

**SERVIÇOS DE AVALIAÇÃO DA
INTERFERÊNCIA DA ATIVIDADE DE E&P NO
PÓLO PRÉ-SAL DA BACIA DE SANTOS
SOBRE AS AVES, QUELÔNIOS E
MAMÍFEROS MARINHOS E ESTRUTURAÇÃO
DA REDE DE ATENDIMENTO
VETERINÁRIO NO LITORAL DE ESTADOS DO
SUDESTE E SUL DO BRASIL**

**Protocolos de Atividades
5 - Triagem de Conteúdos Gastrointestinais**

Volume 01

BR 00000000/00

Revisão 03
JUNHO / 2017



E&P

CONTROLE DE REVISÕES – BR00000000/00

[illegible]

	Original	Rev. 01	Rev. 02	Rev. 03	Rev. 04	Rev. 05	Rev. 06	Rev. 07	Rev. 08
Data	05/08/2015	30/10/2015	16/03/2016	26/06/2017					
Elaboração	Coletiva	Coletiva	A. Barreto / M. Carrion	A. Barreto / M. Carrion					
Verificação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto					
Aprovação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	Petrobras					

ÍNDICE GERAL

FIGURAS	7
ANEXO	8
I - ESCOPO DESTE PROTOCOLO.....	9
II - PREPARAÇÃO PARA A ATIVIDADE	10
II.1 - Equipamentos necessários para necropsia	10
II.2 - Equipamentos para documentação:	10
II.3 - Equipamentos de proteção individual para necropsia:	11
III - COLETA DO TRATO DIGESTIVO	12
III.1 - Em campo.....	12
III.2 - Em laboratório	13
III.3 - Separação dos itens alimentares.....	14
III.4 - Análise dos intestinos	16
III.5 - Identificação e análise	17
IV - ENCERRAMENTO DA ATIVIDADE	19
V - BIBLIOGRAFIA.....	20
VI - GLOSSÁRIO	22
VII - ANEXOS	23
VII.1 - Receitas para soluções fixadoras	23
VII.1.1 - Formalina neutra tamponada à 10%	23
VII.1.2 - Solução de formol acético – AFA	23
VIII - COLABORADORES.....	24
IX - EQUIPE TÉCNICA.....	25

FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura III.1-1 - Estômago coletado de um exemplar de <i>Sotalia guianensis</i> .	12
Figura III.3-1 – Exemplos de otólitos de teleósteos: (A) <i>Isopisthus parvipinnis</i> ; (B) <i>Centropomum paralelus</i> ; (C) <i>Pomatomus saltatrix</i> ; (D) <i>Scomberomus cavalla</i> . Fonte: LIBGeo/UNIVALI.	15
Figura III.3-2 – Exemplos de bicos de cefalópodes: (A) <i>Gonatus antarcticus</i> ; (B) <i>Histioteuthis atlantica</i> . Fonte: Xavier e Cherel (2009).	16

ANEXO

VII.1 - Receitas para soluções fixadoras

I - ESCOPO DESTE PROTOCOLO

Este documento tem como finalidade orientar os participantes do Projeto de Monitoramento de Praia da Bacia de Santos (PMP-BS) no desenvolvimento das atividades previstas no projeto executivo do mesmo. O Projeto Executivo do Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) foi elaborado considerando as orientações contidas no Termo de Referência CGPEG/DILIC/IBAMA Nº 002/13 - “Termo de Referência para Elaboração do Estudo de Impacto Ambiental – EIA e Respectivo Relatório de Impacto Ambiental - RIMA para a Produção e Escoamento de Petróleo e Gás Natural do Polo Pré-Sal da Bacia de Santos – Etapa 2” e nos Pareceres Técnicos Nº 122/2014 e 343/2014.

As equipes que executam as atividades devem seguir os procedimentos aqui descritos para garantir a qualidade e homogeneidade das informações coletadas, e assim permitir análises integradas confiáveis.

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. A listagem completa dos pesquisadores que contribuíram com este protocolo se encontra no final do documento.

Este documento não deve ser utilizado em atividades alheias ao PMP-BS, uma vez que foi concebido com foco nas especificidades deste projeto. O uso deste documento como fonte de referência para trabalhos acadêmicos deve ser evitado e recomenda-se que sejam utilizadas as fontes de referência indicadas.

II - PREPARAÇÃO PARA A ATIVIDADE

Antes de se iniciar a análise do conteúdo gastrointestinal, devem ser separados os equipamentos necessários para a função, para garantir o bom andamento da atividade.

II.1 - Equipamentos necessários para necropsia

A coleta do conteúdo gastrointestinal deve ser realizada durante a necropsia do animal, sendo portanto necessários todos os equipamentos já listados no “Protocolos de Atividades 4 – Atendimento veterinário aos animais mortos: Necropsias”. Entretanto, o manuseio e armazenamento dos itens coletados exigem que sejam acrescentados àquela lista os seguintes equipamentos:

- Pinças de relojoeiro
- Potes de vidro
- Glicerina
- Peneiras
- Bandejas ou bacias (evitar as de cor branca)
- Pincel ponta fina
- Detergente neutro
- Organizador para guardar as amostras

II.2 - Equipamentos para documentação:

- Câmera fotográfica (conferir bateria e cartão de memória)
- Ficha de necropsia (inclui fichas de exame externo e material colhido)
- Ficha de biometria
- Lápis, caneta, apontador, borracha
- Marcador permanente
- Réguas
- Fita métrica
- Paquímetro
- Material de fundo para fotografia

- Papel vegetal

II.3 - Equipamentos de proteção individual para necropsia:

- Botas de cano longo
- Macacão ou conjunto para necropsia
- Avental ou jardineira pescador
- Luvas de látex descartáveis
- Luvas nitrílicas descartáveis
- Óculos de proteção em acrílico
- Máscara pff-2 ou n-95

III - COLETA DO TRATO DIGESTIVO

III.1 - Em campo

No caso de ser feita a necropsia em campo (animais maiores que 3m), depois que os órgãos internos forem retirados da cavidade abdominal, deve-se amarrar a porção inicial do estômago, próxima ao esôfago, e a sua porção terminal, que se comunica com o intestino (Figura III.1-1), com fio de nylon, barbante ou similar, separando-o dos demais órgãos através de incisões nestas regiões. Sempre que possível, os órgãos deverão ser analisados logo em seguida, caso isso não seja possível o estômago pode ser mantido congelado, dentro de saco plástico com a devida identificação. Para facilitar a identificação do material congelado, recomenda-se a utilização de duas etiquetas e dois sacos plásticos. O estômago é colocado dentro de um saco plástico com a primeira etiqueta, e todo este conjunto é novamente ensacado, com uma nova etiqueta. Isto permite a leitura desta etiqueta após o congelamento, enquanto que a segunda, interna, garante a identificação do material, mesmo que o saco mais externo se rompa.

Para a triagem, os órgãos que foram congelados deverão ser primeiramente descongelados. Outra opção é preservar o material em álcool 70%. Neste caso é preciso cuidado com o tamanho do recipiente, considerando que o estômago pode “inchar” um pouco, podendo, por exemplo quebrar frascos de vidro.



Figura III.1-1 - Estômago coletado de um exemplar de *Sotalia guianensis*.

III.2 - Em laboratório

Quando o animal for trazido para laboratório, durante a necropsia deverá ser amarrado um barbante no final do esôfago e outro no início do intestino para a separação do estômago. Outro barbante deverá ser amarrado nas extremidades do intestino para a sua separação. Em seguida os órgãos devem ser removidos da cavidade abdominal e o estômago deve ser pesado, ainda com conteúdo, para depois esvaziá-lo.

O estômago pode então ser aberto, iniciando o corte pela porção próxima ao esôfago e seguindo até a porção terminal para a realização de uma avaliação geral do conteúdo. Nessa etapa é importante verificar se há ou não presença de conteúdo alimentar, bem como indicativos de interação antrópica tais como óleo ou outros resíduos (lixo). Em casos de presença de lixo ou outros resíduos sólidos provenientes de interações antrópicas, deve-se calcular a porcentagem de ocupação do órgão por estes itens (até 25%; de 25% a 50%; de 50% a 75%; de 75% a 100%).

Ao longo deste procedimento, deverá ser avaliada visualmente a condição de saúde do órgão, registrando a presença de lesões no estômago. Também é importante observar se há parasitas e o nível de infestação (discreto, moderado ou acentuado).

Em seguida, o conteúdo estomacal pode ser congelado ou depositado em um recipiente com álcool 70% para análise posterior (Di Benedito et al. 2001). Os dois procedimentos são válidos e a escolha entre eles vai depender da infraestrutura do local em que o estudo está sendo desenvolvido.

As demais etapas podem ser realizadas conforme interesse das instituições em desenvolver um trabalho específico sobre caracterização de dieta, o qual demanda tempo considerável e pesquisadores treinados, visto que no momento da necropsia torna-se pouco viável a realização desse procedimento.

Especificamente para tartarugas-verde, *Chelonia mydas*, à princípio poderá ser registrado apenas o peso úmido total do conteúdo estomacal.

III.3 - Separação dos itens alimentares

A triagem do material consiste em separar as estruturas que podem ser utilizadas para a identificação dos itens alimentares consumidos. Para a triagem do conteúdo este deve ser lavado sob água corrente sobre um jogo de três peneiras de aço com malhas de 2mm, 1mm e 0,5mm.. Em seguida, cada peneira deverá ser minuciosamente vasculhada para a recuperação de estruturas mais resistentes à digestão, como otólitos de teleósteos, bicos de cefalópodes, carapaças de crustáceos e fragmentos de moluscos. Outra opção válida é lavar o conteúdo sob água corrente em uma peneira de malha fina, apoiada sob uma bandeja e então coletar os itens mais resistentes ao processo de digestão. As presas encontradas semi digeridas devem ser conservadas individualmente em álcool 70% (Di Benedito et al. 2001).

O material deverá ser separado por grupo taxonômico para sua conservação, sendo etiquetados por estômago com papel vegetal. Esta etiqueta deve ser escrita a lápis, incluindo o código do animal, espécie e data de coleta.

Os otólitos (*Figura III.3-1*) encontrados desarticulados precisam ser lavados (delicadamente) com detergente neutro e um pincel de ponta fina, para retirada do excesso de gordura e então conservados a seco. Carapaças de crustáceos, penas e os bicos de cefalópodes (*Figura III.3-2*) também deverão ser conservados em álcool 70%, com glicerina para mantê-los hidratados (Leite 2002).

Macroalgas, fanerógamas marinhas e outros materiais de origem vegetal deverão ser conservados em álcool 70%.

Os parasitas deverão ser fixados em AFA (ver anexo) e encaminhados para identificação.

O material de origem antrópica deverá ser separado por indivíduo, lavado, seco e conservado à seco em sacos plásticos devidamente identificados (código do animal, espécie e data de coleta). Para fins do presente protocolo, as informações necessárias sobre interação antrópica estão restritas à identificação da presença de resíduos, sua localização e porcentagem de ocupação no trato digestório. Caso seja de interesse da instituição desenvolver trabalhos específicos sobre interação antrópica, o material encontrado pode ser coletado e conservado

em álcool 70%. Posteriormente, esse material deve ser seco, classificado, quantificado e pesado.

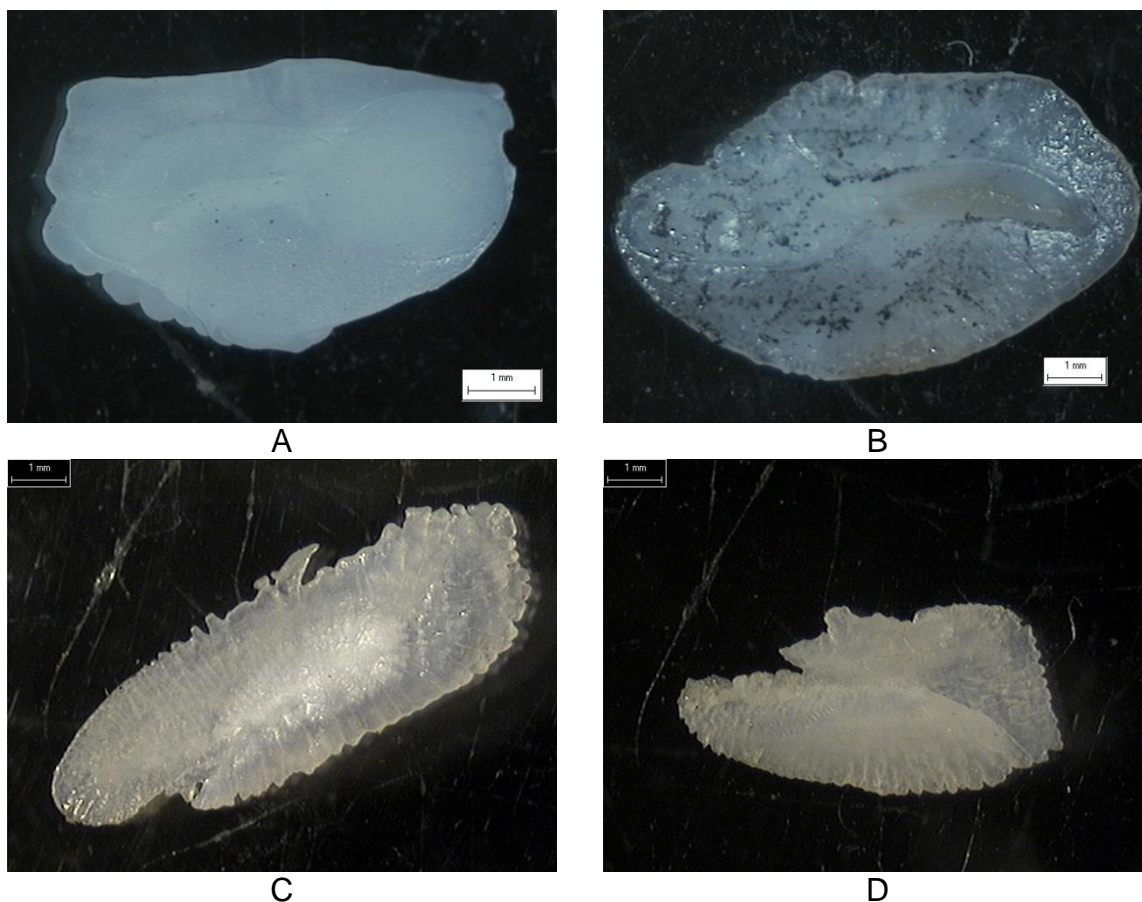


Figura III.3-1 – Exemplos de otólitos de teleósteos: (A) *Isopisthus parvipinnis*; (B) *Centropomum paralelus*; (C) *Pomatomus saltatrix*; (D) *Scomberomus cavalla*. Fonte: LIBGeo/UNIVALI

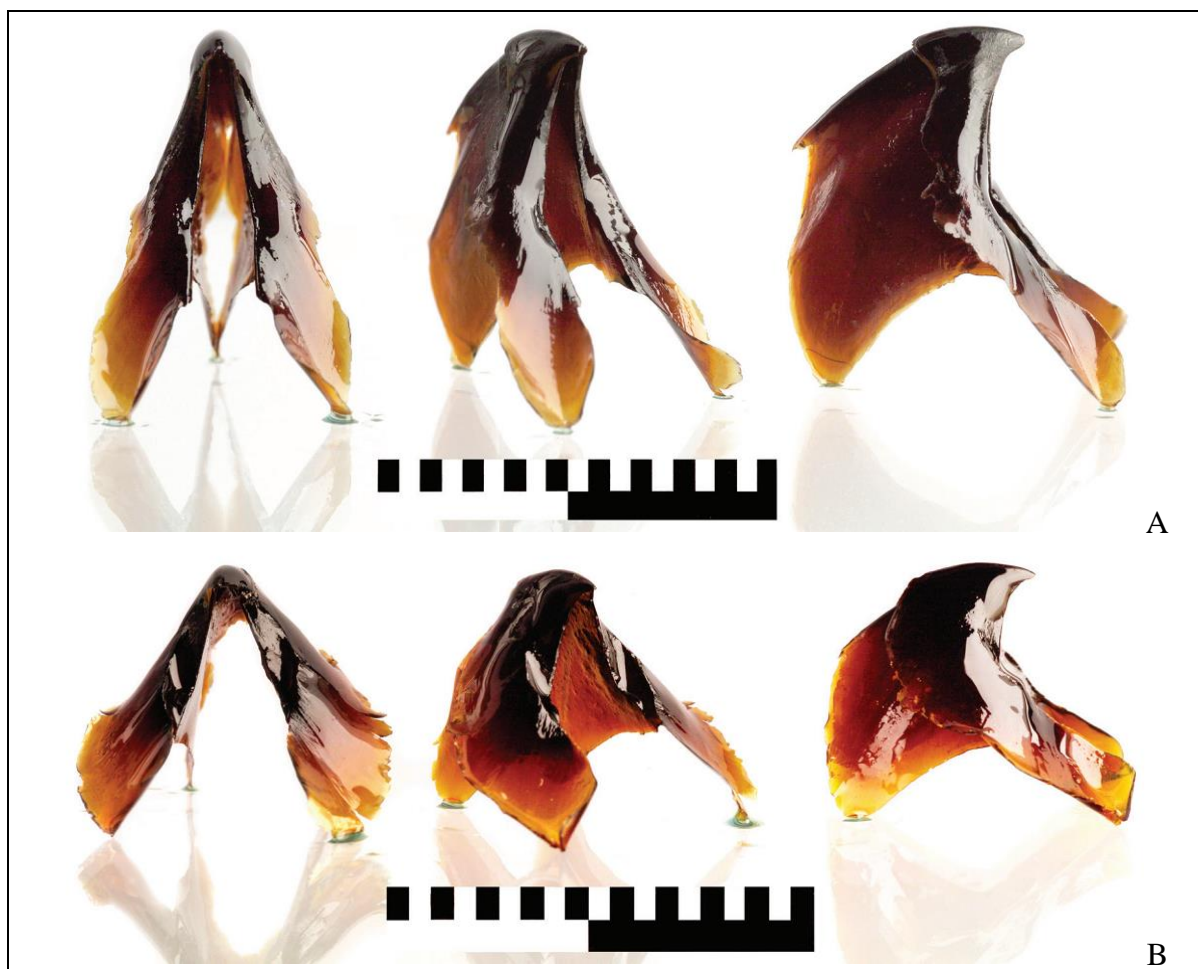


Figura III.3-2 – Exemplos de bicos de cefalópodes: (A) *Gonatus antarcticus*; (B) *Histioteuthis atlantica*. Fonte: Xavier e Chereil (2009).

III.4 - Análise dos intestinos

A análise dos intestinos deverá ser feita prioritariamente para verificar a incidência de parasitos. Ao longo do procedimento também deverá ser avaliada visualmente a condição de saúde do órgão. Para a triagem os intestinos congelados deverão primeiramente ser descongelados. O mesentério deverá ser seccionado para medição do comprimento total do intestino. No caso de *P. blainvillei*, o intestino deverá ser dividido em delgado e grosso. O intestino delgado deverá ser dividido em cinco partes iguais, sendo cada parte novamente subdividida em três partes iguais. Somente a primeira porção de cada subparte deverá ser analisada, seguindo o método de Andrade (1996). O intestino grosso deverá ser analisado por completo. Para as outras espécies de mamíferos, aves e

tartarugas o intestino deverá ser dividido em três partes iguais e cada uma deverá ser analisada por completo.

Todas as partes analisadas deverão ser abertas longitudinalmente com tesoura cirúrgica dentro de uma bandeja plástica. O conteúdo deve ser lavado sobre uma peneira de malha 150µm.

Todos os parasitas coletados devem ser armazenados em álcool 70% ou AFA (ver Anexo VII.1 -). Para a identificação, os parasitas devem ser enviados para especialistas. Os parasitas devem ser quantificados por táxon e por indivíduo analisado, calculando a frequência numérica de cada táxon. As amostras não devem ser descartadas, sendo mantidas em frascos com tampa de rosca para conferência futura.

III.5 - Identificação e análise

Após o conteúdo ser triado, pode-se dar início à etapa mais demorada do processo de caracterização da dieta de um animal, que consiste na identificação dos itens alimentares consumidos. Presas em início de digestão e que não apresentam as características externas danificadas, deverão ser identificadas ao menor nível taxonômico possível, com o auxílio de lupa e com base na literatura específica (ABILHÔA; CORRÊA, 1992; CORRÊA; VIANNA, 1992; LEMOS et al., 1992; LEMOS et al., 1995a, 1995b; XAVIER; CHEREL, 2009), assim como coleções de referência das instituições. Já os demais itens, só podem ser identificados a partir da recuperação de estruturas encontradas desarticuladas no conteúdo, como os otólitos, bicos de lulas e cefalotórax de camarões. Por isso é importante a consulta e/ou montagem de coleções de referência das espécies de presas potenciais que se distribuem ao longo da área de ocorrência dos grupos populacionais estudados (Di Benedito et al. 2001).

Os otólitos são concreções de cálcio que ficam localizadas no ouvido interno dos peixes ósseos e de outros vertebrados e estão relacionados com as funções de equilíbrio e audição (Bastos 1990). Essas estruturas aparecem em três pares de corpos simétricos: *sagitta*, *lapillus* e *asteriscus* (FICHT; BROWNELL 1968) e devido à sua constituição química, mais resistente ao processo de digestão, são frequentemente encontrados no estômago, intestino e bolo fecal de espécies ictiófagas (Morrow 1979). Em geral, os otólitos *sagitta* são mais adequados aos

estudos sobre hábito alimentar em piscívoros, por serem maiores que os demais e apresentarem características morfométricas distintas para cada espécie, com exceção dos bagres *Cathorops spixii*, para os quais é indicado o uso do *lapillus* (FUCHS; VOLPEDO, 2009).

Na análise dos dados, as presas deverão ser quantificadas. Para tanto, os bicos de cefalópodes e otólitos deverão ser pareados, e deverá ser contabilizado levando em conta o lado (direito ou esquerdo) mais numeroso dos otólitos ou bicos de cefalópodes de cada espécie.

As macroalgas, gramas marinhas e propágulos de mangue deverão ser separados por táxon. A identificação deverá ser realizada com auxílio de lupa e microscópio, com base em chaves de identificação e auxílio de especialistas. As macroalgas e fanerógamas deverão ser agrupadas por táxon e calculado o volume deslocado.

Os parasitas deverão ser fixados em AFA (ver anexo) e encaminhados para identificação.

Os crustáceos e moluscos bivalves e gastrópodes deverão ser identificados com base na literatura e, sempre que possível, quantificados.

O material de origem antrópica deverá ser classificado, quantificado e pesado para cada indivíduo. Todos os itens devem ser contabilizados e pesados (g) com auxílio de balança digital com precisão de duas casas decimais.

IV - ENCERRAMENTO DA ATIVIDADE

Verificar se todas as amostras estão acondicionadas como previsto neste protocolo e se estão devidamente identificadas com o número do Identificador do Indivíduo ou do Identificador da Ocorrência (gerados pelo sistema gerenciador de dados do PMP-BS - SIMBA), além de espécie e data.

Preencher o campo “Triagem detalhada do conteúdo gastrointestinal.” na ficha de Exame Anatomopatológico com os principais achados.

O procedimento de descarte dos materiais utilizados durante a necropsia, juntamente com o material biológico devem ser descartados seguindo o “Protocolos de Atividades 4 – Atendimento veterinário aos animais mortos: Necropsias”. A carcaça, vísceras e equipamentos descartáveis como luvas, aventais e máscaras, devem ser destinados para a coleta de resíduos hospitalares por empresa especializada. Toda e qualquer carcaça animal, esteja ela contaminada com agentes patogênicos ou não, é considerada pela Resolução n. 5, de 5 de agosto de 1993 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) como resíduo sólido do Grupo A. Estes resíduos “apresentam risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente devido a presença de agentes biológicos” (CONAMA, 1993). As instituições executoras devem possuir contrato com empresa que recolha e destine apropriadamente esse material.

V - BIBLIOGRAFIA

ABILHÔA, V.; CORRÊA, M. F. M. Catálogo de Otólitos de Carangidae (Osteichthyes-Perciformes) do Litoral do Estado do Paraná, Brasil.. **Neritica**, v. 7, n.1, p. 119-131, 1992.

ANDRADE, A.L.V. **Comunidade componente de helmintos gastrointestinais da Franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), no Rio Grande do Sul, Brasil, e sua utilização como marcador biológico na identificação de estoques.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Oceanografia Biológica). Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Brasil. 1996.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO CONAMA nº 5, de 5 de agosto de 1993** Publicada no DOU n. 166, de 31 de agosto de 1993, Seção 1, p.12996-12998. 1993

CORRÊA, M. F. M.; VIANNA, M. S. . Catálogo de Otólitos de Sciaenidae (Osteichthyes-Perciformes) do Litoral do Estado do Paraná, Brasil.. **Neritica**, v. 7, n.1, p. 13-41, 1992.

DI BENEDITTO, A. P. M.; REZENDE, C.E.; MONTEIRO, L.R. **Guia para estudo de cetáceos: Métodos para análise de hábito alimentar.** Campos dos Goytacazes, Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007. 34p.

FUCHS, D. V.; VOLPEDO, A. V. Morfología de Lapillus de Siluriformes Paranoplatenses. **Biología Acuática**, v. 26, n. 1, p. 97-108, 2009.

LEMOS, P. H. B.; CORRÊA, M. F. M. ; ABILHÔA, V. . Catálogo de Otólitos de Gerreidae (Osteichthyes-Perciformes) do Litoral do Estado do Paraná, Brasil.. **Neritica**, v. 7, n.1, p. 109-117, 1992.

LEMOS, P. H. B.; CORRÊA, M. F. M.; PINHEIRO, P. C. Catálogo de otólitos de Clupeidae (Clupeiformes-Osteichthyes) do litoral do Estado do Paraná. Brasil.. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 3, p. 747-759. 1995.

LEMOS, P. H. B.; CORRÊA, M. F. M.; PINHEIRO, P. C.. Catálogo de otólitos de Engraulidae (Clupeiformes-Osteichthyes) do litoral do Estado do Paraná, Brasil.. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.3, p. 731-745, 1995.

XAVIER J.C.; CHEREL, Y. **Cephalopod Beak Guide For The Southern Ocean**. Cambridge: British Antarctic Survey. 129pp. 2009.

VI - GLOSSÁRIO

Para fins deste protocolo são consideradas as seguintes definições:

Necropsia	Exame de um cadáver com o objetivo de verificar alterações patológicas que resultaram na morte do animal.
Conteúdo estomacal	Itens existentes dentro do estômago dos animais, do esfíncter esofágico inferior ao esfíncter pilórico. Em alguns casos, na ausência de esfíncter funcional que separe o estômago do intestino, deve ser considerado o “conteúdo gastrointestinal” para fins de análise.

VII - ANEXOS

VII.1 - *Receitas para soluções fixadoras*

VII.1.1 - *Formalina neutra tamponada à 10%*

Para cada litro de solução utilize

100ml de formalina (solução comercial)

900ml de H₂O

4g de Fosfato de sódio monobásico

6,5g de Fosfato de sódio dibásico

VII.1.2 - *Solução de formol acético – AFA*

Esta solução deve ser utilizada para fixação de helmintos.

50 ml de Álcool à 95%

10 ml de Formol

2 ml de Ácido Acético Glacial

40 ml de Água destilada

Na ausência de AFA os helmintos podem ser conservados em álcool aquoso à 70%.

VIII - COLABORADORES

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. Neste documento contribuíram os seguintes profissionais

André S. Barreto (org.)

Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI

Kelly Pansard

ECOMAR: grupo de pesquisa e conservação de mamíferos aquáticos

Lisa Vasconcelos de Oliveira

Instituto de Pesquisas Cananéia

Marta J. Cremer

Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

IX - EQUIPE TÉCNICA***Equipe da UNIVALI***

Profissional	André S. Barreto
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	21.500/03-D
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	358880
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI -----

Profissional	Mariana Carrion
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	95368/03
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI -----