírito Santo localiza-se no sudeste do Brasil, tendo todo o seu limite leste banhado pelo Oceano Atlântico (Figura 3), com uma linha costeira de aproximadamente 436 km de extensão (IBGE, 2023). O clima predominante é tropical litorâneo, com precipitação

média anual de 1200 mm, concentrada entre os meses de outubro e março, e temperatura média de 25 °C (INMET, 2023). O litoral capixaba comporta ambientes marinhos e estuarinos, como manguezais baías abrigadas e recifes, o que favorece a biodiversidade e a ocorrência de mamíferos aquáticos (IEMA, 2022).

3.2 Coleta e armazenamento das amostras

Amostras de tecido muscular foram coletadas de 58 indivíduos (Anexo 1) pertencentes a espécie *Sotalia guianensis*, que foram encontrados encalhados mortos nas praias do estado do Espírito Santo (Figura 3) nos anos 2021 (n=9), 2022 (n=27) e 2023 (n=22), sendo 26 fêmeas, 27 machos e cinco de sexo indeterminado.

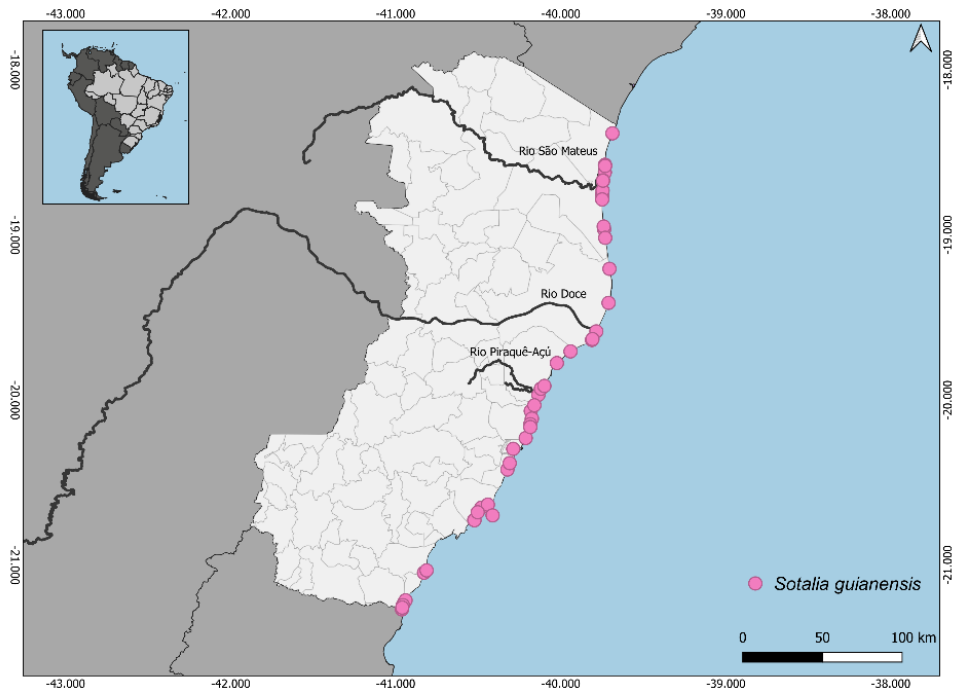


Figura 3. Localização dos botos-cinza encontrados encalhados entre 2021 e 2023 (pontos rosas) nas praias do litoral do Espírito Santo. Mapa: Manoela da Silva Pereira.

Quanto à faixa etária dos indivíduos da espécie encalhados, 38 eram golfinhos na fase adulta, 15 juvenis, um feto, três filhotes e um não identificado. Todos os indivíduos foram morfológicamente identificados e passaram por necropsia pelo Instituto Orca (Organização Consciência Ambiental) e Instituto Baleia Jubarte (IBJ), dentro do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA).

Após a coleta dos fragmentos de tecido, todas as amostras foram armazenadas individualmente em microtubos de 1,5 ml com álcool absoluto mantidas em freezer e encaminhadas ao Laboratórios de Genética e Conservação Animal (LGCA) do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), no qual foram realizados os procedimentos de extração de DNA, quantificação, amplificação, purificação, sequenciamento e análises de sexagem molecular, diversidade e estruturação genética, dentro do escopo do PMBA, e as análises de parentesco deste estudo.

3.3 Extração e Quantificação

Para a extração de DNA genômico das 58 amostras, foi utilizado o protocolo de extração por solução salina descrito por Bruford et al. (1992). Os fragmentos de tecido foram picotados com o auxílio de um bisturi esterilizado em placas de Petri e adicionados individualmente em microtubos de 1,5 ml. Para formar uma solução de lise, em cada tubo foram combinados 410 µl de Buffer de Extração, 80 µl de SDS 10% e 10 µl de Proteinase K. Em seguida, as soluções foram incubadas em banho maria a 55°C para a degradação do tecido. Após a etapa de incubação, as amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 180 µl de NaCl. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação à 13.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 ml. Adicionou-se então 1000 µl de isopropanol gelado à solução, que foi centrifugada à 13.000 rpm por 7 minutos. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e adicionado uma quantidade de 250 µL de etanol 80% e centrifugada por 7 minutos. Esta última etapa foi repetida e em seguida o sobrenadante foi descartado, o álcool foi completamente removido e os microtubos foram colocados em um banho-maria a 55°C. Por fim, foram adicionados 50 µl de água ultrapura para a ressuspensão do DNA extraído. Posteriormente, para a análise de quantificação e qualidade do DNA, utilizou-se o equipamento espectrofotômetro (NanoDrop One®).

3.4 Sexagem Molecular via PCR

Para a determinação do sexo molecular dos indivíduos, foi realizado o procedimento de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) onde os genes ZFX e SRY foram amplificados, utilizando os *primers* ZFX0582 e ZFX0923 (Bérube & Palsboll, 1996); PMSRYF (Richard et al., 1994) e TtSRYR (Rosel et al., 1994). Para as soluções foram utilizadas as seguintes concentrações: Tampão 10x para PCR (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (50mM), 1,5 mM de

dNTP (10mM), 0,3 mM de cada *primer* (10mM), e para o SRY foi aplicado 0,06 mM, 1,5 de unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen). O volume final da reação foi de 25 μ L. As condições de termociclagem foram programadas para os respectivos ciclos: 92°C em 30s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 51°C por 45s e 72°C por 45 segundos.

Na sequência, cada solução de DNA amplificado foi misturada com uma solução de corante BlueJuice. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e foto-documentados em transluminador UV, sendo possível a identificação do sexo de cada golfinho.

A significância quanto a distribuição entre os sexos foi avaliada neste estudo por meio do teste binomial exato (Morisette & Khorram, 1998).

3.5 Amplificação e análise do DNA mitocondrial

Para analisar a diversidade mitocondrial, a região D-loop foi amplificada utilizando os primers DLp 1.5 (Baker et al., 1998) e DLp8 (Pichler et al., 2001). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com um volume total de 20 μ L, contendo 1 μ L (10-100 ng/ μ L) de DNA, tampão 10x para PCR (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (50mM), 0,4 mM de cada dNTP (10mM), 0,4 mM de cada primer (10mM) e 0,035 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água ultrapura. As condições do termociclador consistiram em uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos consecutivos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 40 s, e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados das regiões D-loop foram purificados com a enzima ExoSap-IT para remover possíveis inibidores da PCR e enviados para sequenciamento em empresa terceirizada. Todas as sequências obtidas foram editadas e alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (Robert, 2004) do programa MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

3.6 Genotipagem de Microssatélites

Inicialmente dez locos microssatélites foram amplificados (Tabela 1). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com um volume 10 μ L, contendo Tampão 10x para PCR (Invitrogen), 0,8 mM de MgCl₂ (50mM), 0,2 mM de dNTP (10mM), 0,2 μ M de cada primer (10mM) e 0,2 de unidades Taq DNA polimerase. As condições no termociclador foram de 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de 92°C por 45 s, T° (54 - 60° C) por 45 s e 72°C por 45 segundos. Na sequência oito ciclos de 92°C por 45 s, 53°C por 45 s e 72°C por 45 segundos,

finalizando com 72°C por 30 minutos. A temperatura de anelamento foi ajustada conforme o loco microssatélite amplificado.

Tabela 1. Locos microssatélites genotipados para determinar diversidade genética e as relações de parentesco dos indivíduos de *Sotalia guianensis* no litoral do Espírito Santo (PMBA, 2024). Locos= nome do marcador; Faixa de amplificação dos alelos = (pares de base – pb); Fluorescência= marcação do primer; T°C= temperatura de anelamento; Referências= estudo responsável pelo desenvolvimento do marcador.

Locos	Faixa de alelos (pb)	Fluorescência	T°C	Referências
Sgui 002	210-250	HEX	50	Cunha & Watts (2007)
Sgui 003	160-200	FAM	52	Cunha & Watts (2007)
Sgui 006	210-240	FAM	62	Cunha & Watts (2007)
Sgui 011	410-460	FAM	52	Cunha & Watts (2007)
Sgui 016	150-200	HEX	60	Cunha & Watts (2007)
Sgui 017	150-190	FAM	60	Cunha & Watts (2007)
Sgui 018	240-280	HEX	62	Cunha & Watts (2007)
GATA 98	92-134	FAM	56	Palsboll et al. (1997)
PPHO142	127-159	HEX	60	Rosel et al. (1999)
MK6	145-189	HEX	60	Krutzen et al. (2001)

Os locos foram identificados com o software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems). O desequilíbrio de ligação e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram verificados com o programa GENEPOP v.4.2 (Raymond, 1995; Rousset, 2008). Para teste de alelos nulos ou erros de genotipagem foi realizado no programa Microchecker 2.2.0.3 (Van Oosterhout et al., 2004), com correções de Bonferroni. Para cálculo dos índices de diversidade genética, riqueza alélica e teste de estruturação temporal (Fst) foi utilizado o programa Arlequin v.3.11 (Excoffier et al., 2010). E para o coeficiente de endogamia (Fis) e alelos privados foram verificados em Fstat (Goudet, 2001) (Anexo 1).

3.7 Análise de Parentesco

Neste estudo, para avaliar o nível de relacionamento entre os indivíduos foi utilizado o programa ML-Relate (Kalinowski et al., 2006), software com capacidade de ajustar alelos nulos e realizar cálculos de máxima verossimilhança (R), o que torna suas análises mais precisas (Kalinowski et al., 2006). Dessa ferramenta dois parâmetros foram utilizados para determinar

o grau de aproximação entre os indivíduos: o “Relatedness”, que varia de 0 a 1 e realiza análises estatísticas baseadas no método de Máxima Verossimilhança para avaliar e comparar diferentes hipóteses sobre os diferentes níveis de relacionamento e o “Relationship”, que emprega essas análises para criar simulações que permite encontrar relacionamentos consistentes de primeiro grau entre pais/ mãe e filhos (PO), irmãos completos (FS), e de segundo grau meio-irmão (HS) e quanto aos não aparentados (U), a um nível de significância de 0,05 (Kalinowski et al., 2006; Gravena, 2007; Konrad et al., 2018).

Além disso, o coeficiente de parentesco médio (R) foi calculado a partir da planilha com os resultados fornecidos pelo ML-Relate, considerando todos os indivíduos que apresentaram algum grau de conexão, resultando no nível médio de parentesco para a população analisada.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação do Sexo

Dos 58 golfinhos amostrados, identificados molecularmente no PMBA. Os resultados indicaram a presença de 27 machos (50,9%) e 26 fêmeas (49,1%), no entanto, o DNA de cinco indivíduos não amplificou na PCR de sexagem (8,6%), sendo estes identificados como indeterminados. A proporção sexual observada foi próxima de 1:1, e o teste estatístico não se mostrou significativo ($p=0,89$).

4.2 mtDNA

Neste trabalho, foi selecionado um subconjunto de 58 indivíduos, onde foram identificados quatro haplótipos distintos, (H1, H2, H3 e H13) sendo que (H1) predominou, ocorrendo em 75,9% dos indivíduos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos haplótipos (mtDNA) identificados nas 58 amostras de botos-cinza, indicando a quantidade de indivíduos por haplótipo e a porcentagem correspondente. Os nomes dos haplótipos foram os mesmos estabelecidos em PMBA (2024).

Haplótipo	Quantidade	Porcentagem
H1	44	75,9%
H2	12	20,7%
H3	1	1,72%
H13	1	1,72%

4.3 nDNA

A genotipagem do DNA nuclear dos 58 golfinhos analisados neste estudo foi realizada previamente pelo Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA), a partir do mesmo conjunto de análises aplicadas a todas as amostras da espécie. Dos dez locos inicialmente testados para a genotipagem de nDNA, cinco locos foram desconsiderados por apresentarem frequências elevadas de alelos nulos e desvios significativos de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) sendo eles: Sgui 02, Sgui 06, Sgui 11, Sgui 16 e PPH0142. Assim, os cinco locos que atenderam aos critérios de qualidade, ausência de alelos nulos e desequilíbrio de ligação foram mantidos nas análises genéticas (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado dos cinco locos microssatélites genotipados para determinar as relações de parentesco dos indivíduos de *Sotalia guianensis* no litoral do Espírito Santo. Locos= nome do marcador; Faixa de amplificação dos alelos = (pares de base – pb); Fluorescência= marcação do primer; T°C= temperatura de anelamento; Referências= estudo responsável pelo desenvolvimento do marcador.

Loco	Faixa de alelos (pb)	Fluorescência	T°C	Referências
Sgui 03	160-200	FAM	52	Cunha & Watts (2007)
Sgui 17	150-190	FAM	60	Cunha & Watts (2007)
Sgui 18	240-280	HEX	62	Cunha & Watts (2007)
GATA98a	92-134	FAM	56	Palsboll et al. (1997)
Mk6	145-189	HEX	60	Krutzen et al. (2001)

4.4 Parentesco

Em relação ao parentesco geral, quando analisadas as relações par-a-par, foi encontrado um total de 71 laços familiares, 34 parentescos de primeiro grau, sendo 17 pares de irmãos completos e 17 relações pai-filho e 37 relações de segundo grau meios-irmãos entre os golfinhos amostrados nos diferentes anos (Figura 4). O R médio observado foi de aproximadamente 0,244.

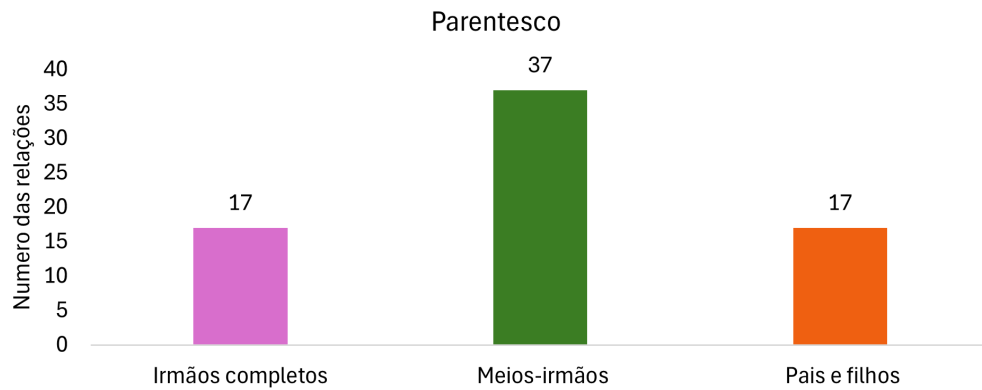


Figura 4. Número de relações par-a-par observadas ao analisar cinco locus microssatélites de 58 botos-cinza do litoral do Espírito Santo, compostas por pais e filhos, irmãos completos e meios-irmãos.

Dos laços familiares quanto ao parentesco geral, na Figura 5A, temos uma relação de primeiro grau (pai-filho) entre o golfinho S-505, de sexo não identificado, e sua descendente E-729, uma fêmea juvenil. Encalharam no ano de 2021 em regiões diferentes. Foi identificada ainda uma relação de segundo grau entre esse indivíduo de sexo não definido e duas fêmeas, S-467, S-505 e E-742, de meios-irmãos.

A Figura 5B representa uma célula familiar de amostras encalhadas em 2023, onde duas fêmeas adultas (S-492 e E-765) e pertencentes ao haplótipo H1 apresentaram relação de primeiro grau (irmãs-completas), embora encalhadas em regiões diferentes, S-492 em abril no município de Guarapari e S-765 em agosto no município de Linhares. Também foi identificada relação de meio-irmão destas duas amostras com um macho adulto (S-502) também pertencente ao haplótipo H1, encalhado no município de Vila velha na região sul.

Já a célula da Figura 5C evidência, dentre as relações, um possível cruzamento entre os indivíduos S-487, fêmea adulta do haplótipo H1, descendente de S-499, macho adulto pertencente ao haplótipo H2, ambos da região Sul, sendo pais da fêmea juvenil E-736, encontrada em 2022 na região Norte do estado do haplótipo H1. Ainda nessa mesma célula, observa-se uma relação de primeiro grau (irmãs completas) entre as fêmeas S-498 e S-491, com registros de encalhe em 2023, ambas no município da Serra, ambas são meias-irmãs de S-487 que apresenta uma relação de meio-irmão com S-460. Outra relação de segundo grau, ainda dessa célula, é entre meios-irmãos: S-499 e E-744.

Na Figura 5D, representada por indivíduos encontrados no ano de 2022 na região sul do litoral capixaba, também é evidenciada uma relação de primeiro grau (irmãos completos) entre os indivíduos S-455 e S-458, compartilhando o mesmo haplótipo do mtDNA (H2). As demais

conexões estabelecem um padrão de relacionamento de segundo grau de meios-irmãos entre todos indivíduos da célula familiar, S-454, S-58, S-473, S-468 e S-455.

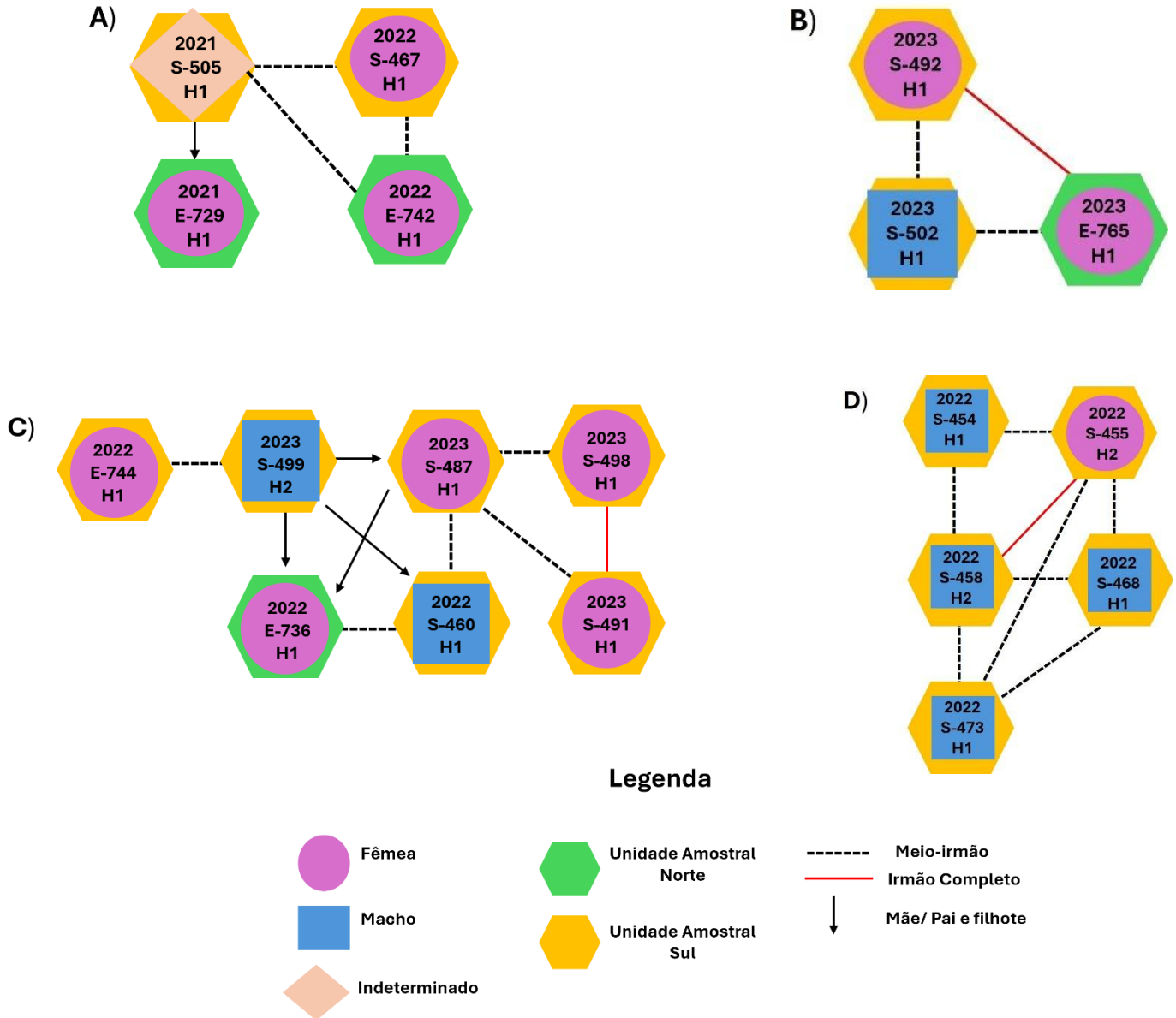


Figura 5. Células familiares entre botos-cinza que encalharam nas regiões Norte e Sul do Espírito Santo, entre os anos de 2021 e 2023. Cada indivíduo é representado pelo ano de encalhe, número de identificação e haplótipo do mtDNA. Círculos lilás representam fêmeas, quadrados azuis machos e losangos bege indivíduos com sexo indeterminados. Setas pretas indicam as relações de pai/mãe e filhos, linhas vermelhas os irmãos completos e linha pontilhada as relações de meios-irmãos. Hexágonos amarelos representam os encalhes registrados na região Sul, enquanto os de cor verde corresponde à região Norte.

Nos encalhes ocorridos em datas próximas, foi possível observar relacionamentos de primeiro grau, entre indivíduos encalhados no mesmo município e na mesma data. Também foram identificados relacionamentos de segundo grau de meios-irmãos. As relações encontradas ocorreram na praia do mesmo município ou em praias próximas, dentro da mesma semana (Figura 6).

Na figura 6A, observa-se uma relação de primeiro grau (mãe-filhote) entre duas fêmeas (S-452 e S-453), encontrados na data de 28/12/2021, na Praia de Comboios, no município de Aracruz.

Figura 6B mostra relação de segundo grau (meio-irmão) entre as amostras E-758 e E-760, dois machos encontradas na praia de Guriri pertencentes ao haplótipo H1, no município de São Mateus, no norte do estado. As datas de encalhe desses indivíduos diferem por apenas dois dias.

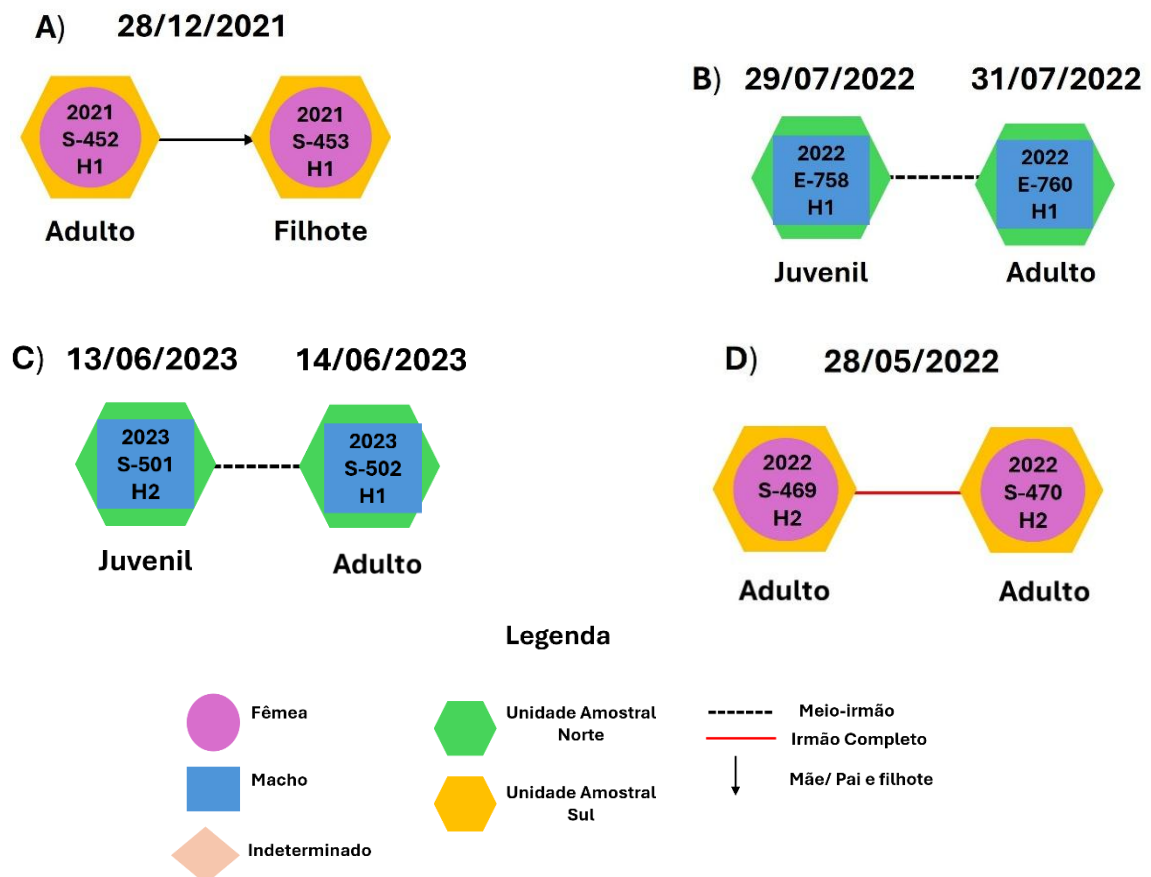


Figura 6. Relações observadas nos encalhes de botos-cinza em datas coincidentes ou próximas, e em praias próximas dentro do mesmo município. Círculos lilás representam as fêmeas, quadrados azuis os machos, linhas vermelhas indicam os irmãos completos e linha pontilhada as relações de meio-irmão. Amarelo representa os encalhes registrados na região Sul, enquanto a cor verde corresponde à região Norte.

Já na figura 6C observa-se outra relação de segundo grau entre meios-irmãos, com mesmo pai, S-501 (Haplótipo H2) encontrado em Parati, e S-502 (Haplótipo H1) na praia de Itaparica ambos da região sul, com datas de encalhe com um dia de diferença.

Já a figura 6D ilustra uma relação de primeiro grau entre irmãs completas (mesmos progenitores), ambas pertencem ao mesmo haplótipo (H2). Ambas foram encontradas na Praia de Marobá, localizada no município de Presidente Kennedy em 28/05/2022.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo descrever, pela primeira vez, possíveis relações de parentesco para a espécie *Sotalia guianensis* do litoral do Espírito Santo. Foram identificados 71 laços genéticos entre os 58 indivíduos, o que representa um recorte da população monitorada pelo Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA). Esses achados corroboram a baixa diversidade nuclear reportada para a população (PMBA, 2024). O elevado número de parentesco observado pode refletir a estrutura social coesa dos grupos e sugerir a ocorrência de endogamia, o que pode levar a vulnerabilidade genética. Segundo Frankham et al. (2010) a baixa diversidade genética nuclear compromete a capacidade de populações se adaptarem a pressões ambientais e aumenta o risco de extinção. Assim, a manutenção da variabilidade genética é crucial para garantir a sobrevivência da espécie a longo prazo.

No PMBA (2024) também foi indicada uma estruturação mitocondrial divididas entre a Região Norte-Central, com diversidade haplotípica de $h=0,615$ e o Extremo Sul $h=0,781$, o que sugere baixa ocorrência de fluxo gênico entre as duas regiões. No entanto, as conexões genéticas familiares encontradas neste trabalho evidenciam a ocorrência de diferentes graus de parentesco entre indivíduos das regiões norte e sul do Estado, como por exemplo a relação de primeiro grau (irmãs completas) ilustrada na figura 5B entre S-492 e E-765 ambas de sexo feminino, haplótipo (H1), o que sugere que esse fluxo gênico detectado pode ocorrer por dispersão masculina, e a estruturação mitocondrial reflete padrões de filopatria feminina, hipótese corroborada pela ausência de estruturação nuclear (Farro et al. *in prep.*).

Considerando que aproximadamente 75,9% das amostras do presente estudo estão associadas ao mesmo haplótipo (H1), sugere que esses indivíduos possam ter uma única linhagem materna. Essa baixa diversidade mitocondrial observada nas células amostradas, indicam grupos familiares com forte parentesco materno. É um padrão também observado em outras populações de cetáceos (Gariboldi et al., 2016; De Oliveira, 2023) que, embora tenham analisados regiões distintas, descreveram para a espécie de *Pontoporia blainvillei* a alta

frequência de um único haplótipo mitocondrial, sugerindo baixa diversidade de linhagens maternas nessas populações. Esse achado coloca os botos-cinzas aqui analisados dentro de um padrão já estudado com outros pequenos cetáceos.

Quando analisamos a ocorrência de encalhe simultâneo de duas fêmeas adultas geneticamente identificadas como irmãs completas, no município de Presidente Kennedy, somada a outras relações entre fêmeas identificadas no presente estudo, pode-se inferir a existência de uma estrutura social matrilinear com uma manutenção de coesão entre fêmeas aparentadas ao longo da vida. Isso sugere uma filopatria feminina. Padrões semelhantes de coesão social entre fêmeas aparentadas têm sido descritos com outras espécies de cetáceos. Com cachalotes, *Physeter macrocephalus*, Sarano et al. (2021) avaliando uma população de 24 indivíduos na costa de Maurício no Oceano Índico, revelaram que irmãs, mães e filhas adultas permanecem no mesmo grupo social ao decorrer da vida. Embora o presente estudo tenha identificado essa relação a partir de encalhe, e não observação de grupos vivos, esse achado reforça que fêmeas aparentadas podem compartilhar áreas e manter o vínculo duradouro.

Uma outra relação de primeiro grau entre uma fêmea adulta e sua descendente (uma fêmea filhote) também foi encontrada, ambas encalhadas no município de Aracruz no dia 28 do mês de dezembro de 2021. No estudo de monitoramentos visuais nos estuários dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, no município de Aracruz, realizado por Bicalho (2018), registrou-se uma maior frequência de filhotes em grupos de boto-cinza nos meses mais quentes. Estes meses correspondem as estações de primavera e verão do ano, como o mês de dezembro, sugerindo que o estuário possa ser mais utilizado para cuidado parental nesse período em razão de maior oferta de alimento e da tranquilidade das águas.

Batista et al. (2014) descreveram que a alta fidelidade ao local por parte dos botos-cinzas no estuário do rio Paraguaçu pode contribuir para a ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados. E em uma das células familiares analisadas nesse estudo, foi identificado um caso de cruzamento endogâmico entre S-499 macho adulto haplótipo (H2), e sua descendente S-487 haplótipo (H1), fêmea adulta, ambos registros de encalhe ocorreu na região sul.

A alta fidelidade da população estudada com uma menor dispersão genética e a baixa diversidade mitocondrial observada sugerem uma estrutura matrilinear com poucas trocas de fêmeas entre grupos. Frankham et al. (2010) descreve que esse tipo de cruzamento endogâmico impacta a variabilidade genética, levando também ao aumento da expressão de alelos deletérios. Assim, a presença dessa relação observada neste estudo reforça a vulnerabilidade da espécie na região e a importância de ações voltadas à conservação da espécie.

Foram encontrados 37 laços de segundo grau entre os golfinhos, o que corresponde aproximadamente 52,11% das amostras analisadas, o que podemos associar ao sistema de acasalamento promíscuo, descrito para *Sotalia guianensis* por Flores (2002). Nesse sistema tanto os machos quanto as fêmeas podem copular com vários parceiros quando sexualmente maduros, o que favorece a ocorrência de meios-irmãos na mesma população.

Ainda analisando as células familiares de encalhes em datas e localidades próximas, destaca-se duas células familiares compostas por indivíduos machos em faixa etária diferentes, com relacionamento de meios-irmãos, o que sugere a existência de reprodução por um mesmo genitor em diferentes períodos. Considerando a filopatria feminina aqui já discutida, é possível que fêmeas permaneçam na mesma área e gerem descendentes de diferentes parceiros. Pereira (2023) também identificou alto número de relacionamento de segundo grau entre meios-irmãos em *Stenella longirostris* fazendo entender que a ocorrência desse tipo de parentesco pode ser comum em outros cetáceos que apresentam comportamento promíscuo. Além disso, foram observadas relações de encalhe em datas e localidades próximas entre os machos, sendo filhotes encalhados dias antes de machos adultos, com relação de segundo grau entre meios-irmãos. Esse padrão pode sugerir que indivíduos jovens se mantêm próximos de adultos como uma forma de aprendizado social, desenvolvimento de estratégias de vida e transmissão de comportamentos. O estudo de Connor et al. (2000) com *Tursiops*, por exemplo, descreveu que machos formam laços com adultos, muitas vezes parentes, que funcionam como “mentores” sociais.

Apesar dos achados relevantes relacionados à genética da espécie, descritos nas particularidades das células familiares apresentadas, é importante ressaltar que este estudo utilizou um número reduzido de locos microssatélites, o que pode limitar a precisão na inferência de parentesco, especialmente em relações mais distantes. Já haviam sido destacados por Wilson et al. (1985) e Dizon et al. (1991) tanto a utilidade dos marcadores microssatélites para a análise de relações de parentesco quanto o fato de que a acurácia das análises depende do número e da variabilidade dos locos genotipados. No entanto, diante dos resultados apresentados é fundamental que continuemos com as análises com um maior número de marcadores. Assim como, considerando a baixa diversidade genética e fidelidade materna local observada, a necessidade de monitorar e garantir a integridade de habitats costeiros, visando preservar a espécie a longo prazo.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, são apresentadas as primeiras evidências de relações de parentesco de primeiro e segundo grau para *Sotalia guianensis* no litoral capixaba, ampliando o conhecimento sobre a biologia, quanto a estrutura social da população e ecologia da espécie na região. Os resultados de parentesco e estrutura familiar aqui encontrados sugerem filopatria feminina e indícios de endogamia, reforçando os dados populacionais genéticos apresentados em estudos anteriores. A realização de estudos futuros com maior número de amostras e locos microsatélites seria interessante. Os resultados destacados intensificam as preocupações quanto à conservação desses golfinhos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, C. V. M. *et al.* Estrutura social e padrões de parentesco em botos-cinza (*Sotalia guianensis*) no estuário do rio Paraguaçu, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 31, n. 4, p. 819–826, 2014.

BÉRUBÉ, M.; PALSOLL, 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.

BICALHO, Aldo Marcello Costa. *O boto-cinza (Sotalia guianensis) no estuário dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, Sudeste do Brasil: ocorrência, uso do habitat, padrão comportamental e percepção da comunidade tradicional*. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

BOROBIA, Mônica *et al.* Distribution of the South American dolphin *Sotalia fluviatilis*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 69, n. 4, p. 1025–1039, 1991.

BOWEN, William D. Papel dos mamíferos marinhos em ecossistemas aquáticos. *Marine Ecology Progress Series*, v. 158, p. 267–274, 1997.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. (org.). *Molecular genetic analyses of populations: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1992. p. 225–269.

CARVALHO, V. L. *et al.* Saúde. In: CARVALHO, V. L.; MEIRELLES, A. C. O. (orgs.). *Boto-cinza: biologia e conservação no Brasil*. São Paulo: Bambu Editora e Artes Gráficas, 2020. p. 83–102.

CONNOR, R. C.; WELLS, R. S.; MANN, J.; READ, A. J. The bottlenose dolphin: social relationships in a fission–fusion society. In: MANN, J.; CONNOR, R. C.; TYACK, P. L.; WHITEHEAD, H. (Ed.). *Cetacean societies: field studies of dolphins and whales*. Chicago: University of Chicago Press, 2000. p. 91–126

DA SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. *Sotalia fluviatilis*. *Mammalian Species*, v. 527, p. 1–7, 1996.

DIAS, Laena Veloso. *Relação entre dados de monitoramento de encalhes de boto-cinza (Sotalia guianensis) e a pesca em parte da costa brasileira*. 2024. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, São Vicente, 2024.

DIZON, A. E.; SARKA, O. S.; PERRIN, W. F. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Report of the International Whaling Commission*, v. 13, p. 183–202, 1991.

EKAU, W.; KNOPPERS, B. Uma introdução ao sistema pelágico da plataforma Nordeste e Leste do Brasil. *Arquivo de Pesca e Pesquisa Marinha*, v. 47, p. 113–132, 1999.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FARIA, D. M.; DA SILVA J-R, J. M.; PIRES COSTA, L.; REZENDE PAIVA, S.; MARINO, C. L.; ROLLO JR, M. M.; BAKER, C. S.; FARRO, A. P. C. Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Plos One*, v. 15, n. 4, p. e0230660, 2020.

FARRO, A. P. C.; ROLLO, M. M.; SILVA-JR, J. M.; MARINO, C. L. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Conservation Genetics*, v. 9, n. 5, p. 1319–1321, 2008b.

FLORES, P. A. C. Tucuxi *Sotalia fluviatilis*. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. Cambridge: Academic Press, 2002. p. 1267–1269.

FRANKHAM, R. Desafios e oportunidades das abordagens genéticas para a conservação biológica. *Conservação Biológica*, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, 2010.

GEISE, L.; GOMES, N.; CERQUEIRA, R. Behaviour, habitat use and population size of *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Cetacea, Delphinidae) in the Cananéia estuary region, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, p. 183–194, 1999.

GRAVENA, W. *Isolamento e caracterização de marcadores microsatélites para análise de parentesco no boto-vermelho (Inia geoffrensis)*. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

GARIBOLDI, M. C. *et al.* Population Genetics of Franciscana Dolphins (*Pontoporia blainvillei*): Introducing a New Population from the Southern Edge of Their Distribution. *PLoS One*, v. 10, e0132854, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132854>.

GOUDET, J. FSTAT version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 11 ago. 2025.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Perfil dos municípios brasileiros: Espírito Santo*. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 17 jul. 2025.

INSTITUTO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (IEMA). *Relatório anual de qualidade ambiental do Espírito Santo – 2022*. Vitória: IEMA, 2022. Disponível em: <https://iema.es.gov.br>. Acesso em: 10 jun. 2025.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. *Clima no Brasil: dados históricos de temperatura e precipitação*. Brasília: INMET, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inmet>. Acesso em: 17 jul. 2025.

INSTITUTO BOTO CINZA. *Boto-cinza (Sotalia guianensis)*. Disponível em: <https://www.institutobotocinza.org>. Acesso em: 10 jun. 2025.

IUCN – INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. *The IUCN Red List of Threatened Species: Sotalia guianensis*. 2024. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 jun. 2025.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II – Mamíferos*. Brasília: ICMBio, 2018. 622 p.

JONES, O. R.; WANG, J. Colony: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 3, p. 551–555, 2010.

KALINOWSKI, S. T. *et al.* ML-Relate: um programa de computador para estimativa de máxima verossimilhança de parentesco e relacionamento. *Notas de Ecologia Molecular*, v. 6, n. 2, p. 576–579, 2006.

KONRAD, C. M. *et al.* Kinship influences sperm whale social organization within, but generally not among, social units. *Royal Society Open Science*, v. 5, n. 8, p. 180914, 2018.

MACHADO, Bruna Bergman *et al.* Uso de hábitat do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na foz do Rio Doce–ES, após o rompimento da barragem de Fundão. 2024.

MENDES, Fábio Ribeiro. *Estrutura genética populacional do boto-cinza (Sotalia guianensis, Van Bénéden 1864) do litoral sul da Bahia e do Espírito Santo*. 2019. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

OLIVEIRA, Vanessa Kuboyama Marques de. *Relação de parentesco de uma população isolada de toninha (Pontoporia blainvillei, Gervais & D’Orbigny, 1844) no Brasil, Sudoeste do Oceano Atlântico*. 2023.

PAITACH, Renan Lopes *et al.* Ecologia alimentar e espacial da toninha (*Pontoporia blainvillei*) e do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) na Baía da Babitonga, Sul do Brasil. 2015.

PICHLER, F. B. *et al.* Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Molecular Ecology*, v. 10, n. 9, p. 2215–2223, 2001.

PINHEIRO, Flavia Carnelli Frizzera. *Padrões de uso de habitat do boto-cinza (Sotalia guianensis) na região da foz do rio Doce, costa norte do Espírito Santo, Sudoeste do Brasil*. 2014.

PEREIRA, Manoela da Silva. *Relação de parentesco dos golfinhos rotadores (Stenella longirostris) do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE, Brasil*. 2023. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2023.

PMBA - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I - Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente (2024) - Relatório Anual de Evolução (RA2023 - RT46) - Material Suplementar - Tema Cetáceos, disponível em: <https://flacso.org.br/projetos/gerenciador-cif-camaras-tecnicas/>

ROSAS, Fernando C. Weber; MONTEIRO-FILHO, Emygdio L. A. Reprodução do boto-estuarino (*Sotalia guianensis*) no litoral do Paraná, sul do Brasil. *Jornal de Mamíferos*, v. 83, n. 2, p. 507–515, 2002.

RAMOS, R. M. A.; DI BENEDITO, A. P. M.; LIMA, N. R. W. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia guianensis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Mammals*, v. 26, p. 65–75, 2000.

RICHARD, K. R.; MCCARREY, S. W.; WRIGHT, J. M. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Canadian Journal of Zoology*, v. 72, n. 5, p. 873–877, 1994.

REBLIN, R. D. *Diversidade e estruturação genética do boto-cinza (Sotalia guianensis, Van Bénéden 1864) no litoral do Espírito Santo*. 2016. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2016.

RICHARD, K. R. *et al.* DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Canadian Journal of Zoology*, v. 72, n. 5, p. 873–877, 1994.

SARANO, F. *et al.* Kin relationships in cultural species of the marine realm: case study of a matrilineal social group of sperm whales off Mauritius island, Indian Ocean. *Royal Society Open Science*, v. 8, n. 9, p. 210604, 2021.

RODRIGUES, Vitor Leonardo Amaral. *Dieta e ecologia alimentar do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetartiodactyla: Delphinidae) na região do banco dos Abrolhos, Costa Central do Brasil*. 2014.

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

TORRES, Nerelle Vital da Silva *et al.* Hábitos alimentares do boto-cinza (*Sotalia guianensis*, Van Bénéden, 1864) (Cetacea: Delphinidae) nas baías de Sepetiba e da Ilha Grande (RJ). 2023.

VAN OOSTERHOUT, C. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

WILSON, A. C. *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 26, n. 4, p. 375–400, 1985.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Anexo 1. Tabela com os resultados dos cinco locos microssatélites avaliados (Sgui 003, Sgui 017, Sgui 018, GATA98, MK6) para se determinar diversidade genética do boto-cinza na área atingida pelo rejeito de minério de Fundão (PMBA, 2024). Número de alelos (K), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), riqueza alélica (Ra), índice de endogamia (FIS).

Loco	K	Ho	He	PIC	Ra	FIS
Sgui 0003	8	0,453	0,778	0,781	0,781	0,421
Sgui 017	9	0,618	0,818	0,819	8,859	0,246
Sgui 018	9	0,694	0,732	0,732	8,629	0,052
GATA98	6	0,306	0,703	0,63	6	0,564
MK6	9	0,432	0,855	0,832	8,995	0,496
Média	8,2	0,501	0,777	0,7588	8,0464	0,357

Anexo 2. Relação dos indivíduos nas relações de parentesco evidenciadas neste estudo, juntamente com suas respectivas identificações genéticas, datas de encalhe, localidades, sexos e faixas etárias.

IND	Data de encalhe	Localidade	Sexo	Faixa etária
SOT505	01/07/2023	Anchieta	Indeterminado	Indeterminado
SOT467	18/04/2022	Aracruz	Fêmea	Adulto
E729	28/10/2021	Linhares	Fêmea	Adulto
E742	04/08/2022	São Mateus	Fêmea	Juvenil
SOT492	04/12/2023	Guarapari	Fêmea	Adulto
SOT502	14/06/2023	Vila velha	Macho	Adulto
E765	25/08/2023	Linhares	Fêmea	Adulto
E744	13/04/2022	São Mateus	Fêmea	Adulto
E758	29/07/2022	São Mateus	Macho	Juvenil
E760	31/07/2022	São Mateus	Macho	Adulto
SOT499	06/01/2023	Presidente Kennedy	Macho	Adulto
E736	13/02/2022	São Mateus	Fêmea	Juvenil
SOT487	03/11/2023	Fundão	Fêmea	Adulto
SOT498	16/05/2023	Serra	Fêmea	Adulto
SOT491	04/06/2023	Serra	Fêmea	Adulto
SOT458	25/02/2022	Marataízes	Macho	Juvenil
SOT468	05/07/2022	Serra	Macho	Juvenil
SOT473	09/04/2022	Guarapari	Macho	Adulto
SOT454	01/03/2022	Aracruz	Macho	Juvenil
SOT455	26/01/2022	Presidente Kennedy	Fêmea	Adulto
SOT452	28/12/2021	Aracruz	Fêmea	Adulto
SOT453	28/12/2021	Aracruz	Fêmea	Filhote
SOT501	13/06/2023	Anchieta	Macho	Adulto
SOT502	14/06/2023	Vila velha	Macho	Juvenil
SOT469	28/05/2022	Presidente Kennedy	Fêmea	Adulto
SOT470	28/05/2022	Presidente Kennedy	Fêmea	Adulto