

**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**

**8 - Coleta, armazenamento e envio de amostras para análises  
de contaminantes, biomarcadores e *fingerprint***

**Volume 01**

**BR 00000000/00**

**Revisão 03**

**JUNHO / 2017**



**E&P**

**CONTROLE DE REVISÕES – BR 00000000/00**[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	Coletiva					
Verificação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto					
Aprovação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	Petrobras					

## **ÍNDICE GERAL**

FIGURAS.....	5
I - ESCOPO DESTE PROTOCOLO.....	6
II - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	7
II.1. Priorização de coleta de material biológico e de realização de análises laboratoriais .....	8
III - BIOMARCADORES .....	9
III.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES.....	9
III.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas .....	9
III.1.2 - Reagentes químicos para a atividade de dissecação dos animais .....	10
III.1.3 - Procedimento de limpeza e identificação do material utilizado para a dissecação dos animais .....	11
III.2 - COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS.....	13
III.2.1 - Tecidos biológicos de mamíferos marinhos .....	13
III.2.2 - Tecidos biológicos de quelônios marinhos.....	18
III.2.3 - Tecidos biológicos de aves marinhas .....	21
IV - HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)..	23
IV.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES.....	23
IV.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas .....	23
IV.1.2 - Procedimento de limpeza e identificação do material utilizado para a dissecação dos animais .....	23
IV.2 - COLETA DE AMOSTRAS.....	24
IV.2.1 - Tecidos biológicos de tetrápodes marinhos.....	25
IV.3 - Considerações importantes.....	26
V - ELEMENTOS TRAÇO.....	28
V.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES.....	28
V.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas para análise de elementos traço.....	28
V.1.2 - Procedimento de limpeza do material utilizado para a dissecação dos animais .....	28

V.2 - COLETA DE AMOSTRAS .....	29
V.2.1 - Tecidos biológicos de tetrápodes marinhos .....	29
VI - FINGERPRINT .....	31
VI.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES .....	31
VI.1.1 - Materiais para obtenção das amostras de resíduos oleosos... 31	
VI.2 - COLETA DE AMOSTRAS .....	31
VI.2.1 - Amostra de óleo ou borra oleosa coletada em praias ou animais .....	31
VI.2.2 - Amostra de óleo em corpos d'água .....	32
VII - IDENTIFICAÇÃO E DOCUMENTO DE CUSTÓDIA DAS AMOSTRAS .....	33
VIII - ENVIO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE .....	34
VIII - RISCOS ASSOCIADOS ÀS TÉCNICAS, À SAÚDE E AO MEIO AMBIENTE .....	35
IX - BIBLIOGRAFIA .....	38
X - GLOSSÁRIO .....	41
XI - ANEXO .....	42
XI.1 - Ficha de Custódia PMP-BS .....	42
XII - COLABORADORES.....	43
XIII - EQUIPE TÉCNICA.....	44

## FIGURAS

FIGURAS	PÁG.
<b>Figura II.1</b> – Modelo de criotubo com capacidade de 2 mL e Modelo de caixa de armazenamento, ou “rack”, para tubos criogênicos	9
<b>Figura II.2</b> – Imagem ilustrativa de criotubos acondicionados no gelo antes do início da dissecação. Os criotubos podem estar diretamente em contato com o gelo.	11
<b>Figura III.1</b> – Exemplo da localização para coleta de pele de cetáceos para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares.	13
<b>Figura III.2</b> - Pequeno cetáceo em posição lateral recumbente. Detalhe de necropsia de pele.	14
<b>Figura III.3</b> - Separação de pele e gordura.	14
<b>Figura III.4</b> - Pinípede em posição dorsal recumbente evidenciando cortes durante necropsia.	15
<b>Figura III.5</b> - Sirênio em posição dorsal recumbente mostrando início da necropsia.	15
<b>Figura III.6</b> - Fígado removido de carcaça de toninha, <i>Pontoporia blainvillei</i> . Órgão aparentemente bilobado (setas) e diafragma (asterisco) de toninha, <i>Pontoporia blainvillei</i> . A seta amarela indica a veia porta. Os círculos indicam áreas que podem ser amostradas.	16
<b>Figura III.7</b> - Coleta de pele de tartaruga, realizada na extremidade da nadadeira	18
<b>Figura III.8</b> - Necropsia de tartaruga verde.	19
<b>Figura III.9</b> - Fotografia mostrando a localização de alguns órgãos abdominais de pinguim. Em destaque a localização da região adequada para a coleta da amostra de fígado.	21
<b>Figura IV.1</b> – Frascos de alumínio para acondicionamento de amostras para análise de HPA: (a) visão da tampa mostrando o anel de vedação; (b) modo de utilização de papel de alumínio para evitar contato da amostra com a tampa.	23

## ***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 encontra-se 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 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

As atividades fundamentais que precedem a realização de análises laboratoriais de contaminantes (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), e elementos traço) e biomarcadores (bioquímicos e moleculares) em tetrápodes marinhos coletados no PMP-BS compreendem a amostragem dos tecidos dos animais, incluindo medidas de biossegurança, materiais, equipamentos e reagentes necessários, bem como preparação dos materiais, escolha do tecido, cuidados na dissecação, preservação e armazenamento das amostras, acondicionamento para transporte e custódia das amostras.

Todos os cuidados nas etapas de amostragem, preservação, acondicionamento, armazenamento e transporte são cruciais para a manutenção da integridade do material biológico a ser analisado. Entende-se como amostra biológica íntegra aquela obtida em quantidade suficiente, armazenada em recipiente específico e em condições adequadas, bem identificada e transportada de forma a preservar suas características biológicas para a realização de análises posteriores.

Além disso, as amostras ambientais podem apresentar HPA e elementos traço em baixas concentrações (partes por milhão ou por bilhão), o que torna fundamental todo cuidado durante o procedimento de coleta e armazenamento. Qualquer desvio do procedimento pode se tornar uma fonte de contaminação das amostras e invalidar os resultados de análise. Uma vez que para cada tipo de contaminante existem peculiaridades nos materiais, deve-se referir às seções abaixo de acordo com o contaminante a ser coletado. Independente do contaminante, todas as amostras devem ser coletadas utilizando material esterilizado e/ou descontaminado.

## ***II.1. Priorização de coleta de material biológico e de realização de análises laboratoriais***

Com base nos objetivos do PMP-BS e, nos casos em que não houver material biológico (tecido hepático) suficiente para a realização de todas as análises laboratoriais, deve-se seguir a seguinte ordem de prioridades:

- 1º) HPA
- 2º) Biomarcadores
- 3º) Elementos traço

Vale destacar que sempre que houver coleta de amostras para análise de HPA, obrigatoriamente deverá haver coleta de amostras para análises histopatológicas.

Além disso, no momento da execução da necropsia, deve-se primeiramente coletar tecido destinado à realização de análise de biomarcadores, tendo em vista que o tecido hepático será o tecido alvo para todas as análises laboratoriais previstas no âmbito do PMP-BS e, ainda, considerando a necessidade de seu congelamento imediato com nitrogênio líquido no caso de sua destinação para análise de biomarcadores.

Ressalta-se que, embora o armazenamento de qualquer material biológico em nitrogênio líquido possa ser uma alternativa para as unidades que não possuam ultrafreezer (armazenamento a -80°C), para o caso de tecido destinado à análise de biomarcadores, seu congelamento imediato com nitrogênio líquido é um procedimento obrigatório.



### **III - BIOMARCADORES**

#### **III.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES**

##### **III.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas**

- Pelo menos dois containers para armazenamento de nitrogênio líquido;
- Jalecos confeccionados em algodão;
- Luva criogênica para manuseio de nitrogênio líquido;
- Óculos de segurança com lente incolor e proteção lateral para manuseio de nitrogênio líquido;
- Luvas nitrílicas sem talco descartáveis;
- Caixa plástica de ferramentas (55 cm x 23,5 cm) com material geral e cirúrgico descontaminado\* para dissecação:
  - Estojos de inox lisos da dimensão apropriada para o material cirúrgico;
  - Tesouras retas de ponta fina, em aço inoxidável, 9 cm ou 15 cm ;
  - Cabos de bisturi N°4 em aço inoxidável, 14 cm;
  - Lâminas de bisturi descartáveis (N° 20, de aço inoxidável estéril);
  - Pinças histológicas (reta de ponta fina), em aço inoxidável, 16 cm;
  - Placas de petri de vidro 10 cm x 2 cm;
- Tubos criogênicos 2 mL livres de DNase e RNase (Figura II.1), das marcas TPP (código 89020), Kasvi (código K2-202) ou Sigma (código Z760951-400EA);
- Caixa de armazenamento, ou “rack”, para tubos criogênicos 2 mL (capacidade para 100 tubos de 2 mL) (Figura II-1);

\*Entende-se por material descontaminado aquele livre de nucleases (RNases e DNases).



**Figura II-1** – Esquerda: Modelo de criotubo com capacidade de 2 mL. Fonte: <http://www.midsci.com/lp/Cryotubes>. Direita: Modelo de caixa de armazenamento, ou “rack”, para tubos criogênicos. Fonte: <http://polylab.in/alllabwerlanding/CryoBoxcc.html> apud Bainy & Lüchmann (2016).

- Caneta permanente de ponta fina (tipo Sharpie™) para escrever nos tubos criogênicos - tinta de cor preta;
- Rolo de papel toalha;
- Rolo de papel alumínio;
- Caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™);
- Pissetas com álcool 70% para limpeza de superfícies;
- Bandejas de plástico branca grandes (12 L) para processar as amostras na bancada;
- Gelo e isopor para as atividades de dissecação;
- Material para procedimentos de limpeza, como esponja, detergente neutro;
- Tubos tipo Falcon de 50 mL livres de DNase e Rnase;
- Estante para tubo tipo Falcon de 50 mL;
- Caixa plástica para armazenar material utilizado no procedimento para posterior descontaminação.

### **III.1.2 - Reagentes químicos para a atividade de dissecação dos animais**

- Água destilada;
- Água ultrapura (tipo MilliQ);
- Água para biologia molecular (Sigma - código W4502);

- Detergente neutro 8%;
- RNase Away® (Sigma - código 83931);
- Etanol 100% (Sigma - código E7148);
- Etanol 70%;
- Soro fisiológico (NaCl 0,9%);
- Cloridrato de lidocaína geleia 2%.

### ***III.1.3 - Procedimento de limpeza e identificação do material utilizado para a dissecação dos animais***

Antes de iniciar a limpeza, separar o material necessário para o procedimento: luva nitrílica; esponja de limpeza; detergente neutro 8%; tubo tipo Falcon de 50 mL; estante para tubo Falcon; etanol 100%; RNase Away®; água destilada; água para biologia molecular. Todo o procedimento deve ser realizado utilizando-se luvas nitrílicas.

Procedimento de limpeza:

- Lavar as tesouras, pinças, cabos de bisturi e placas de petri de vidro com água corrente (da torneira) e detergente neutro 8% com auxílio de uma esponja de limpeza.
- Enxaguar com água destilada.
- Colocar o material em um tubo tipo Falcon de 50mL contendo etanol 100% e logo retirar.
- Colocar algumas gotas de RNase Away® sobre o material para dissecação de forma a garantir uma eficiente limpeza das RNases.
- Lavar com água para biologia molecular.
- Colocar o material na caixa inox de cada conjunto para dissecação.
- Secar na estufa a aproximadamente 50°C, durante no máximo 2 horas, ou proteger o material de contaminação e sujeira adversas, como poeira, e deixar secar à temperatura ambiente. .

- Etiquetar o estojo inox com informações sobre o procedimento, tais como: data da limpeza, responsável e registrar que o material encontra-se descontaminado.

- Armazenar em um local de fácil acesso e protegido de poeiras.

Nota: Depois de descontaminado, somente manusear o material usando luvas nitrílicas. O contato com a pele humana (mãos sem luvas) é a principal fonte de contaminação por RNases.

Procedimento de identificação:

- Separar todo o material necessário e identificar todos os criotubos com Identificador do Indivíduo usando caneta permanente de ponta fina.
- Escrever o Identificador do Indivíduo cadastrado no SIMBA (p. ex. 027970-FIG-0004) na tampa e na lateral do criotubo. Usar códigos que permitam a identificação da amostra e seu destino analítico (para análise de biomarcadores bioquímicos ou moleculares).
- Colocar os criotubos identificados em caixas térmicas ou de isopor contendo gelo para que os tubos estejam refrigerados no momento da dissecação (Figura II-2).

Nota: SEMPRE usar luvas nitrílicas descartáveis durante a preparação do material, e NÃO manusear os criotubos sem luvas para evitar contaminação por RNases.



**Figura II-2.** Imagem ilustrativa de criotubos acondicionados no gelo antes do início da dissecação. Os criotubos podem estar diretamente em contato com o gelo.

Fonte: [http://www.biocision.com/uploads/images/landing-pages/CF45%20on%20ice\(G\).png](http://www.biocision.com/uploads/images/landing-pages/CF45%20on%20ice(G).png) apud Bainy & Lüchmann (2016)

## **III.2 - COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS**

A robustez e a confiabilidade dos resultados dependem de uma série de fatores, tais como rapidez no processamento, assepsia do material usado na dissecação, uso de luvas nitrílicas durante todo o procedimento e integridade do material biológico a ser amostrado.

### **III.2.1 - Tecidos biológicos de mamíferos marinhos**

É essencial que os tecidos (pele e fígado) sejam coletados somente de carcaças Código 2, conforme classificação estabelecida no Quadro III.1 do Protocolo 1 - Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre. Em nenhuma hipótese, deve ser coletada amostra de animais submetidos a qualquer tratamento veterinário, independentemente do estado de decomposição da carcaça.

#### **III.2.1.1 - Pele**

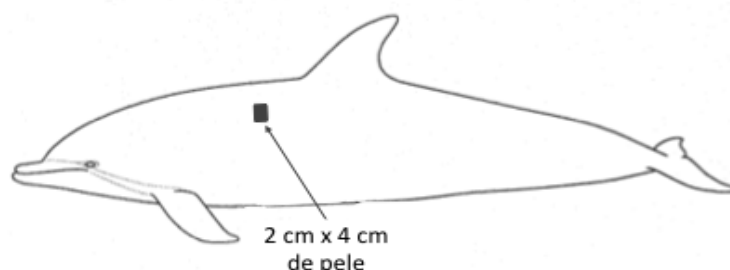
Em cetáceos, as amostras de pele devem ser coletadas no segmento médio da coluna torácica, conforme mostrado nas Figuras III.1 e III.2. Todo o procedimento deve ser realizado dentro de no máximo 30 minutos para garantir a integridade do material a ser preservado. Em casos de não atender esse requisito, reportar na cadeia de custódia o tempo gasto para a coleta.

Procedimento:

- Acondicionar os criotubos previamente identificados em caixas de isopor com gelo.
- Com uma lâmina de bisturi nova, e usando luvas nitrílicas descartáveis, cortar um pedaço da pele com tamanho aproximado de 2 cm x 4 cm (Figura III.1) e, com o auxílio de uma pinça descontaminada, colocá-la sobre uma placa de petri previamente descontaminada.

NOTA: As lâminas de bisturi deverão ser utilizadas "virgens" (lacradas de fábrica), e no momento de disseção, devem ser descontaminadas: colocar uma gota de RNase Away® ou RNaseZap® sobre a lâmina, tirar o excesso do líquido sobre a lâmina e depois rinçar com água Milli-Q ou com água para biologia molecular. O mesmo procedimento deve ser adotado para TODO o material cirúrgico em aço inoxidável.

- Separar a pele da gordura, reservando a gordura para a realização de análises químicas, de acordo com protocolo específico (Figura III.3).
- Cortar a pele pela metade e colocar cada pedaço em um criotubo de 2 mL resfriado, um para a realização das análises bioquímicas e outro para análises moleculares.
- Colocar imediatamente os dois criotubos com as amostras de pele dentro do botijão de nitrogênio líquido.
- Descartar a lâmina do bisturi em caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™).
- Armazenar todo o material cirúrgico utilizado em uma caixa plástica apropriada para posterior descontaminação.
- Descartar as luvas nitrílicas.
- Manter as amostras congeladas dentro do botijão de nitrogênio líquido até o momento de envio para os laboratórios de análise.
- NOTA: As amostras não podem ser descongeladas até o processamento em laboratório. Durante o transporte, as amostras podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou acondicionadas em gelo seco dentro de caixas de isopor de parede grossa, bem vedadas com fita crepe.



**Figura III.1** - Exemplo da localização para coleta de pele de cetáceos para análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares. Adaptado de: Jefferson; Myrick Jr.; Chivers (1994) apud Bainy & Lüchmann (2016).



**Figura III.2** - Pequeno cetáceo em posição lateral recumbente. Detalhe de necrópsia de pele. Fonte: <http://www.nydailynews.com/news/national/feds-investigate-spike-dolphin-deaths-east-coast-article-1.1422545> apud Bairy & Lückmann (2016)



**Figura III.3** - Separação de pele e gordura. Fonte: Pugliares et al. (2007) apud Bairy & Lückmann (2016).

Em pinípedes e sirênios, a coleta de amostra de pele deve ser na região ventral do animal, dissecado em posição dorsal recumbente (EROS et al., 2007; PUGLIARES et al., 2007) conforme mostrado nas Figuras III.4 e III.5. Coletar amostra de pele na região médio ventral do abdômen. O procedimento para coleta de pele em pinípedes e sirênios é o mesmo de cetáceos.





**Figura III.4** - Pinípede em posição dorsal recumbente evidenciando cortes durante necropsia. Fonte: Pugliares et al. (2007) apud Bainy & Lüchmann (2016).



**Figura III.5** - Sirênio em posição dorsal recumbente mostrando início da necropsia. Fonte: Eros et al. (2007) apud Bainy & Lüchmann (2016).

### III.2.1.2 - Fígado

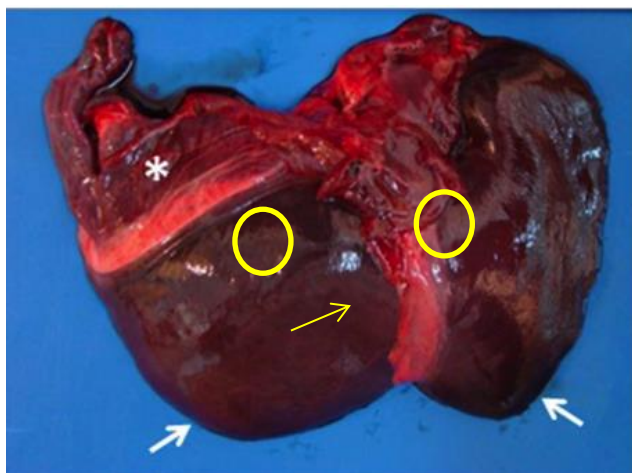
O procedimento para a coleta de fígado (Figura III.6) é semelhante ao de pele. Entretanto, antes de iniciar, o técnico responsável deve trocar as luvas nitrílicas usadas por novas e utilizar um novo conjunto para dissecação previamente descontaminado. Todo o procedimento deve ser realizado dentro de no máximo 30 minutos para garantir a integridade do material a ser preservado. Em casos de não atender esse requisito, reportar na cadeia de custódia o tempo gasto para a coleta.



**Procedimento:**

- Acondicionar os criotubos previamente identificados em caixas de isopor com gelo.
- Após a abertura da cavidade abdominal, identificar imediatamente o fígado e dissecar dois fragmentos com tamanho aproximado de 2 cm x 2 cm localizados nas proximidades da entrada da veia porta.
- Lavar o fragmento rapidamente com solução fisiológica gelada sobre uma placa de petri previamente descontaminada de acordo com o item III.1.4.
- Colocar cada pedaço em um criotubo de 2 mL resfriado, um para as análises bioquímicas e outro para as análises moleculares.
- Congelar imediatamente em nitrogênio líquido.
- Descartar a lâmina do bisturi em caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™).
- Armazenar todo o material cirúrgico utilizado em uma caixa plástica apropriada para posterior descontaminação.
- Descartar as luvas nitrílicas.
- Manter as amostras congeladas dentro do botijão de nitrogênio líquido até o momento de envio para os laboratórios de análise.

NOTA: As amostras não podem ser descongeladas até o processamento em laboratório. Durante o transporte, as amostras podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou acondicionadas em gelo seco dentro de caixas de isopor de parede grossa, bem vedadas com fita crepe.



**Figura III.6** - Fígado removido de carcaça de toninha, *Pontoporia blainvillei*. Órgão aparentemente bilobado (setas brancas) e diafragma (asterisco) de toninha, *Pontoporia blainvillei*. A seta amarela indica a veia porta. Os círculos indicam áreas que deverão ser amostradas. Adaptado de: Viera (2012) apud Bainy & Lückmann (2016).

### III.2.2 - Tecidos biológicos de quelônios marinhos

É essencial que os tecidos (pele e fígado) sejam coletados somente de carcaças Código 2, conforme classificação estabelecida no Quadro III.1 do Protocolo 1 - Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre. Em nenhuma hipótese, deve ser coletada amostra de animais submetidos a qualquer tratamento veterinário, independentemente do estado de decomposição da carcaça.

#### III.2.2.1 - Pele

Todo o procedimento deve ser realizado dentro de no máximo 30 minutos para garantir a integridade do material a ser preservado. Em casos de não atender esse requisito, reportar na cadeia de custódia o tempo gasto para a coleta.

Procedimento:

- As amostras de pele devem ser coletadas na extremidade da nadadeira (Figura III.7).
- Retirar uma amostra de tamanho aproximado de 1,5 cm x 1,5 cm.

- Imediatamente após a retirada do tecido, colocar em uma placa de petri previamente limpa de acordo com o item III.1.3 e dividir a amostra em duas sub-amostras.
- Colocar as amostras separadamente em 2 criotubos de 2 mL resfriados, um para as análises bioquímicas e outro para as análises moleculares.
- Congelar imediatamente em nitrogênio líquido.
- Descartar a lâmina do bisturi em caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™).
- Armazenar todo o material cirúrgico utilizado em uma caixa plástica apropriada para posterior descontaminação.
- Descartar as luvas nitrílicas.
- Manter as amostras congeladas dentro do botijão de nitrogênio líquido até o momento de envio para os laboratórios de análise.

NOTA: As amostras não podem ser descongeladas até o processamento em laboratório. Durante o transporte, as amostras podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou acondicionadas em gelo seco dentro de caixas de isopor de parede grossa, bem vedadas com fita crepe.



**Figura III.7** - Coleta de pele de tartaruga, realizada na extremidade da nadadeira. Fonte: <https://www.conserveturtles.org/bermuda/docs/ProceduresManual2008.pdf> apud Bainy & Lückmann (2016)

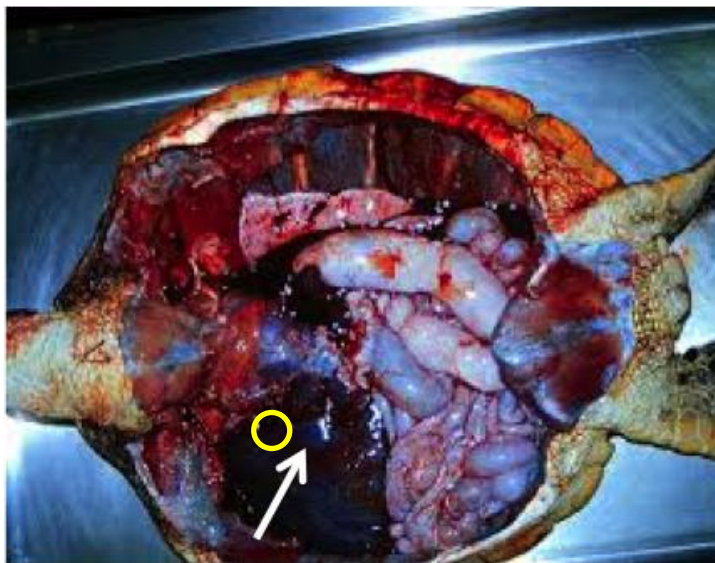
### III.2.2.2 - Fígado

Todo o procedimento deve ser realizado dentro de no máximo 30 minutos para garantir a integridade do material a ser preservado. Em casos de não atender esse requisito, reportar na cadeia de custódia o tempo gasto para a coleta.

Procedimento:

- Com o auxílio de um bisturi ou uma tesoura e pinças previamente esterilizadas (de acordo com o item III.1.3), retirar dois fragmentos de fígado com tamanho aproximado de 2 cm x 2 cm localizados nas proximidades da entrada da veia porta (Figura III.8).
- Lavar cada fragmento rapidamente com solução fisiológica gelada sobre uma placa de petri previamente descontaminada de acordo com o item III.1.3.
- Colocar as amostras separadamente em 2 criotubos de 2 mL resfriados, um para as análises bioquímicas e outro para as análises moleculares.
- Congelar imediatamente em nitrogênio líquido.
- Descartar a lâmina do bisturi em caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™).
- Armazenar todo o material cirúrgico utilizado em uma caixa plástica apropriada para posterior descontaminação.
- Descartar as luvas nitrílicas.
- Manter as amostras congeladas dentro do botijão de nitrogênio líquido até o momento de envio para os laboratórios de análise.

NOTA: As amostras não podem ser descongeladas até o processamento em laboratório. Durante o transporte, as amostras podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou acondicionadas em gelo seco dentro de caixas de isopor de parede grossa, bem vedadas com fita crepe.



**Figura III.8** - Necropsia de tartaruga verde. Fígado indicado pela seta branca. O círculo amarelo indicam a região a ser amostrada, localizada próxima à veia porta. Adaptado de: Work (2000) apud Bainy & Lüchmann (2016).

### III.2.3 - Tecidos biológicos de aves marinhas

É essencial que os tecidos (pele e fígado) sejam coletados somente de carcaças Código 2, conforme classificação estabelecida no Quadro III.1 do Protocolo 1 - Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre. Em nenhuma hipótese, deve ser coletada amostra de animais submetidos a qualquer tratamento veterinário, independentemente do estado de decomposição da carcaça.

#### III.2.3.1 - Fígado

Todo o procedimento deve ser realizado dentro de no máximo 30 minutos para garantir a integridade do material a ser preservado. Em casos de não atender esse requisito, reportar na cadeia de custódia o tempo gasto para a coleta.

Procedimento:

- Com o auxílio de um bisturi ou uma tesoura e pinças previamente esterilizadas (de acordo com o item III.1.3), retirar dois fragmentos de fígado com tamanho aproximado de 2 cm x 2 cm localizados nas proximidades da entrada da veia porta (Figura III.9).



- Lavar cada fragmento rapidamente com solução fisiológica gelada sobre uma placa de petri previamente descontaminada de acordo com o item III.1.3.
- Colocar as amostras separadamente em 2 criotubos de 2 mL resfriados, um para as análises bioquímicas e outro para as análises moleculares.
- Congelar imediatamente em nitrogênio líquido.
- Descartar a lâmina do bisturi em caixa para descarte de materiais perfurocortantes (tipo BD Descartex™).
- Armazenar todo o material cirúrgico utilizado em uma caixa plástica apropriada para posterior descontaminação.
- Descartar as luvas nitrílicas.
- Manter as amostras congeladas dentro do botijão de nitrogênio líquido até o momento de envio para os laboratórios de análise.

NOTA: As amostras não podem ser descongeladas até o processamento em laboratório. Durante o transporte, as amostras podem ser mantidas em nitrogênio líquido ou acondicionadas em gelo seco dentro de caixas de isopor de parede grossa, bem vedadas com fita crepe.



**Figura III.9** - Fotografia mostrando a localização de alguns órgãos abdominais de pinguim. Em destaque a localização da região adequada para a coleta da amostra de fígado.

## ***IV - HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)***

### ***IV.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES***

#### ***IV.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas***

- Luvas nitrílicas;
- Cabos e lâminas de bisturi;
- Facas de cerâmica ou aço;
- Tábua de vidro temperado para corte de amostras;
- Pinças metálicas;
- Folhas de papel alumínio;
- Recipientes de alumínio;
- Sacos plásticos (transparentes do tipo “ziplock”);
- Etiquetas para identificação do material biológico coletado (a prova d’água);
- Grafites (lápis);

#### ***IV.1.2 - Procedimento de limpeza e identificação do material utilizado para a dissecação dos animais***

Os materiais, como facas e outros, a serem usados na remoção dos tecidos devem ser lavados com água e detergente neutro, depois rinsados com água ultra pura tipo 1, segundo ASTM (“água Milli-Q”), e descontaminados em forno mufla a 400°C por 4h (quando permitido pelas características do material).

Caso se opte por utilizar frascos de alumínio para armazenar as amostras, os recipientes que receberão as amostras devem ser lavados com água e detergente neutro, com auxílio de esponja e escovas de limpeza. Os materiais devem, então, ser rinsados com “água Milli-Q”. Após isto, devem ser rinsados com acetona P.A. (verificar se não há mais resíduo de água). Por fim, devem ser rinsados com diclorometano (grau resíduo ou pesticida).

Após a descontaminação, os materiais a serem usados em campo devem ser acondicionados em recipientes de alumínio, previamente descontaminados como mencionado no parágrafo anterior. Alternativamente estes materiais podem ser embrulhados em papel alumínio, com a face brilhante voltada para fora.

Caso sejam utilizados frascos de alumínio, deve-se atentar para o caso das tampas dos frascos de alumínio possuírem um material plástico para vedação (Figura IV 1a). Neste caso as tampas não devem ser colocadas em forno mufla ou descontaminadas com solvente, apenas limpas com água e detergente neutro, e depois rinsadas com “água Milli-Q”. Devem ser secas à temperatura ambiente. Um papel de alumínio deve ser colocado abaixo da tampa, para evitar o contato do plástico com a amostra. A parte brilhante deve ficar para cima, como mostrado na Figura IV 1b.



**Figura IV.1** – Frascos de alumínio para acondicionamento de amostras para análise de HPAs: (a) visão da tampa mostrando o anel de vedação; (b) modo de utilização de papel de alumínio para evitar contato da amostra com a tampa.

## IV.2 - COLETA DE AMOSTRAS

A robustez e a confiabilidade dos resultados dependem de uma série de fatores, tais como rapidez no processamento, assepsia do material usado na dissecação, uso de luvas nitrílicas durante todo o procedimento e qualidade do material biológico a ser amostrado.



#### ***IV.2.1 - Tecidos biológicos de tetrápodes marinhos***

**ATENÇÃO: CUIDAR PARA NÃO COLOCAR O MATERIAL EM CONTATO COM OBJETOS PLÁSTICOS.**

**OBSERVAÇÃO:** Sempre que houver coleta de amostras para análise de HPA, obrigatoriamente deverá haver coleta de amostras para análise histopatológica (Protocolo 7). Da mesma forma, sempre que houver coleta de amostras para análise de biomarcadores, obrigatoriamente deverá haver coleta de amostras para análise de HPA.

**Tecidos:** fígado e gordura. Para coleta de amostras para análise de HPAs deve-se utilizar apenas carcaças Código 2, conforme classificação estabelecida no Quadro III.1 do Protocolo 1 - Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre. Em nenhuma hipótese, deve ser coletada amostra de animais submetidos a qualquer tratamento veterinário, independentemente do estado de decomposição da carcaça.

**Procedimento:** Usar luvas nitrílicas descartáveis durante o manuseio, para não contaminar as amostras. Caso necessário, utilizar uma tábua de vidro temperado descontaminada, na bancada aonde se realizarão as dissecções. Proceder à dissecção para retirada dos tecidos dos tetrápodes conforme os procedimentos do PMP-BS, descritos no Protocolo 4 - Necropsias.

As amostras de fígado e/ou gordura deverão ser transferidas para os frascos de alumínio ou folha de alumínio. No caso de serem utilizadas folhas de alumínio, a amostra deve ficar em contato com o lado fosco do papel (IBAMA, 2005; VANSTREELS et al, 2012). A amostra deve ser embrulhada várias vezes com o papel alumínio para proteger de contaminação externa, bem como para manter o embrulho firme e coeso.

É recomendada a quantidade de 5 g para análise de HPA. O valor mínimo para HPA é 0,25 g por tecido (inclui organoclorados). Quando não for possível a coleta de material suficiente para a análise completa de contaminantes, a prioridade deve ser dada à análise de HPA.

Após as amostras terem sido transferidas para os frascos ou sacos ZipLock, os mesmos devem ser tampados/fechados e etiquetados e estas devem ser armazenadas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  (GERACI, LOUNSBURY, 2005). As amostras podem ser colocadas em recipientes com gelo seco e, em seguida, enviadas para um local com ultrafreezer ou botijões de nitrogênio líquido, para armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

É muito importante para a qualidade analítica do resultado da análise de HPA refrigerar a amostra na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  assim que for realizada a coleta do tecido, e também durante seu transporte até o laboratório responsável pelas análises, onde deve ser também armazenada em a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Deverá ser usado botijão com nitrogênio líquido ou gelo seco em recipientes de isopor durante o transporte.

### **IV.3 - Considerações importantes**

- Nunca utilizar recipientes ou espátulas de plástico na coleta de amostras para análise de HPA, pois o contato direto de plásticos com o tecido invalida a amostra, pela contaminação com compostos orgânicos presentes nestes materiais.
- Relatar a presença de manchas de óleo na superfície do local de amostragem ou no animal.
- Não fumar no local de coleta e nos locais dos demais procedimentos de amostragem e armazenagem. Relatar também a presença de fumaça no local de coleta.
- Quando embarcado, deve-se tomar cuidado para não contaminar o material de coleta com o óleo da embarcação ou fumaça do motor. A coleta deve ser feita sempre o mais distante possível do cano de escape do motor (preferencialmente na proa da embarcação).
- Fotografar a região de coleta e sempre anotar a latitude e longitude em coordenadas UTM dos pontos amostrados.
- Fotografar as carcaças sempre que possível.
- Preencher a etiqueta das amostras preferencialmente com lápis e proteger a

etiqueta com fita adesiva transparente. Alternativamente existem etiquetas comerciais para coletas de campo à prova d'água. Para o uso do saco de Zip Lock se pode colocar a etiqueta em um saco de Zip Lock menor e este colocado no saco maior que possui a amostra embrulhada em alumínio.

- O manuseio de gelo seco, dos solventes e reagentes mencionados neste documento deve ser feito por pessoal capacitado. O mesmo vale para o uso da estufa.
- O manuseio de solventes deve ser feito em capela.
- Usar calçados de segurança em atividades onde houver perigo de queda de objetos, e no manuseio de equipamentos e máquinas hidráulicas.
- Utilizar óculos de segurança e luvas nitrílicas ao manusear solvente e soluções.
- Todas as soluções contendo solventes devem ser depositadas em recipientes de coleta de descartes para cada tipo de composto e posteriormente enviados para tratamento, acompanhado da Ficha de Descarte de Resíduo, contendo os nomes dos compostos e a concentração média da solução para descarte.

## **V - ELEMENTOS TRAÇO**

Este protocolo visa a análise dos seguintes metais: As, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Mo, Zn, Ni, Ba, V e Hg.

### **V.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES**

#### **V.1.1 - Materiais para obtenção das amostras biológicas para análise de elementos traço**

- Luvas nitrílicas;
- Facas de cerâmica (cor natural);
- Pinças plásticas;
- Frascos plásticos (polipropileno-PP, Teflon-PTFE), de preferência “Tubo Falcon” com base;
- Tábua de vidro temperado (cor natural);
- Proveta 100 mL (mínimo);
- Balão volumétrico 1000 mL (mínimo);
- Sacos plásticos (transparentes do tipo “ziplock”);
- Etiquetas para identificação do material biológico coletado (a prova d’água);
- Grafites (lápis);

#### **V.1.2 - Procedimento de limpeza do material utilizado para a dissecação dos animais**

Os frascos plásticos de polipropileno ou teflon deverão ser lavados com detergente e água corrente abundante. Em seguida, rinçados com solução de ácido nítrico 10% e rinçados abundantemente com “água Milli-Q”, para remoção do ácido. Os materiais como facas e outros, a serem usados na remoção dos tecidos, devem ser descontaminados do mesmo modo. A

solução de ácido nítrico deve ser preparada com “água Milli-Q”. O ácido nítrico a ser usado na preparação da solução a 10% pode ser P.A. Após a descontaminação, os materiais a serem usados em campo devem ser acondicionados em recipientes de plástico (PE, PP ou teflon) previamente descontaminados, como mencionado anteriormente.

## **V.2 - COLETA DE AMOSTRAS**

A robustez e a confiabilidade dos resultados dependem de uma série de fatores, tais como rapidez no processamento, assepsia do material usado na dissecação, uso de luvas nitrílicas durante todo o procedimento e qualidade do material biológico a ser amostrado.

### **V.2.1 - Tecidos biológicos de tetrápodes marinhos**

**ATENÇÃO: CUIDAR PARA NÃO COLOCAR O MATERIAL EM CONTATO COM OBJETOS METÁLICOS.**

**Tecidos:** fígado. Para coleta de amostras para análise de elementos traço deve-se utilizar apenas carcaças Código 2, conforme classificação estabelecida no Quadro III.1 do Protocolo 1 - Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre. Em nenhuma hipótese, deve ser coletada amostra de animais submetidos a qualquer tratamento veterinário, independentemente do estado de decomposição da carcaça.

**Procedimento:** Usar luvas nitrílicas descartáveis durante o manuseio, para não contaminar as amostras. Caso necessário, utilizar uma tábua de vidro temperado descontaminada, na bancada aonde se realizarão as disseções. Proceder à dissecação para retirada dos tecidos dos tetrápodes conforme os procedimentos do PMP-BS, descritos no Protocolo 4 - Necropsias. Não há uma região específica do fígado para a coleta da amostra, mas devem ser coletadas com facas de cerâmica descontaminadas, como descrito anteriormente.

A recomendação técnica de massa mínima amostral é de 10 g de tecido hepático para análise de elementos traço. No entanto, mesmo que isso possa comprometer a confiabilidade do resultado final, exclusivamente para aves cuja massa corporal total seja inferior a 500g, poderá ser encaminhada para análise de elementos traço amostras com, no mínimo, 3 g de tecido hepático.

Todas as amostras devem ser armazenadas em criotubos devidamente descontaminados e etiquetados.

Após as amostras terem sido transferidas para os frascos, os mesmos devem ser tampados/fechados e etiquetados e armazenadas à temperatura de -80°C (GERACI, LOUNSBURY, 2005).

É muito importante para a qualidade analítica do resultado da análise de elementos traço refrigerar a amostra na temperatura de -80°C assim que for realizada a coleta do tecido, e também durante seu transporte até o laboratório responsável pelas análises, onde deve ser também armazenada em a -80°C. Deverá ser usado botijão com nitrogênio líquido ou gelo seco em recipientes de isopor durante o transporte.

## **VI - FINGERPRINT**

No caso de observação de óleo, devem ser coletadas amostras e solicitada a análise de fingerprint (identificação de origem do óleo). As ocorrências devem ser registradas na Ficha de Registro de Ocorrência de Resíduos Oleosos, como descrito no Protocolo 1 – Atividade de campo do monitoramento de praias embarcado e terrestre.

### **VI.1 - PREPARAÇÃO PARA AS ATIVIDADES**

#### **VI.1.1 - Materiais para obtenção das amostras de resíduos oleosos**

- Frasco de vidro, de preferência de boca larga, com tampa revestida de TEFLON;
- Espátula de madeira (estilo palito de sorvete) ou de metal;
- Etiquetas para identificação do material biológico coletado (a prova d'água);
- Grafites (lápiz);

### **VI.2 - COLETA DE AMOSTRAS**

#### **VI.2.1 - Amostra de óleo ou borra oleosa coletada em praias ou animais**

No caso de resíduo oleoso coletado em carcaça ou em animais vivos, deverão ser coletadas duas amostras. Todo material que seja coletado também deve ser fotografado.

**Tipo de recipiente:** Frasco de vidro, de preferência de boca larga;

**Tipo de tampa:** Qualquer tampa revestida de TEFLON para evitar o contato do plástico da tampa com o material a ser analisado;

**Limpeza do frasco:** Lavar o frasco com Diclorometano (DCM) e deixá-lo secar (não utilizar sabão ou detergentes). Se não possuir DCM, utilizar etanol.

**Massa coletada:** De 65 à 100 g de amostra, coletadas com espátula de madeira (estilo palito de sorvete) ou de metal devidamente limpa;

**Registro da amostra:** Registrar a ocorrência no sistema de gerenciamento de dados (SIMBA), gerar um pedido de análise de fingerprint no sistema e identificar com o código da amostra gerado pelo SIMBA (p. ex. OLE-000-0067), o dia, hora e local da coleta (latitude e longitude);

**Armazenamento e envio:** Armazenar em lugar fresco, ao abrigo da luz e calor. Não é necessário acomodá-la em gelo ou sob refrigeração.

## VI.2.2 - Amostra de óleo em corpos d'água

**Tipo de recipiente:** Frasco de vidro, de tamanho suficiente para acomodar a amostra;

**Tipo de tampa:** Qualquer tampa revestida de TEFLON para evitar o contato do plástico da tampa com o material a ser analisado;

**Limpeza do frasco:** Lavar o frasco com Diclorometano (DCM) e deixá-lo secar (não utilizar sabão ou detergentes). Se não possuir DCM, utilizar etanol;

**Volume coletado:** De 5 a 10 ml de ÓLEO (evitar coletar grandes quantidades de água);

**Registro da amostra:** Registrar a ocorrência no sistema de gerenciamento de dados (SIMBA), gerar um pedido de análise de fingerprint no sistema e identificar com o código da amostra gerado pelo SIMBA (p. ex. OLE-000-0067), o dia, hora e local da coleta (latitude e longitude);

**Armazenamento e envio:** Armazenar em lugar fresco, ao abrigo da luz e calor. Não é necessário acomodá-la em gelo ou sob refrigeração.



## **VII - IDENTIFICAÇÃO E DOCUMENTO DE CUSTÓDIA DAS AMOSTRAS**

Todas as amostras coletadas durante a necropsia deverão seguir uma cadeia de custódia, a fim de permitir sua rastreabilidade em qualquer etapa do processo.

Assim, todos os campos da Ficha de Custódia (Anexo VII.1) devem ser devidamente preenchidos e assinados pelos respectivos responsáveis.

Nos campos “Identificador da Amostra” e “Identificador do Indivíduo” deverão ser copiados os códigos gerados pelo SIMBA, quando forem feitos ou o pedido de análise do material ou o registro da ocorrência de Fauna Alvo Individual, respectivamente.

Também com base nas informações constantes no SIMBA, deverão ser preenchidos os campos “Espécie”, “Data da coleta do organismo na praia” e “Data da necropsia”.

Ressalte-se que para cada amostra deverá haver um único registro e, em nenhuma hipótese, deverão ser registradas amostras destinadas para diferentes exames (biomarcadores e contaminantes) em uma mesma Ficha de Custódia.

Não é permitida qualquer alteração na Ficha de Custódia (Anexo VII.1) sem prévia autorização da PETROBRAS.

## VIII - ENVIO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

- Usar luvas nitrílicas durante o manuseio e preparação das amostras para envio.
- As amostras armazenadas em nitrogênio líquido deverão ser transferidas para uma caixa de isopor contendo gelo seco e seguirão para o laboratório responsável pelas análises de biomarcadores bioquímicos e moleculares.
- O envio das amostras pode ser realizado por transporte aéreo ou terrestre. No aéreo, o material congelado em gelo seco e armazenado em caixa de isopor pode ser enviado via SEDEX 10, transporte aéreo de carga, ou através de entrega expressa em até 12 horas após o envio.  
No transporte terrestre, há a opção de enviar as amostras dentro do container de nitrogênio líquido. Ressalta-se que para este transporte, o container deve ser específico ao transporte criogênico para evitar derramamentos durante a operação.
- Sugere-se que o tempo de transporte não seja superior a 24 horas. É importante considerar que se amostra for coletada a partir de quinta-feira, há um risco de ficar armazenada no final de semana nos Correios e haver uma perda da amostra. Assim, sugere-se que o envio seja realizado nas segundas, terças ou quartas-feiras.
- Cada envio deve ser acompanhado de um documento de custódia (**ANEXO VII.1** Ficha de Custódia PMP-BS).

## **VIII - RISCOS ASSOCIADOS ÀS TÉCNICAS, À SAÚDE E AO MEIO AMBIENTE**

O público alvo deste documento deve ser treinado e estar ciente da necessidade das medidas de biossegurança, tais como o uso de EPC e EPI. Assim, os reagentes e materiais com riscos à saúde dos técnicos são descritas a seguir:

### **Etanol**

**Identificação dos perigos:** Líquido e vapor facilmente inflamáveis. Irritante para a pele, os olhos e mucosa do trato respiratório. Causa dor de cabeça, sonolência e lassidão. Altas doses provocam torpor, embriaguez e inconsciência. No ambiente, contamina cursos d'água tornando-os impróprios para uso em qualquer finalidade, podendo vir a destruir a fauna e a flora do local do derrame. Escoamento para rede de esgotos pode criar riscos de fogo ou explosão. Os vapores são mais pesados que o ar. Solúvel em água.

**Controle da exposição e proteção individual:** Usar jaleco confeccionado em algodão. Manusear com luvas de proteção. As luvas devem ser descartadas e devem ser substituídas se houver qualquer indicação de degradação ou avanço químico. Utilizar proteção ocular e facial. Usar óculos de segurança mesmo nos casos de uso de óculos de grau. É terminantemente proibido o uso de lente de contato ao manipular substâncias químicas ou permanecer em laboratório com a manipulação destas substâncias usando lente de contato. Usar calçados fechados. É proibido o uso de sandálias e chinelos.

**Cuidados durante a manipulação:** Evitar o contato com a pele, olhos e roupa. Assegurar uma boa ventilação no local de trabalho. Providenciar ventilação local exaustora onde os processos exigirem. Produto inflamável na presença de fonte de ignição ou aquecimento. Manter afastado do calor/faísca/chama aberta/superfícies quentes. Os recipientes podem explodir com o calor do fogo. Não comer, beber ou fumar durante a manipulação.

**Cuidados após exposição:** Lavar as mãos imediatamente após o manuseio do produto. Evitar seu despejo no ambiente.

## **Materiais perfurocortantes**

**Cuidados durante a manipulação:** Deve-se ter máxima atenção durante a realização dos procedimentos que envolvam materiais perfurocortantes (laminas de bisturi, vidraria quebrada, entre outros). Todo material perfurocortante, mesmo que esterilizado, deve ser desprezado em recipientes resistentes à perfuração e com tampa (tipo BD Descartex™). Os recipientes específicos para descarte destes materiais não devem ser preenchidos acima do limite de 2/3 de sua capacidade total e devem ser colocados sempre próximos do local onde é realizado o procedimento. Não deixar o recipiente no chão, em local úmido ou passível de respingo.

**Controle da exposição e proteção individual:** Usar jaleco, manusear com luvas de proteção. As luvas devem ser descartadas e devem ser substituídas se houver qualquer indicação de degradação. Usar calçados fechados. É proibido o uso de sandálias e chinelos.

## **Nitrogênio líquido**

**Identificação dos perigos:** O nitrogênio líquido é extremamente frio (-196°C). Embora não seja tóxico, é considerado como asfixiante simples (Norma Regulamentadora 15 - NR15), e pode causar problemas de saúde nas pessoas que o manipulam sem o devido conhecimento e os equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados.

**Controle da exposição e proteção individual:** Utilizar jaleco, luva criogênica e óculos de segurança com lente incolor e proteção lateral para evitar o contato do produto com a pele, os olhos, membranas, mucosas e trato respiratório. Usar óculos de segurança mesmo nos casos de uso de óculos de grau. É terminantemente proibido o uso de lente de contato ao manipular substâncias químicas ou permanecer em laboratório com a manipulação destas substâncias usando lente de contato. Usar calçados fechados. É proibido o uso de sandálias e chinelos.

**Cuidados durante a manipulação:** Assegurar uma boa ventilação no local de trabalho. O nitrogênio líquido deve somente ser armazenado em containers criogênicos especialmente designados para este fim.

### **RNase AWAY®**

**Identificação dos perigos:** Reagente usado para remover RNases e DNA de equipamentos e superfícies (de plástico, vidro e aço inoxidável) de laboratório. NÃO usar em materiais feitos ou revestidos com alumínio ou borracha. Pode causar irritação na pele, olhos e mucosas.

**Controle da exposição e proteção individual:** Usar jaleco confeccionado em algodão. Manusear com luvas de proteção. As luvas devem ser descartadas e devem ser substituídas se houver qualquer indicação de degradação ou avanço químico. Utilizar proteção ocular e facial. Usar óculos de segurança mesmo nos casos de uso de óculos de grau. É terminantemente proibido o uso de lente de contato ao manipular substâncias químicas ou permanecer em laboratório com a manipulação destas substâncias usando lente de contato. Usar calçados fechados. É proibido o uso de sandálias e chinelos.

**Cuidados durante a manipulação:** NÃO usar em materiais feitos ou revestidos com alumínio ou borracha. Usar em equipamentos e superfícies (de plástico, vidro e aço inoxidável) de laboratório. Evitar o contato com a pele, olhos e roupa. Não comer, beber ou fumar durante a manipulação.

### **Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65%**

**Identificação dos perigos:** Oxidante forte. Contato com outro material pode causar fogo. Líquido corrosivo e causa queimaduras severas para todo o tecido do corpo. Pode ser fatal se engolido ou inalado. A inalação pode causar dano no pulmão e dente.

**Precauções:** Não inalar os vapores e evitar o contato com o produto. Evitar o derramamento em redes de águas residuais. Absorver com agente higroscópico. Recolher para eliminação posterior.

## **IX - BIBLIOGRAFIA**

BAINY, A.D. E LÜCHMANN, KH. (2016). Avaliação do estado da arte de análises de biomarcadores em tetrápodes marinhos (cetáceos, aves e tartarugas marinhas). UFESC: Florianópolis/SC.

EROS, C. et al. Procedures for the Salvage and Necropsy of the Dugong (*Dugong dugon*). Great Barrier Reef Marine Park Authority. (Series: Research publication (Great Barrier Reef Marine Park Authority); nº 85, 2007. Disponível em: [www.gbrmpa.gov.au/corp\\_site/info\\_services/publications](http://www.gbrmpa.gov.au/corp_site/info_services/publications). Acessado em 29/04/2016.

GERACI, J.R., LOUNSBURY, V.J. Marine Mammals Ashore: a field guide for strandings. Texas: Texas A&M Sea Grant Publications, 1993. 305 p.

GERACI, J.R.; LOUNSBURY, V.J. Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings. 2nd ed., National Aquarium in Baltimore, Baltimore, EUA. 2005. 372 p.

Geosapiens. Programa de Monitoramento de Praias. Documento de Especificação de Requisitos, Casos de Uso, Protótipos de Telas e Diagrama de Entidade e Relacionamento. 2015. 150 p.

IBAMA. Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos. Recife, Brasil: Rede de encalhe de mamíferos aquáticos do Nordeste, 2005. 298p.

JEFFERSON, T.A.; MYRICK, JR., A.C.; CHIVERS, S.J. Small cetacean dissection and sampling: A field guide. U. S. Department of Commerce, NOAA-Technical Memorandum-NMFS-SWFSC-198, 1994. 46 p.

MELO, M.R et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. J. Bras. Patol. Med. Lab., v. 46, p. 375-381, 2010.

MENEGÁRIO, A.A; SULATO, E.T. & PEDROBOM, J.H. (2016). Relatório de

estado da arte: serviços de quantificação, avaliação e interpretação de resultados de elementos traços em amostras biológicas de tetrápodes marinhos provenientes do programa de monitoramento ambiental da Petrobras. Vol. Único. UNESP: São Paulo/ SP.

Norma Regulamentadora NR15 - Atividades e Operações Insalubres. Disponível em: <http://www.guiatrabalhista.com.br/legislacao/nr/nr15.html>. Acessado em 28/04/2016.

PETROBRAS. PP-1PBR-00376-0. Protocolos de coleta - coleta, preservação, acondicionamento, tratamentos e análises de bordo de amostras para monitoramento ambiental costeiro e oceânico. ANEXO XXIV – Procedimento de coleta, preservação e acondicionamento de amostras de tecido de tetrápodes marinhos para análise de elementos traço e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2017.

PUGLIARES, K.R. et al. Marine mammal necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists (WHOI Technical Report). Woods Hole, MA: Woods Hole Oceanographic Institution, 2007. 132 p.

Sinclair, C., J. Sinclair, E. S. Zolman, A. Martinez, B. Balmer, K. P. Barry. Remote biopsy field sampling procedures for cetaceans used during the Natural Resource Damage Assessment of the MSC252 Deepwater Horizon Oil Spill. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-670. 2015. 28p.

VANSTREELS, R.E.T.; ADORNES, A.C.; CABANA, A.L.; NIEMEYER, C.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; DANTAS, G.P.M.; ARAÚJO, J.; CATÃO-DIAS, J.L.; GROCH, K.R.; SILVA, L.A.; REISFELD, L.C.; BRANDÃO, M.L.; XAVIER, M.O.; GONZALEZ-VIERA, O.; SERAFINI, P.P.; BALDASSIN, P.; CANABARRO, P.L.; HURTADO, R.F.; SILVA-FILHO, R.P.; CAMPOS, S.D.E.; RUOPPOLO, V. Manual de campo para a colheita e armazenamento de informações e amostras biológicas provenientes de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). 2.

ed. São Paulo: Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, 2012. 62 f.

VIERA, O.A.G. Patologia comparada das hepatopatias e nefropatias em cetáceos do Brasil. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada), Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

WORK, T.M. Sea turtles necropsy manual for biologists in remote refuges. 2000. US Geological survey, National wildlife health center, Hawaii field station; 25 pp.



## X - GLOSSÁRIO

Para fins deste protocolo são consideradas as seguintes definições:

<b>Biossegurança</b>	Conjunto de procedimentos, atividades, metodologias, equipamentos e dispositivos capazes de eliminar ou minimizar riscos inerentes a algumas atividades que podem comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o meio ambiente.
<b>Necropsia</b>	Exame de um cadáver com o objetivo de verificar alterações patológicas.
<b>Contaminantes</b>	No escopo deste protocolo, entende-se por contaminantes o conjunto de compostos químicos representados pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, organohalogenados e elementos traço (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Mo, Zn, Ni, Ba, V e Hg).
<b>Fingerprint</b>	Método químico de identificação de origem de óleo.



## **XII - COLABORADORES**

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo de 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**

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

**Antonio M. Sanseverino**

CENPES/PDISO/MA.

**Eleine Francioni de Abreu Lima**

CENPES/PDISO/MA.

**Fabiana Dias Costa Gallotta**

CENPES/PDISO/MA.

**Liliane Pequeno de Araujo Heckmann**

CENPES/PDISO/MA.

**Marcus Antonio G. de Araújo Jr.**

CENPES/PDISO/MA.

**Maria de Fatima Guadalupe Meniconi**

CENPES/PDISO/MA.

**Silmara Rossi**

Grupo de Pesquisa sobre Fibropapilomatose em Tartarugas Marinhas, USP.

### XIII - EQUIPE TÉCNICA

#### Equipe da UNIVALI

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

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

<b>Profissional</b>	Matheus Martins Cardim
<b>Empresa</b>	UNIVALI
<b>Registro no Conselho de Classe</b>	07212 CRMV-SC
<b>Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental</b>	6870429
<b>Responsável pela(s) Seção(ões)</b>	I a X
<b>Assinatura</b>	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI _____