

PROTOCOLO SOBRE DIAGNÓSTICO  
E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS

# DA PESQUISA SÍSMICA EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS

2020



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
JAIR MESSIAS BOLSONARO - Presidente

**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE**  
RICARDO SALLES - Ministro

**INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA  
BIODIVERSIDADE**  
HOMERO DE GIORGE CERQUEIRA - Presidente

**DIRETORIA DE PESQUISA, AVALIAÇÃO E  
MONITORAMENTO DE BIODIVERSIDADE**  
MARCOS AURÉLIO VENANCIO - Diretor

**COORDENAÇÃO GERAL DE PESQUISA E  
MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE**  
KEILA RÊGO MENDES - Coordenadora

**COORDENAÇÃO DE PESQUISA E GESTÃO DA  
INFORMAÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE**  
IVAN SALZO - Coordenador

**CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE  
MAMÍFEROS AQUÁTICOS**  
FÁBIA DE OLIVEIRA LUNA - Coordenadora do Centro ICMBio/CMA

# PROTOCOLO SOBRE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PESQUISA SÍSMICA EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS

## ORGANIZADORES

Flávio José de Lima Silva

Daniel Solon Dias de Farias

Aline da Costa Bomfim

Simone Almeida Gavilan

Fernanda Loffler Niemeyer Attademo

Ana Bernadete Lima Fragoso

Rafael Ângelo Revorêdo

Raquel Marinho de Souza Cavalcante

Fábria de Oliveira Luna

O Protocolo sobre Diagnóstico e Avaliação dos Efeitos da Pesquisa Sísmica na Fauna Marinha é uma condicionante exigida pelo licenciamento ambiental federal, conduzido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (COEXP/CGMAC/DILIC/IBAMA)

# PROTOCOLO SOBRE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PESQUISA SÍSMICA EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS

## AUTORES

Flávio José de Lima Silva <sup>1, 2, 3, 4</sup>

Simone Almeida Gavilan <sup>2, 3, 5</sup>

Daniel Solon Dias de Farias <sup>2, 3, 6</sup>

Aline da Costa Bomfim <sup>2, 3, 6</sup>

Ana Bernadete Lima Fragoso <sup>2, 3, 7</sup>

Linda Weingart <sup>8</sup>

Yara Bernaldo de Quirós <sup>9</sup>

Antonio Fernández <sup>9, 10</sup>

Marina Arregui <sup>9</sup>

Óscar González-Díaz <sup>9</sup>

Josué Díaz-Delgado <sup>11</sup>

Maria Morell <sup>12</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN | Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais | Campus Natal

<sup>2</sup> Projeto Cetáceos da Costa Branca - PCCB-UERN

<sup>3</sup> Centro de Estudos e Monitoramento Ambiental – CEMAM

<sup>4</sup> Projeto Golfinho Rotador

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

<sup>6</sup> Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (UFRN)

<sup>7</sup> Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN | Campus Mossoró

<sup>8</sup> Universidade Dalhousie

<sup>9</sup> Universidade de Las Palmas de Gran Canaria – ULPGC

<sup>10</sup> Instituto de Saúde Animal e Segurança Alimentar

<sup>11</sup> Universidade de São Paulo

<sup>12</sup> Instituto de Neurociências de Montpellier

### Como citar a obra:

SILVA, Flavio José Lima; FARIAS, Daniel Solon Dias; BOMFIM, Aline Costa; GAVILAN, Simone Almeida; ATTADEMO, Fernanda Loffler Niemeyer; FRAGOSO, Ana Bernadete Lima; REVÔREDO, Rafael Ângelo; CAVALCANTE, Raquel Marinho Souza; LUNA, Fábria Oliveira (Organizadores). 2020. **Protocolo sobre diagnóstico dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos**. Brasília: ICMBio. 63 p.

Ou

SILVA, F.J.L.; FARIAS, D.S.D.; BOMFIM, A.C.; GAVILAN, S.A.; ATTADEMO, F.L.N.; FRAGOSO, A.B.L.; REVÔREDO, R.A.; CAVALCANTE, R.M.S.; LUNA, F.O. (Orgs). 2020. **Protocolo sobre diagnóstico dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos**. Brasília: ICMBio.63 p.

### Dados Internacionais para Catalogação na Publicação - CIP

Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

Protocolo sobre diagnóstico dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos. / Flávio José de Lima Silva, Daniel Solon Dias de Farias, Aline da Costa Bomfim, Simone Almeida Gavilan, Fernanda Loffler Niemeyer Attademo, Ana Bernadete Lima Fragoso, Rafael Ângelo Revôredo, Raquel Marinho de Souza Cavalcante, Fábria de Oliveira Luna (Organizadores). - 1.ed.- Brasília: ICMBio, 2020

63 pp.: il. Color

ISBN N° 978-65-5693-008-4

1. Encalhes. 2. Cetáceos. 3. Impactos. 4. Efeitos sonoros I. Título.

# SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	6
Seção I – Impactos da Pesquisa Sísmica nos Mamíferos Aquáticos	8
Capítulo 1 - Histórico da pesquisa sísmica no mundo e no Brasil	9
Capítulo 2 - Fauna marinha afetada pela pesquisa sísmica	12
2.1. Introdução	12
2.2. Impactos das pesquisas sísmicas marítimas em mamíferos aquáticos	13
2.3. Impactos das pesquisas sísmicas em outros grupos taxonômicos	18
Seção II – Procedimentos para avaliação de impacto da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos	28
Capítulo 1 - Fundamentos da avaliação dos impactos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos	29
Capítulo 2- Técnicas e procedimentos para a coleta e interpretação de material biológico para análise da Síndrome de Embolia Gasosa e Gordurosa.	32
2.1-Considerações Gerais	32
2.2-Amostragem e análises de presença de gás em tecidos de mamíferos aquáticos	36
2.2.1-Lista de material necessário para amostragem de gás	36
2.2.2-Protocolo para escure e amostragem de gás:	37
2.3-Coleta de material e análises histoquímica de êmbolos lipídicos	39
2.3.1-Lista de material necessário para a pré-fixação com tetróxido de ósmio:	39
2.3.2-Protocolo de pré-fixação com tetróxido de ósmio para demonstração histoquímica de êmbolos lipídicos	40
Capítulo 3- Técnicas de coleta e análise de aparelho auditivo para avaliação de impactos de pesquisa sísmica em cetáceos	43
3.1-Considerações Gerais	43
3.2. Lista de equipamentos e materiais necessários	43
3.2.1. Para a coleta do ouvido	44
3.2.2. Para a fixação	44
3.2.3. Para a perfusão	44
3.3. Procedimentos para coleta do ouvido	44
3.4. Procedimentos para Fixação do ouvido interno por perfusão	46
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES	57
Apêndice 1	57
Apêndice 2	59
Apêndice 3	60

# APRESENTAÇÃO

Este protocolo foi elaborado por pesquisadores de mamíferos aquáticos no Brasil e do exterior e com organização de servidora do ICMBio/CMA, com o objetivo de orientar estudantes, profissionais e público em geral sobre o diagnóstico e avaliação dos efeitos das pesquisas sísmica em mamíferos aquáticos. O protocolo utilizou uma linguagem simples sobre o tema, abordando um histórico sobre a fauna marinha, para que o leitor possua uma compreensão sobre o tema proposto. Desta forma, auxiliando no conhecimento técnico e acadêmico, assim como no atendimento de mamíferos aquáticos sobre efeito da sísmica.

O PROTOCOLO SOBRE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PESQUISA SÍSMICA EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS aborda orientações de como identificar o impacto da sísmica nos mamíferos aquáticos, as técnicas e procedimentos para coleta de material com esta finalidade, técnicas de interpretação de resultados das análises realizadas. Este guia procurou utilizar termos simples que possam ser entendidos pelos mais diversos públicos, fornecendo assim um produto de uso multidisciplinar.

Este guia se destina para profissionais, instituições, empresas, pesquisadores e público em geral que necessitem realizar o diagnóstico e avaliação dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos, assim como realizar a tomada de decisão para políticas públicas e soltura de animais, entre outras. Desta forma, sendo uma importante ferramenta para as UCs e centro de pesquisa do ICMBio.

A sua elaboração integra uma das etapas dos Projetos de Condicionantes Ambientais relacionados ao processo de licenciamento ambiental conduzido pela Coordenação de Licenciamento Ambiental de Exploração de Petróleo e Gás (COEXP), Coordenação-Geral de Licenciamento Ambiental de Empreendimentos Marinhos e Costeiros (CGMAC) e Diretoria de Licenciamento Ambiental (DILIC) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para a Atividade de Pesquisa Sísmica Marítima 3D na Bacia Potiguar

(Rio Grande do Norte e Ceará), executada pela PGS INVESTIGAÇÃO PETROLÍFERA LTDA. entre outubro de 2017 e junho de 2018.

A Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, por meio do Projeto Cetáceos da Costa Branca (PCCB/UERN), em parceria com a Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS) e Fundação para o Desenvolvimento da Ciência, Tecnologia e Inovação do Estado do Rio Grande do Norte (FUNCITERN) desenvolveu os seguintes projetos condicionantes:

- a) Projeto de Monitoramento de Praias (PMP);
- b) Projeto de Diagnóstico e Análises de Interação entre Animais Marinhos e Atividades de Pesquisa Sísmica Marítima 3D na Bacia Potiguar;
- c) Plano de Manejo de Aves em Embarcações da Atividade Sísmica na Bacia Potiguar (PMAVE).

No âmbito da execução do Projeto de Diagnóstico e Análises de Interação entre Animais Marinhos e Atividades de Pesquisa Sísmica Marítima 3D na Bacia Potiguar, foi realizado o WORKSHOP SOBRE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PESQUISA SÍSMICA EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS (WORKSHOP ON DIAGNOSIS AND EVALUATION OF SEISMIC RESEARCH EFFECTS ON AQUATIC MAMMAL), que ocorreu entre os dias 15 a 19 de janeiro de 2018 em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

O Workshop contou com a presença de 29 pessoas, envolvendo pesquisadores brasileiros e estrangeiros, profissionais que atuam com pesquisa, manejo e reabilitação de mamíferos aquáticos, representantes do Setor de Pesquisa Sísmica (PGS) e representantes de órgãos ambientais federais relacionados à conservação e ao licenciamento da atividade de pesquisa sísmica no Brasil (CGMAC/IBAMA, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Tartarugas Marinhas e da Biodiversidade Marinha do Leste – TAMAR/ICMBio e Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos – CMA/ICMBio).

Como encaminhamentos do Workshop, foram elaboradas as recomendações prioritárias para a conservação e proteção de mamíferos aquáticos nas águas do Brasil frente à ameaça da poluição sonora no mar.

Ainda como encaminhamento do Workshop foi definido o esboço e a estratégia para a elaboração deste "Protocolo sobre diagnóstico e avaliação dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos".

## Seção I – Impactos da Pesquisa Sísmica nos Mamíferos Aquáticos

---

# Capítulo 1 - Histórico da pesquisa sísmica no mundo e no Brasil

*Daniel Solon Dias de Farias*

*Flávio José de Lima Silva*

*Aline da Costa Bomfim*

*Simone Almeida Gavilan*

*Ana Bernadete Lima Fragoso*

Um dos métodos geofísicos mais utilizados para o mapeamento da subsuperfície terrestre é a atividade de pesquisa sísmica. Sua evolução tecnológica se deu ao longo do século XX e é, até hoje, muito utilizada na indústria da mineração para a pesquisa de veios e jazidas de minerais com importância econômica.

O método consiste na geração artificial de energia em direção à crosta terrestre e na captação da reflexão desta energia nas diferentes camadas geológicas. Através do cálculo destes sinais é possível inferir sobre a conformação das camadas rochosas de subsuperfície (Vilardo, 2007).

A utilização de métodos geofísicos pela indústria de petróleo para encontrar reservatórios teve início nas primeiras décadas do século XX. Anteriormente, a única forma de descobrir acumulações de óleo era por meio dos poços exploratórios, os chamados *wildcats* (Dutra, 1995).

Esses poços eram localizados através de indícios geomorfológicos de superfície ou por afloramentos espontâneos de óleo, um padrão de exploração caro, perigoso e não rentável (taxa de sucesso baixa). Isso levou as empresas petrolíferas a se interessarem pelos métodos indiretos de detecção de reservatórios (Vilardo, 2007).

Por volta de 1915, a indústria começou a basear suas perfurações em estudos gravimétricos e magnetométricos, alcançando um maior sucesso exploratório. Com o desenvolvimento dos métodos sísmicos de refração e reflexão, as companhias puderam obter ainda melhor desempenho na exploração de reservatórios de petróleo, e entre 1915 e 1920 foram identificados 12 campos

gigantes nos Estados Unidos da América (EUA), comprovando o ganho na eficiência da exploração. Entre 1925 e 1930 foram descobertos, novamente nos EUA, 26 grandes campos, utilizando as técnicas de aquisição sísmica (Dutra, 1995).

Até meados da década de 1980 a sísmica 2D, ou bidimensional, foi o tipo mais simples e barato de aquisição de dados sísmicos e foi hegemônica, até iniciar a popularização da sísmica 3D. Praticamente nenhum poço é perfurado atualmente sem que esta decisão esteja embasada em um dado sísmico 3D de qualidade. Isso se dá graças à enorme evolução tecnológica que ocorreu na indústria geofísica da década de 90 até o presente (Vilardo, 2007). Nos últimos anos o setor apostou na sísmica 4D ou *time-lapse*. No entanto, a adoção em larga escala desse tipo de operação não está sendo tão rápida como previsto.

Os períodos de exploração sísmica no Brasil podem ser classificados quanto às características predominantes de ambientes em:

- a) Fase terrestre (1954- 1968),
- b) Fase de águas rasas (1969-1984),
- c) Fase de águas profundas (1984-1998),
- d) Fase mista com licenciamento ambiental (1999-2004).

Os primeiros levantamentos sísmicos marítimos no Brasil ocorreram no ano de 1957, na plataforma continental do estado de Alagoas, sendo a primeira pesquisa sísmica marítima 3D realizada somente em 1978, no Campo de Cherne, na Bacia de Campos. A partir desse ano, a Petrobras intensifica as pesquisas 3D no país, propiciando as primeiras descobertas de campos gigantes em águas brasileiras na década de 80 (Mendonça et al., 2004).

A exploração sísmica da plataforma continental brasileira alcança seu ápice entre os anos 1999 e 2001 após criação do Escritório de Licenciamento das atividades de Petróleo e Nuclear – ELPN/IBAMA em 1998, quando se abre o mercado nacional para as empresas estrangeiras gerando um aumento na demanda por levantamentos geofísicos. A partir de 2001, praticamente não houve mais pesquisa sísmica 2D no país, o que foi indicativo do encerramento da fase de reconhecimento regional da geologia das bacias sedimentares marítimas brasileiras.

No ano de 2004, com a Resolução CONAMA nº 350/04, estabeleceu-se pela primeira vez as diretrizes específicas para o licenciamento ambiental das

atividades de pesquisa sísmica marítima e em zonas de transição, constituindo um importante marco regulatório para o setor.

Os estudos sísmicos nos dias atuais têm crescido muito em função dos avanços no desenvolvimento de algoritmos, associados ao incremento de tecnologias computacionais em que fatores como a comunicação entre processadores se tornou mais eficiente. Dessa forma, torna-se possível alocação de grandes volumes de dados sísmicos, assim como proveito de novos tipos de monitores e óculos para visualização em outras dimensões. Esses aperfeiçoamentos permitem a diminuição do tempo de investigação, assim como uma melhor administração das reservas e economia de recursos.

Jasny (2005) colocou o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial de exploração sísmica entre 2002 e 2005, atrás apenas de Estados Unidos e China e logo à frente da Índia. O estudo afirma que, em conjunto, China, Brasil e Índia responderam por mais de 20% da exploração sísmica mundial nos últimos anos.

# Capítulo 2 - Fauna marinha afetada pela pesquisa sísmica

*Lindy Weilgart*

## 2.1. Introdução

Desde o começo, a história da discussão sobre os impactos da sísmica é marcada por uma grande e justificada incerteza acerca da magnitude e, inclusive, da própria existência destes. Conseqüentemente, as operações geofísicas têm sido objeto de grande polêmica em todo o mundo, e não são poucos os casos de levantamentos interrompidos por ordem judicial.

O ruído gerado pelos canhões sísmicos é o segundo mais alto ruído subaquático produzido pelo homem, seguido das explosões. Para comparar a produção total de energia por ano (em joules) das várias fontes de ruído subaquático produzidas pelo homem, a mais alta é  $2,1 \times 10^{15}$  J, representando a contribuição de explosões nucleares e ensaios de choque de navios (explosões usadas pela Marinha para testar a integridade estrutural de seus navios). Imediatamente após essa contribuição estão os disparos dos canhões sísmicos em  $3,9 \times 10^{13}$  J. Em seguida, há sonares militares ( $2,6 \times 10^{13}$  J) e “supertanques”, navios mercantes e embarcações de pesca em  $3,8 \times 10^{12}$  J (Hildebrand 2005).

Os disparos dos canhões sísmicos produzem sons de 235-263 dB, tão altos quanto terremotos ou vulcões submarinos. Estes “tiros” muito altos e intensos têm um tempo de subida muito “curto”, o que é particularmente prejudicial para os tecidos vivos. O ruído de uma única pesquisa sísmica, usada para descobrir depósitos de petróleo e gás, pode cobrir uma área de 300.000 km<sup>2</sup>, elevando os níveis de ruído em 100 vezes (20 dB) continuamente por semanas ou meses (IWC 2005, IWC 2007). Levantamentos sísmicos são altos o suficiente para penetrar centenas de quilômetros no fundo do oceano. Os disparos com os canhões de ar se dão a cada 10 segundos a cada hora. Nieukirk et al. (2012) analisaram 10 anos de registros da Dorsal Mesoatlântica, descobrindo que as armas sísmicas foram ouvidas a distâncias de 4.000 km dos navios de pesquisa, e estiveram presentes em 80-95% dos dias por mês em mais de 12 meses consecutivos em algumas localidades. Quando várias pesquisas foram gravadas simultaneamente, os sons

das baleias foram mascarados (abafados) e o ruído da arma de pressão tornou-se a parte dominante dos níveis de ruído de fundo (Nieukirk et al. 2012).

Os animais marinhos dependem dos sons para todas as funções vitais, como a procura de alimento, reprodução, comunicação com o grupo e seus filhotes, evitando predadores e perigos, navegando e sentindo seu ambiente. Assim, o ruído sísmico constitui uma degradação generalizada, geralmente em longo prazo, do habitat acústico, que afeta todo o ecossistema marinho, do plâncton aos invertebrados e aos principais predadores, como as baleias. Aproximadamente 30 espécies de mamíferos marinhos, 66 espécies de peixes e 36 espécies de invertebrados, sem contar muitas espécies de plâncton, mostraram-se impactadas pelo ruído. Acredita-se que o ruído contribua para o declínio ou a falta de recuperação populacional de diversas espécies de baleias e é um poluente “transfronteiriço”.

Os impactos documentados do ruído incluem: evitar habitat importante, às vezes durante dias ou semanas; redução do sucesso de forrageamento e alimentação; diminuição da reprodução; diminuição da predação ou percepção de perigo; mascaramento (obscurecimento, obliteração de sons de interesse); mudança na taxa de chamada, potencialmente afetando o acasalamento; perturbação na migração e orientação; fortes respostas de fuga; diminuição das taxas de captura da pesca; desenvolvimento anormal e retardado; Dano ao DNA; aumento do metabolismo; impactos em espécies de presas; dano auditivo; estresse (dano à função imune e reprodutiva) e morte.

## 2.2. Impactos das pesquisas sísmicas marítimas em mamíferos aquáticos

Comumente, os cetáceos mudam suas vocalizações em resposta ao ruído sísmico. As cachalotes nunca foram ouvidas com pulsos sísmicos a 700-1100 km de distância, embora tenham sido ouvidos em 15% das vezes sem presença sísmica (Bowles et al. 1994). As canções das baleias-fin (*Balaenoptera physalus*) mudaram em altas condições de ruído sísmico, com a nota de 20-Hz se tornando mais curta, a largura de banda mais estreita, e a frequência do centro e do pico se tornando mais baixa. As baleias-fin foram deslocadas de seu habitat quando a pesquisa sísmica começou, e o deslocamento durou muito além da extensão da pesquisa sísmica (Castellote et al., 2012). Cerca de 250 machos de baleias-fin

pareciam parar de cantar por várias semanas ou meses durante uma pesquisa sísmica, retomando o canto dentro de horas ou dias após o término da pesquisa (IWC 2007). Supondo que os cantos de machos de baleias-fin tenham uma função reprodutiva, como atrair e encontrar parceiros (Croll et al. 2002), seria difícil acreditar que tal efeito não seria biologicamente significativo. Uma baleia-azul (*Balaenoptera musculus*) parou de cantar na presença de um levantamento sísmico a 10 km de distância (McDonald et al. 1995).

Uma população diferente de baleias-azuis demonstrou a reação oposta. Até mesmo uma pesquisa sísmica usando um dispositivo de baixa e média potência fez com que as baleias-azuis no estuário de St. Lawrence modificassem suas vocalizações (Di Iorio & Clark 2010). As baleias-azuis cantavam consistentemente mais nos dias em que a pesquisa sísmica estava operando do que quando não, e mais durante os períodos nos dias em que o “dispositivo” estava ligado. O número de cantos de baleias-azuis aumentou dentro do bloco de 1 hora após o início da atividade. Os autores postularam que as baleias-azuis estavam tentando compensar a introdução adicional de ruído, e notaram que as baleias provavelmente receberam um nível de ruído razoavelmente baixo. Assim, eles sugeriram que mesmo a fonte de ruído de pesquisa sísmica de baixo nível poderia interferir com sinais importantes usados nas interações sociais e na alimentação (Di Iorio & Clark 2010). Uma tentativa aparentemente similar de compensação ocorreu com as baleias-da-groenlândia (*Balaena mysticetus*). O canto das baleias-da-groenlândia aumentou assim que os pulsos sísmicos foram detectados (Blackwell et al. 2015). À medida que os níveis de ruído sísmico recebidos aumentaram, as taxas de canto das baleias continuaram a aumentar, até estabilizarem, a um nível de 94 dB. Uma vez que os ruídos sísmicos atingiram 127 dB, no entanto, as taxas de vocalização começaram a diminuir. Quando os ruídos atingiram um nível de 160 dB ou acima, as baleias pararam de vocalizar e pareciam “desistir”. Os cantos foram reprimidos dentro de um raio de 50 a 100 km da pesquisa sísmica, o que representa 8.000 a 30.000 quilômetros quadrados de área. Entre 10 e 40 km da pesquisa sísmica, ou entre 300 e 5000 km<sup>2</sup>, a vocalização foi quase totalmente ausente (Blackwell et al. 2015). A vocalização da baleia-da-groenlândia é usada para acasalamento, contato com o grupo ou com jovens e, possivelmente, para navegar por áreas cobertas de gelo em busca de buracos para respirar.

As reações aos canhões sísmicos também podem ser bastante sutis e difíceis de detectar. As cachalotes (*Physeter macrocephalus*) no Golfo do México não pareceram “evitar” uma atividade de pesquisa sísmica, embora reduziram significativamente seu esforço de natação durante a exposição ao ruído, juntamente com uma tendência de redução do forrageamento (Miller et al 2009). Miller et al. (2009) marcou 8 cachalotes com *tags* que gravam sons e movimentos, enquanto expostos a atividades sísmicas. O maior tempo de repouso já observado em qualquer cachalote (265 min) aconteceu com a baleia mais próxima da embarcação sísmica, com a baleia finalmente mergulhando 4 minutos após o pulso final do canhão sísmico. As baleias reduziram significativamente seu esforço em 6% durante a exposição ao ruído sísmico em comparação com o depois, e todas as sete cachalotes que estavam forrageando reduziram seus esforços em mergulhos na presença de ruído sísmico. Além disso, houve indícios de que as tentativas de captura de presas foram 19% mais baixas, mesmo com exposição moderada ao ruído sísmico (Miller et al. 2009). Os autores observaram que mesmo pequenas reduções na taxa de forrageamento podem resultar em taxas reprodutivas mais baixas e ter consequências negativas para a população. Pirotta et al. (2014) encontrou resultados semelhantes com uma espécie muito diferente, a toninha-comum (*Phocoena phocoena*). Eles demonstraram que a probabilidade de registrar uma tentativa de captura de presa declinou em 15% na área exposta ao ruído de levantamento sísmico e aumentou quanto mais longe o navio sísmico estava.

Weir (2008) descobriu que os golfinhos-pintados-do-atlântico (*Stenella frontalis*) demonstraram respostas mais fortes à exposição de canhões sísmicos do que as baleias-jubartes (*Megaptera novaeangliae*) ou cachalotes. Estes golfinhos foram encontrados significativamente mais longe desses canhões quando estavam ligados vs desligados e só se aproximaram da embarcação sísmica quando essas estavam silenciosas. Uma análise das respostas dos cetáceos aos 201 levantamentos sísmicos em águas do Reino Unido apresentou evidências de perturbação (Stone & Tasker 2006). Durante o levantamento sísmico ativo, todos os pequenos odontocetos, baleias-orcas (*Orcinus orca*) e todos os mysticetos foram encontrados a distâncias maiores do navio sísmico do que quando não havia atividade. Os pequenos odontocetos demonstraram um maior distanciamento horizontal, que chegou ao limite da observação visual. As

taxas de observação de mysticetos, cachalotes, baleias-piloto (*Globicephala macrorhynchus*) e orcas não diminuíram quando os canhões de ar estavam desligados, mas mysticetos e orcas demonstraram evitar os ruídos de forma mais localizada. Durante os disparos sísmicos, menos animais pareciam estar se alimentando, os odontocetos menores pareciam nadar mais rápido, e os mysticetos pareciam permanecer por mais tempo na superfície, onde os níveis de som são mais baixos. As reações foram mais fortes para as matrizes sísmicas de maior volume. Stone & Tasker (2006) teorizaram que odontocetos menores podem desocupar a área inteiramente durante a exposição sísmica, enquanto mysticetos de movimento mais lentos podem permanecer na área, simplesmente aumentando sua distância do ruído.

O ruído sísmico tem sido visto como pelo menos causador de declínios ou falta de recuperação de algumas espécies (Weller et al. 2006a, 2006b; IWC 2007). As baleias-cinza ocidentais (*Eschrichtius robustus*), criticamente ameaçadas, ao largo da ilha de Sakhalin, na Rússia, foram deslocadas por pesquisas sísmicas de sua principal área de alimentação, retornando apenas alguns dias após a interrupção da atividade sísmica (IWC 2005). Essa mudança na distribuição seguiu o tempo das pesquisas sísmicas (IWC 2005, 2007; Weller et al. 2006a). Baleias expostas a ruídos sísmicos em suas áreas de alimentação também nadam mais rápido e reto em uma área maior, com taxas de respiração mais rápidas durante as operações sísmicas (Weller et al., 2006b; IWC, 2007). Parente et al. (2007) descobriram uma redução na diversidade de espécies de cetáceos com números crescentes de levantamentos sísmicos durante 2000 e 2001 fora do Brasil, apesar de não haver mudanças oceanográficas significativas neste período. Entre 1999 e 2004, houve uma relação negativa entre a diversidade de cetáceos e a intensidade dos levantamentos sísmicos (Parente et al. 2007).

Quando expostos a uma única arma de ar ou a uma pequena matriz de canhões de ar, as focas-cinzentas (*Halichoerus grypus*) mudavam do comportamento de forrageio para deslocamento. Elas também começaram a sair, possivelmente para escapar do barulho. As focas-comum (*Phoca vitulina*) exibiram uma desaceleração da frequência cardíaca, juntamente com um comportamento drástico de “evitar” e pararam de se alimentar (Thompson et al., 1998).

A atividade de pesquisa sísmica é provavelmente uma causa provável de encalhes e mortes de baleias, especialmente em baleias-bicuda (*Berardius bairdii*)

(Hildebrand, 2005). Um encalhe de dois indivíduos ocorreu muito próximo (no espaço e no tempo) a uma pesquisa sísmica acadêmica no Golfo da Califórnia. Esses indivíduos não puderam ser necropsiados.

É importante notar que, mesmo que necropsiados e com nenhuma evidência de trauma acústico encontrada, as mortes ainda poderiam ser causadas pelo ruído. Os animais podem entrar em pânico e encalhar, o que não mostraria sinais de trauma acústico. Mesmo que os impactos sejam fatais, apenas 2% de todas as carcaças de cetáceos são detectadas, em média (Williams et al. 2011). Os autores afirmam que para eventos de mortalidade críticos, como trauma acústico, métodos analíticos são necessários para levar em consideração a pequena porcentagem de carcaças que serão recuperadas.

Um golfinho-pintado-pantropical (*Stenella attenuata*) sofreu rigidez e instabilidade postural, progredindo para um estado de catatonia e provável afogamento em 600 m de uma pesquisa sísmica 3D disparando em potência máxima (Gray & Van Waerebeek, 2011). Os autores explicaram o comportamento aberrante inicial por uma possível tentativa do golfinho de proteger seu sensível rosto e estruturas auditivas da intensa energia acústica das armas de ar, levantando a cabeça acima da superfície da água. Eles acreditam que a pesquisa sísmica possa ter causado esse comportamento observado, presumivelmente resultante de severo desconforto acústico e até mesmo lesão. Outras explicações foram examinadas e consideradas menos prováveis (Gray & Van Waerebeek 2011). Pode ter significância os achados de Weir (2008), nos quais averiguou de forma intimamente relacionada, que o golfinho-pintado-do-atlântico (*Stenella frontalis*) é a espécie “com a mais evidente resposta” ao ruído de três espécies de cetáceos examinadas.

Os efeitos do estresse ou alterações fisiológicas, se crônicos, podem inibir o sistema imunológico ou comprometer a saúde dos animais. Estes podem ser muito difíceis de detectar em cetáceos. Indicações de aumento do estresse e um sistema imunológico enfraquecido após transmissões de ruído sísmico foram mostradas para uma baleia e um golfinho (Romano et al. 2004). Um ruído alto e impulsivo produzido por uma pistola de água sísmica causou um aumento significativo nos níveis médios de norepinefrina, epinefrina e dopamina imediatamente após uma exposição alta, em uma beluga (*Delphinapterus leucas*) em cativeiro, o mesmo não foi verificado para baixos níveis de exposição (Romano

et al. 2004). Todos esses três hormônios do estresse aumentaram significativamente com o aumento dos níveis de ruído. Estes níveis hormonais permaneceram altos até 1 hora após a exposição ao ruído, o que é surpreendente, dada a sua meia-vida curta, de acordo com os autores. Em um golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) em cativeiro, a pistola de água sísmica produziu valores neuro-imunes significativos, aumentos na aldosterona e uma diminuição nos monócitos. A aldosterona é um dos principais hormônios do estresse em cetáceos e pode superar o cortisol como um indicador mais sensível de estresse (Romano et al. 2004).

Impactos indiretos dos levantamentos sísmicos com canhões de ar também podem ocorrer e até mesmo serem fatais. Heide-Jørgensen et al. (2013) descobriram que os narvais (*Monodon monoceros*) ficaram fatalmente aprisionados no gelo, talvez por atrasarem sua migração, de forma a evitar levantamentos sísmicos que bloqueiam sua rota. Aprisionamentos no gelo durante os anos de levantamentos sísmicos demonstraram um padrão muito atípico de anos passados, ocorrendo em áreas distantes ao norte de onde geralmente se encontram armadilhas de gelo para narvais, indicando que elas permaneceram muito tempo em suas áreas de veraneio costeiras. Em 2008, 1.000 narvais morreram; em 2009, 30 a 100 morreram; e em 2010, 50-100 morreram (Heide-Jørgensen et al. 2013).

O mascaramento pode diminuir drasticamente o espaço de comunicação de animais marinhos, especialmente baleias, que potencialmente podem se comunicar através das bacias oceânicas. O processo de mascaramento também pode impedir que os animais marinhos detectem suas presas ou predadores, se orientem ou percebam o seu ambiente, permaneçam em contato com seus filhotes ou jovens e encontrem parceiros. Modelos matemáticos de mascaramento, através de uma pesquisa sísmica hipotética, mostraram que o mascaramento cumulativo se aproxima de 100% para os sons de baleia franca, enquanto que é de 10 a 60% para as baleias-fin e baleias-da-groenlândia.

### 2.3. Impactos das pesquisas sísmicas em outros grupos taxonômicos

A tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*) e a verde (*Chelonia mydas*) mostram uma forte resposta inicial evitando a matrizes de armas de ar comprimido que

possuim força de 175 dB re 1 $\mu$ Pa rms ou maior (O'Hara & Wilcox 1990; McCauley et al. 2000; Lenhardt 2002).

Tartarugas marinhas também responderam progressivamente menos a disparos sucessivos de armas de ar, podendo isso indicar sensibilidade auditiva reduzida (TTS). Uma tartaruga experimentou um TTS de 15 dB, recuperando-se duas semanas depois (Lenhardt 2002).

McCauley et al. (2000) estimaram que um arranjo de armas de ar típico operando em profundidades de 100–120 m poderia impactar o comportamento a uma distância de cerca de 2 km e evitar cerca de 1 km de distância para tartarugas marinhas.

DeRuiter & Doukara (2010) descobriram que 51% das tartarugas cabeçudas mergulhavam ao chegar ou antes do ponto de maior aproximação de uma matriz de armas de ar.

Em relação aos peixes, uma única pistola de ar sísmica (nível de fonte 222,6 dB p-p re 1 $\mu$ Pa) danificou extensivamente o aparato auditivo do peixe Pargo (*Pagrus auratus*) em distâncias de 5 - 15 m (maior aproximação) a 400 - 800 m (McCauley et al. 2003). Os níveis mais altos equivalentes (abordagem mais próxima) para um grande conjunto sísmico seriam experimentados dentro de 500 m (McCauley et al. 2003). Não se sabe se os peixes estavam sendo mais prejudicados por uma menor quantidade de exposições porém próximas ou por uma maior quantidade, porém em uma distância moderada (McCauley et al., 2003). A distância equivalente para uma grande série sísmica poderia se estender por vários quilômetros. Nenhuma recuperação foi aparente no peixe mesmo 58 dias após a exposição (McCauley et al. 2003).

Uma resposta de estresse bioquímica foi exibida em robalos europeus (*Dicentrarchus labrax*) engaiolados quando uma pesquisa sísmica (2.500 metros cúbicos) passou a distâncias de 180 m a 6.500 m (Santulli et al. 1999). O cortisol no plasma, músculo e fígado aumentou significativamente após a exposição ao ruído sísmico. Outras medidas bioquímicas (glicose, lactato, etc.) também demonstraram uma resposta primária (ex.: cortisol plasmático) e secundária (ex.: glicose sérica e outras medidas sanguíneas) ao estresse, mesmo à distância de 2 km da pesquisa sísmica. A maioria dos valores bioquímicos retornou aos níveis de pré-exposição após 72 horas. Os peixes já demonstraram respostas

comportamentais ao ruído sísmico à distâncias de 2.500 metros (Santulli et al. 1999).

Em resposta a uma pequena pistola de ar (20 in<sup>3</sup>) rebocada para longe (a uma distância de 5 - 800 m), enxaréus (*Pseudocaranx dentex*) engaiolados e pargos (*Pagrus auratus*) mostraram natação acelerada em grupos mais fechados, perto do fundo da gaiola embora os níveis de ruído fossem mais altos nesse local (Fewtrell & McCauley 2012). Com o aumento dos níveis de ruído, o número de respostas de alarme aumentou exponencialmente (Fewtrell & McCauley 2012). Pearson et al. (1992) conduziu um experimento de campo usando um canhão de ar único (100 in<sup>3</sup>) em quatro espécies de peixe-pedra em cativeiro. Eles determinaram que 180 dB re 1  $\mu$  Pa seria o limite geral para respostas de alarme, mas que mudanças sutis de comportamento poderiam ocorrer para exposições tão baixas quanto 161 dB re 1  $\mu$  Pa. Os peixes-pedra azuis (*Sebastes mystinus*) se apertaram firmemente na presença de tiros de canhão de ar, os peixes-pedra negros (*Sebastes melanops*) caíram para o fundo, o peixe-vermelho (*Sebastes miniatus*), assim como o peixe pedra oliva (*Acanthoclinus fuscus*) ficaram paralisados (Pearson et al. 1992).

Wardle et al. (2001) expuseram peixes de recife e invertebrados a 3 armas de ar (volume total de 460 in<sup>3</sup>) com níveis de pico recebidos de 195-218 dB re 1  $\mu$ Pa. Dois peixes palocos (*Pollachius pollachius*) marcados sempre demonstraram reações involuntárias (começando com uma flexão do corpo em uma forma de C, seguida por um espasmo súbito), mas nem peixes nem invertebrados se afastaram do recife. Wardle et al. (2001) sugerem que isso ocorreu porque o recife é seu território familiar e porque as armas de ar não estavam se aproximando, com as consequentes mudanças de intensidade, dando aos animais direções nas quais poderiam escapar. Além disso, populações de peixes associadas a estruturas submersas são mais aptas a serem estacionárias e são menos propensas a se dispersar na presença de ruído de armas de ar do que peixes em bancos pouco expressivos (Wardle et al., 2001).

Engas et al. (1996) usaram o mapeamento por sonar e testes de pesca com redes de arrasto e espinhel 7 dias antes, 5 dias durante e 5 dias após o tiro sísmico para investigar se os levantamentos sísmicos (volume total: 5.000 pés cúbicos) afetaram a abundância do bacalhau (*Gadus morhua* L.) e da arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) ou as taxas de captura. Eles descobriram que os

disparos sísmicos afetaram severamente a distribuição, a abundância e as taxas de captura de peixes em todos os 5.500 quilômetros quadrados na área de estudo. As capturas de arrasto de ambas as espécies de peixe diminuíram em 50% após o disparo. As capturas de espinhel de bacalhau foram reduzidas em 21% (Engås et al. 1996). As reduções nas taxas de captura ocorreram a 33 km da área dos tiros sísmicos, mas as reduções mais dramáticas ocorreram na pequena área de projeção (103 km<sup>2</sup>), onde as capturas de arrasto de arinca diminuíram em 70% e a pesca de espinhel de bacalhau em 45% respectivamente. As taxas de abundância e captura não retornaram aos níveis anteriores à pesquisa durante o período de cinco dias após o encerramento das atividades (Engås et al., 1996).

Løkkeborg et al. (2012) realizaram uma versão posterior do estudo acima, também usando um levantamento sísmico (7.000 in<sup>3</sup> total), com peixes experimentando 140-191 dB re 1μPa. Os testes de pesca começaram 12 dias antes dos disparos sísmicos, duraram 11 semanas e terminaram 25 dias após o encerramento das atividades sísmicas. Løkkeborg et al. (2012) constataram mudanças nas taxas de captura de todas as espécies estudadas. Embora as capturas de emalhe do peixe-vermelho (*Sebastes norvegicus*) e alabote (*Reinhardtius hippoglossoides*) tenham aumentado durante a pesquisa sísmica (aumento de 86% e 132%, respectivamente), as de espinhel caíram para alabote e arinca (16% e 25 % de redução, respectivamente). Os peixes provavelmente responderam às armas de pressão descendo para o fundo, o que os tornaria mais vulneráveis a redes de emalhe de fundo, respondendo pelas taxas mais altas de captura. Quanto mais perto o navio sísmico se encontrava da área do espinhel, mais as capturas de arinca diminuíram (Løkkeborg et al. 2012).

A extensão do arinca e do paloco diminuiu durante o levantamento sísmico e depois, em comparação com o período de pré-exposição, indicando que os peixes maiores tinham maior probabilidade de deixar a área. Durante os disparos sísmicos, os estômagos das arincas capturadas com espinhel também estavam mais vazios, mesmo de presas não móveis. Cada vez mais os palocos, capturados com redes de emalhe, tinham estômagos vazios antes do que durante e após o disparo. Levantamentos sísmicos podem prejudicar a alimentação ou a motivação para encontrar comida em peixes alarmados pelo barulho, sendo responsáveis pelas menores capturas de espinhel.

Apenas o escamudo-do-alasca (*Pollachius virens*) mostrou uma redução na densidade durante e após o levantamento sísmico (Løkkeborg et al. 2012), com peixes especialmente maiores saindo da área de levantamento sísmico. Como o escamudo-do-alasca é encontrado em águas mais rasas do que o peixe-vermelho e o alabote, eles experimentaram níveis mais altos de som, que, juntamente com sua melhor capacidade de audição e natação, podem explicar por que apenas esta espécie deixou a área de levantamento sísmico (Løkkeborg et al. 2012). O alabote e o peixe-vermelho habitam apenas regiões específicas que podem ser a razão pela qual não foram deslocados. As capturas acessórias do Maruca (*Molva molva*) aumentaram após o início do disparo, assim como para os peixes-vermelhos como para os escamudos-do-alasca. Isso pode ser devido ao fato de os peixes responderem às armas de ar sísmicas aumentando sua atividade de natação. O peixe maruca pode ter reagido mais fortemente e mais cedo do que o alabote ou peixe-vermelho porque eles ouvem melhor e estavam em profundidade menor com níveis de som mais altos. Na área de estudo de Løkkeborg et al (2012) o tiro sísmico foi de 1.275 km<sup>2</sup> comparado com Engas et al (1996), com 103 km<sup>2</sup>, assim a taxa de disparo de canhão de ar foi 19 vezes maior em Engas et al. (1996), expondo os peixes a um ruído mais alto e mais contínuo. Em Løkkeborg et al. (2012), os peixes ainda eram propensos a ouvir disparos de armas de pressão durante o período de pesquisa sísmica, independentemente de quão longe eles estavam do navio sísmico.

Løkkeborg (1991) também examinou os efeitos de um levantamento sísmico sobre as taxas de captura de bacalhau (*Gadus morhua*). Ele descobriu que as taxas de captura caíram 55-80% para espinhel dentro da área de levantamento sísmico, provavelmente porque as frequências predominantes de armas de ar coincidem com a faixa de frequência mais sensível do bacalhau (Løkkeborg & Soldal 1993). A extensão espacial e temporal das capturas foi ao longo de uma distância de 9,5 km e durante pelo menos 24 horas (Løkkeborg 1991). Ele observou que uma pesquisa sísmica típica provavelmente teria um impacto maior, considerando o mesmo espaço e tempo, do que essa, já que o pico de pressão desta pesquisa foi de apenas 4-8% de uma pesquisa convencional. Além disso, o bacalhau neste estudo estava migrando, assim, não se esperaria que as capturas caíssem tanto, pois peixes expostos à sísmica seriam substituídos por peixes não expostos. Caso contrário, se o peixes

estivessem parados, o impacto provavelmente teria sido de maior e de mais longa duração (Løkkeborg 1991). As capturas acessórias de bacalhau nas redes de arrasto com camarão caíram 80-85% durante os disparos sísmicos (Løkkeborg & Soldal 1993). A captura acidental de bacalhau na pesca de arrasto para o bacalhau saithe, no entanto, aumentou três vezes e voltou ao normal logo após o término da pesquisa sísmica. No entanto, neste caso, o levantamento sísmico foi de apenas 9 horas de duração, interrompido devido ao mau tempo (Løkkeborg & Soldal 1993).

Skalski et al. (1992) usaram uma única pistola de ar de 100 in<sup>3</sup> para expor 3 espécies de peixe-pedra (*Sebastes chlorostictus*, *S. goodie* e *S. paucispinis*) a pressões de pico de 186 dB re 1 µPa no campo para determinar o efeito do ruído sísmico na pesca com anzol e linha. Eles descobriram uma redução média da captura por unidade de esforço de 52% em relação aos controles, traduzindo-se em uma perda econômica média de 50% (Skalski et al., 1992). Hassel et al. (2004) mostraram uma queda de 2 a 3 semanas nas taxas de desembarque de capturas de enguias menores (*Ammodytes marinus*) após um levantamento sísmico de 2 dias e meio. Os peixes exibiram o comportamento de flexão corporal em formato de C, sinal de medo e perturbação, durante os disparos sísmicos, mas nenhum efeito imediatamente letal foi observado. Hirst & Rodhouse (2000) revisaram a literatura sobre os impactos sísmicos dos canhões de ar no sucesso da pesca. Eles concluíram que, naquele momento, os níveis mais baixos de disparos de armas de ar no oceano aberto que produziam uma reação comportamental que alterava as taxas de captura eram menores que 160 dB re 1µPa (Hirst & Rodhouse, 2000).

Slotte et al. (2004) usaram um levantamento sísmico (3.000 metros cúbicos), com duração de 12 dias, para examinar a abundância e distribuição de peixes dentro da área dos disparos e nas águas circundantes, de 30 a 50 km de distância. Usando o sonar, eles descobriram que a abundância de arenque (*Clupea sp.*), verdinho (*Micromesistius poutassou*) e outros peixes mesopelágicos (que ocupam as profundezas médias do oceano aberto) era maior do que dentro da área dos disparos sísmicos, indicando um efeito de longo prazo do levantamento sísmico (Slotte et al. 2004). Também houve indicações de que tanto o verdinho quanto espécies mesopelágicas foram encontradas em águas mais profundas durante o disparo, sugerindo que os peixes estavam evitando o ruído

verticalmente, em vez de horizontalmente, no curto prazo (Slotte et al. 2004). Paxton et al. (2017) analisaram a abundância de peixes usando vídeos de um recife próximo a um levantamento sísmico. O recife provavelmente experimentou ruído sísmico de 181-220 dB re 1 $\mu$ Pa. Durante o levantamento sísmico, a abundância de peixes de recife declinou em 78% à noite, enquanto nos três dias anteriores, sem ruído sísmico, o uso do habitat pelos peixes foi maior (Paxton et al. 2017). Assim, o padrão de uso dos recifes pelos peixes a noite foi interrompido. Paxton et al. (2017) vão além de descrever as respostas de peixes individuais. Eles mostram a reação de uma comunidade inteira de espécies a um levantamento sísmico. Se os peixes perdem oportunidades de agregar, seu forrageamento, acasalamento e outras funções vitais podem ser afetados (Paxton et al. 2017).

Em relação aos invertebrados, larvas de vieiras (*Pecten maximus*) em tanques submetidos a gravações de pulsos de arma sísmica exibiram atrasos de desenvolvimento significativos e 46% desenvolveram malformações do corpo em comparação com controles (Aguilar de Soto et al. 2013). Nenhuma malformação foi encontrada nas 4.881 larvas controle examinadas. Disparos sísmicos foram registrados a dezenas de quilômetros de distância de uma pesquisa sísmica e a duração total da exposição foi de 90 horas de pulsos a cada 3 s. Esse dano inequívoco pode ocorrer a grandes distâncias, afetando potencialmente de dezenas a centenas de quilômetros quadrados e, portanto, a sobrevivência dos jovens até a idade adulta na natureza, prejudicando os estoques de vieiras (Aguilar de Soto et al. 2013).

McCauley et al. (2017) descobriram que até mesmo o zooplâncton microscópico, especialmente os imaturos, pode ser morto por tiros de uma única arma sísmica. O zooplâncton fornece não apenas uma fonte essencial de alimento para as baleias, mas também sobre o qual depende todo o ecossistema oceânico, de peixes a invertebrados maiores (ostras, moluscos, caranguejos, camarões) e aves marinhas. Uma grande zona morta ou “buraco” na abundância do zooplâncton se formou depois que um único canhão de ar passou; os números de organismos foram cortados mais da metade na maioria das espécies (McCauley et al. 2017). Todos os krill imaturos foram mortos. Um terço das espécies de zooplâncton mostraram decréscimos em número de mais de 95%. Em geral, a arma de pressão sísmica causou um aumento de 2-3 vezes no zooplâncton morto,

em comparação com os controles. Esses impactos se estenderam em pelo menos 1,2 km, que foi o alcance máximo estudado. O "buraco" do zooplâncton pode ser detectado via sonar 15 minutos depois que a arma de ar passou e foi observado que continuava a expandir até cerca de 1 hora e 30 minutos depois. Deve ser lembrado que a maioria das pesquisas sísmicas consiste de 18-48 armas de ar com volumes de ar totais de 3.000 a 8.000 in<sup>3</sup> contra uma única pistola de ar de apenas 150 in<sup>3</sup> utilizada neste experimento. McCauley et al. (2017) concluem que seus resultados têm “enormes ramificações para [...] a saúde dos oceanos” dado o longo tempo e a escala espacial dos levantamentos sísmicos.

Em 2001, cinco massas de lulas gigantes (*Architeuthis dux*) ficaram encalhadas em uma área localizada ao norte da Espanha (Guerra et al. 2004). Dois anos depois, mais quatro massas de lulas gigantes foram encontradas encalhadas ou flutuando na mesma área. Todos esses nove encalhes, alguns deles vivos, ocorreram juntamente com levantamentos sísmicos geofísicos usando armas de ar comprimido (Guerra et al. 2004). Mesmo externamente, eles não demonstraram nenhuma causa óbvia de morte, a lula tinha ferimentos internos maciços. Duas das lulas sofreram “danos extensos às fibras musculares internas, seus estômagos foram arrancados e seus tratores digestivos foram mutilados.” (Guerra et al. 2011). Alguns também mostraram danos substanciais aos seus estatocistos, deixando-os efetivamente desorientados. Como resultado, esses animais, normalmente de águas profundas, poderiam ter flutuado para águas superficiais mais quentes, onde, por causa da química do sangue, perderam oxigênio, potencialmente causando sua morte (Guerra et al. 2004). Na Austrália Ocidental, uma pequena pistola de ar (20 metros cúbicos) foi rebocada para longe (a uma distância de 5 a 800 m) de uma lula de cativo (*Sepioteuthis australis*) (Fewtrell & McCauley, 2012). A lula respondeu aos níveis de ruído recebidos (168-173 dB re 1 µPa pico médio) com respostas de alarme, ejetando tinta, agregando em partes da gaiola mais afastadas da pistola de ar, mostrando agressão e mudando de cor. Nos níveis mais altos de ruído, a lula exibia jateamento e expansão instantânea do grupo, e então ficava parada perto da superfície, onde os níveis de ruído eram 12 dB mais baixos (Fewtrell & McCauley 2012). Como os níveis de ruído aumentaram, o número de respostas de alarmes aumentou exponencialmente (Fewtrell & McCauley 2012).

Um extenso estudo de campo de Day et al. (2017) em vieiras da Tasmânia (*Pecten fumatus*) utilizou pistolas de ar de 45 ou 150 in<sup>3</sup>, simulando a passagem de um grande arranjo de canhão de ar e operando em 30-100 m de profundidade de água passando dentro de 114-875m dos animais testados. Houve também uma “agitação” de alta amplitude do fundo do mar. O número cumulativo de mortalidades e a probabilidade de mortalidade foram significativamente maiores quanto mais à arma passou pelas vieiras em experimentação, após um máximo de 120 dias após a exposição (Day et al. 2017). Mortalidades foram de até 20% em vieiras submetidas a quatro passagens da arma de ar, em comparação com uma taxa de mortalidade de 4-5% nas vieiras de controle. O ruído sísmico perturbou substancialmente os padrões comportamentais e as respostas reflexas; essas alterações nas respostas reflexas persistiram por pelo menos 120 dias após a exposição (Day et al. 2017). Esses reflexos anormais podem indicar danos aos órgãos mecanossensoriais, que poderiam comprometer severamente as vieiras, com ramificações ecológicas (Day et al. 2017). As vieiras também foram imunocomprometidas, uma das principais causas de mortalidade em bivalves, em escalas de tempo crônicas (meses). A exposição a armas de ar interrompeu cronicamente sua fisiologia e bioquímica, causando desequilíbrios em seus eletrólitos que podem afetar uma variedade de funções celulares (Day et al. 2017). No geral, os levantamentos sísmicos afetaram as vieiras, tanto comportamentalmente quanto fisiologicamente, menos capazes de lidar com estressores adicionais, como dragagem, água quente ou estresse de predação. Os impactos foram provavelmente devido a grandes vibrações e aceleração de partículas no fundo do mar a partir do sinal de ar comprimido (Day et al. 2017). Bivalves como as vieiras melhoram a qualidade da água através da biofiltração, aumentando a luz disponível para as plantas subaquáticas e diminuindo a eutrofização, enquanto ajudam a alimentar outros organismos bênticos através da deposição de matéria orgânica da coluna de água. Como tal, os impactos em seu bem-estar podem comprometer os serviços ecossistêmicos.

Utilizando métodos semelhantes aos acima, com exposições médias estimadas equivalentes à passagem de um grande arranjo de canhão a ar comercial (2000-4000 In<sup>3</sup>) dentro de uma faixa de 500 m, experimentos de campo foram conduzidos em lagostas do sul (*Jasus edwardsii*) (Fitzgibbon et al. 2017). O ruído sísmico reduziu consistentemente a contagem total de hemócitos (CTH) em

23-60%, de forma prolongada por até 120 dias após a exposição, sugerindo uma redução crônica da competência imunológica. Em contraste, após 365 dias pós-exposição, os níveis de THC mais que dobraram o que poderia significar uma resposta imune à infecção (Fitzgibbon et al. 2017). Também houve sinais de comprometimento crônico do estado nutricional 120 dias pós-exposição. A sobrevivência não foi afetada, talvez, porque as lagostas tiveram acesso a fontes alimentares abundantes e nutricionais no experimento, e esses foram conduzidos em condições ambientais favoráveis, mas, na natureza, um prejuízo na capacidade imunológica e condição nutricional poderiam ter consequências muito maiores para sua sobrevivência e reprodução (Fitzgibbon et al. 2017). A lagosta americana (*Homarus americanus*) aumentou seu forrageio e busca por alimento várias semanas depois de ter sido exposta a armas de ar no laboratório (Payne et al. 2008).

Solan et al. (2016) mostraram que tanto o ruído impulsivo quanto o contínuo de banda larga reprimiram o comportamento de enterramento e bioirrigação (ou a circulação de água dentro de tocas de lagosta) e reduziram o movimento na lagosta da Noruega. O molusco de Manila mostrou uma resposta ao estresse, em que os indivíduos se mudavam menos, ficavam no topo do leito do mar e fechavam suas válvulas. Tais respostas significaram que os moluscos não conseguiam misturar as camadas superiores de sedimento e não podiam se alimentar. Como resultado, as propriedades do ecossistema foram afetadas (Solan et al. 2016). Alguns moluscos individuais também acumularam lactato devido a manter suas válvulas fechadas por um longo período de tempo, um comportamento conhecido de “evitação” que requer que o animal respire anaerobicamente. Se a exposição ao som, que foi de sete dias, tivesse continuado por muito mais tempo, esses níveis de lactato teriam sido prejudiciais (Solan et al., 2016). O ruído alterou assim o transporte de fluidos e partículas que os invertebrados fornecem que são fundamentais para a ciclagem de nutrientes no fundo do mar. Os autores observam que “... expor os ambientes costeiros a campos sonoros antropogênicos provavelmente terá consequências ecossistêmicas muito mais amplas do que são atualmente reconhecidas” (Solan et al., 2016). Este estudo mostra que as respostas ao ruído podem ser sutis e podem levar longos períodos de tempo para se tornarem detectáveis no nível da população ou do ecossistema.

## Seção II – Procedimentos para avaliação de impacto da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos

---

# Capítulo 1 - Fundamentos da avaliação dos impactos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos

*Daniel Solon Dias de Farias*

*Aline da Costa Bomfim*

*Simone Almeida Gavilan*

*Flávio José de Lima Silva*

Antes de se obter amostras dos animais mortos, deve-se considerar o estágio de decomposição da carcaça, para determinar a viabilidade da avaliação do possível efeito da pesquisa sísmica sobre um animal.

Tratando-se de mamíferos marinhos (e mais recentemente adaptado para tartarugas marinhas), para animais vivos utiliza-se o código 1 na classificação, já para animais mortos, a classificação varia entre os códigos 2 e 5 (Geraci; Lounsbury, 1993).

O código 2 é utilizado para carcaças em boas condições, apresentando as seguintes características:

- a) Aparência normal, geralmente com poucos danos causados por animais necrófagos;
- b) Cheiro fresco;
- c) Mínima desidratação e pouco enrugamento da pele, olhos e mucosas;
- d) Ausência de inchaço da carcaça, língua e pênis não se encontram protundidos; gordura firme e clara;
- e) Músculos firmes, bem definidos e de coloração vermelho-escura;
- f) Células sanguíneas intactas, passíveis de serem coletadas em tubos de ensaio;
- g) Soro não hemolisado;
- h) Vísceras intactas e bem definidas;
- i) Intestino contendo pouco ou nenhum gás;
- j) Cérebro firme, sem descoloração, com formato superficial distinto e passivo de ser removido intacto.

O código 3 é utilizado para a carcaça quando encontrada em:

- a) Estado razoável, intacta, mas com inchaço evidente (língua e pênis protundidos);
- b) Pele rachada e despregada;
- c) Possíveis danos por necrófagos;
- d) Odor moderado característico; mucosas desidratadas, olhos fundos ou faltando;
- e) Gordura tingida de sangue e oleosa;
- f) Musculatura macia e mal definida;
- g) Sangue hemolisado, vermelho-escuro; vísceras macias, friáveis, manchadas, mas ainda intactas;
- h) Intestino dilatado pela presença de gás;
- i) Cérebro mole, aspecto superficial distinto, frágil, mas geralmente ainda pode ser removido intacto.

O código 4 é utilizado quando:

- a) A carcaça apresenta-se em decomposição avançada, podendo estar intacta, mas colapsada;
- b) Pele solta, a epiderme dos cetáceos pode estar completamente perdida;
- c) Frequentemente se encontram danos severos ocasionados por necrófagos;
- d) Odor forte;
- e) Gordura macia, frequentemente com bolsa de gás e poças de óleo;
- f) Musculatura próxima da liquefação e facilmente rasgável, destacando-se facilmente dos ossos;
- g) Sangue ralo e escuro;
- h) Vísceras frequentemente podem ser reconhecidas, mas estão friáveis, facilmente rasgáveis e de difícil dissecação;
- i) Intestino preenchido com gás;
- j) Cérebro mole, vermelho-escuro, contendo bolsas de gás e consistência semelhante a um pudim;
- k) Limitado histórico do animal.

O código 5 é utilizado para:

- a) Carcaça mumificada, ou restos de esqueleto, podendo a pele estar cobrindo partes do esqueleto remanescente;
- b) Mas com qualquer tecido restante estando desidratado.

Para tartarugas marinhas, apesar de não existir um protocolo específico e padronizado, tem-se utilizado as definições de cada código definido para mamíferos marinhos, fazendo-se adequações para a avaliação do estado de conservação das carcaças.

Quanto mais fresca a carcaça (código 2 e/ou 3) melhor a identificação dos indícios de impactos causados pela atividade de pesquisa sísmica. Porém, visto que os acessos a carcaças de, principalmente mamíferos marinhos, são importantes fontes de conhecimento, acreditamos ser necessária à exploração de toda carcaça que venha a encalhar em praias adjacentes as atividades de pesquisa sísmica.

## Capítulo 2- Técnicas e procedimentos para a coleta e interpretação de material biológico para análise da Síndrome de Embolia Gasosa e Gordurosa.

*Yara Bernaldo de Quirós*

*Marina Arregui*

*Óscar González-Díaz*

*Josué Díaz-Delgado*

*Antonio Fernández*

### 2.1-Considerações Gerais

A “síndrome da embolia gasosa e gordurosa”, assim como a doença descompressiva, vem sendo descrita em baleias-bicuda (*Ziphius cavirostris*) encalhadas em associação temporal e espacial com exercícios militares (Jepson et al., 2003; Fernández et al., 2005). Uma avaliação qualitativa da quantidade de gás presente na carcaça (índice de gás) juntamente com a análise dos componentes das bolhas de gás, pode ajudar a discriminar se foram os gases produzidos pela descompressão ou por outras origens (como o metabolismo bacteriano), contribuindo significativamente para o diagnóstico da doença descompressiva (Bernaldo de Quirós et al., 2011; Bernaldo de Quirós et al., 2016).

O índice de escore gasoso é um método de diagnóstico acessível e de baixo custo para todas as redes de encalhes de mamíferos marinhos em todo o mundo, tendo como função avaliar a quantidade e a topografia do gás encontrado em diferentes localizações vasculares e extravasculares em cetáceos encalhados. Este método permite comparar escores gasosos entre diferentes animais com o mesmo código de decomposição. Dessa forma, pode-se estabelecer uma "baseline" para cada código de decomposição, e assim os escores de gás anormalmente altos podem ser facilmente identificados.

Este método é extremamente útil quando um animal não pode ser colocado em um *scanner* de tomografia computadorizada antes da necropsia por razões logísticas (e econômicas). Por se tratar de um índice um tanto subjetivo, é

altamente recomendável que cada rede desenvolva sua própria linha de base de escore de gás (Bernaldo de Quirós et al., 2016).

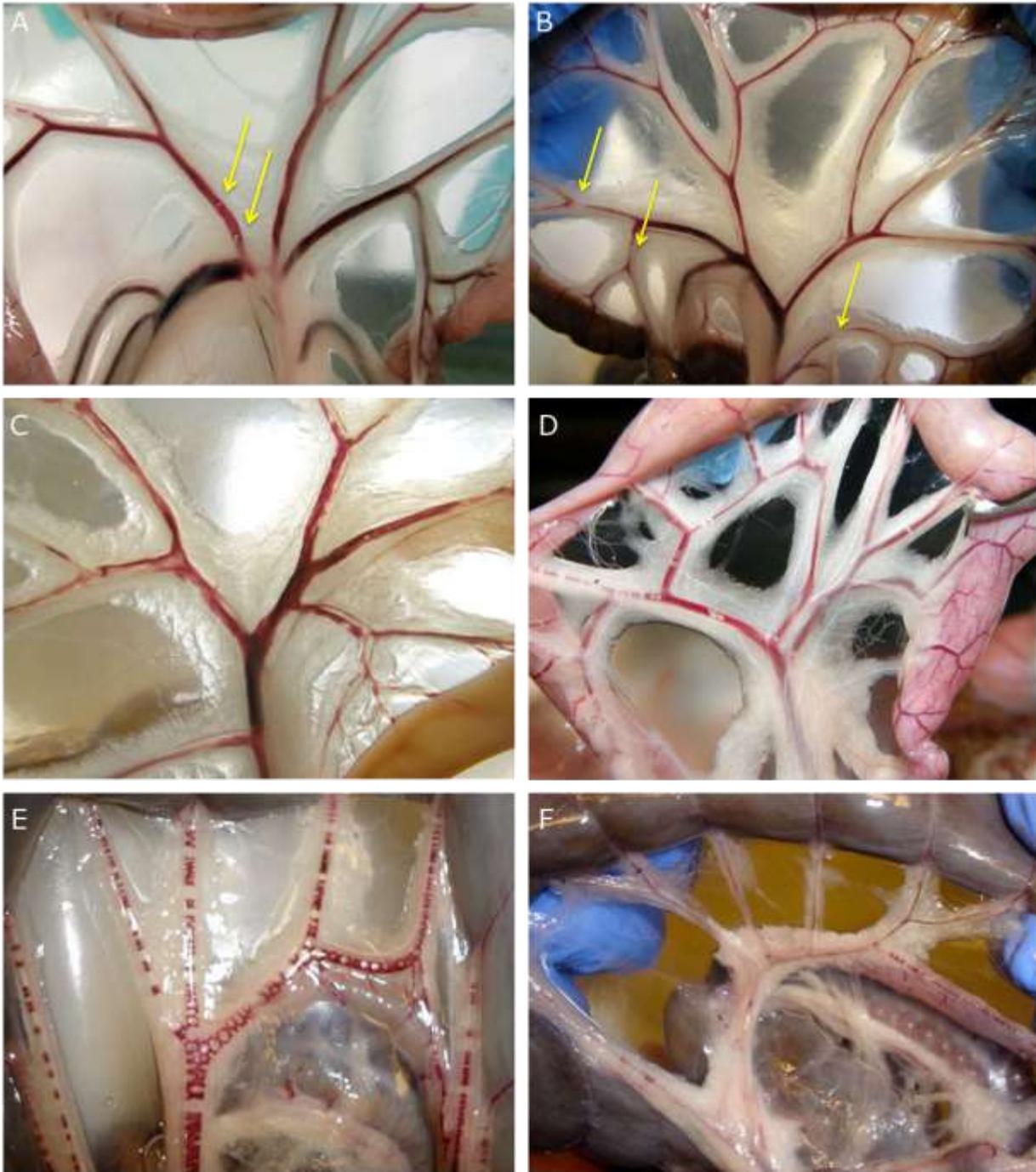
Este método consiste em identificar e registrar um escore gasoso de 0 a VI em veias visíveis de pequeno a grande calibre em diferentes localizações anatômicas: subcutânea, mesentérica, coronariana, veias renais e plexo venoso lombo-caudal. Os locais extravasculares são graduados de 0 a III. O escore total do gás é calculado como a soma dos escores de gás para cada localidade (Bernaldo de Quirós et al., 2013; Bernaldo de Quirós et al., 2016).

Os escores de gás para localizações intravasculares são definidos da seguinte forma:

- a) "0" é a ausência de bolhas de gás dentro da veia;
- b) "I" é a presença ocasional de uma pequena bolha;
- c) "II" é a presença de bolhas muito pequenas e dispersas, ou pequenas "descontinuidades de sangue" (pequenos segmentos de veias quase colapsadas e sem gás);
- d) "III" é a presença de descontinuidades de sangue mais abundantes e maiores;
- e) "IV" é a presença moderada de bolhas de gás (é possível contá-las);
- f) "V" descreve a presença abundante de bolhas de gás, o que torna difícil a contagem;
- g) "VI" é a presença de segmentos completos dos vasos, preenchidos com gás.

Os escores gasosos para gás extravascular, geralmente apresentado como gás subcapsular, são definidos como:

- a) "0" é ausência de gás;
- b) "I" é presença escassa (afetando apenas um órgão);
- c) "II" é presença moderada (afetando dois ou três órgãos);
- d) "III" é a presença abundante de gás que afeta quatro ou mais órgãos.



*Figura 1: Ilustrações de escore gasoso nas veias mesentéricas de coelhos brancos da Nova Zelândia: A) escore de gás I, B) escore de gás II, C) escore de gás III, D) escore de gás IV, E), escore de gás V, e F) escore de gás VI.*

A análise da composição dos gases fornecem resultados objetivos, mas requer o uso de materiais específicos e apresenta sensibilidade ao tempo: as

amostras de gás devem ser analisadas dentro de duas semanas (Bernaldo de Quirós et al., 2011).

Se for necessário enviar para um laboratório para análise, isso deve ser feito por terra ou enviado em uma caixa de plástico resistente a pressões negativas.

Esses métodos não são válidos se a cabeça já tiver sido removida da carcaça antes da definição do escore gasoso ou da amostragem do gás. Da mesma forma, a ruptura dos vasos de grande calibre interno ante ou *perimortem* ou o corte inadvertido durante o exame bruto *pós-morte* podem impedir esses métodos. Além disso, o uso de material inadequado pode comprometer as amostras.

Assim, é necessário usar alguns materiais específicos, como tubos de vidro a vácuo de marcas e fabricantes específicos, além de fazer a dissecação em uma sequência adequada. Segue descrita abaixo uma lista de materiais necessários para a amostragem de gás e um breve resumo das etapas mais importantes do protocolo para classificação e amostragem de gás.

Um protocolo passo a passo com mais detalhes pode ser encontrado em Bernaldo de Quirós et al. (2012), incluindo instruções sobre como usar um aspirômetro para coletar gás das câmaras cardíacas.

Além disso, no Apêndice 1, é possível encontrar uma descrição dos passos necessários para coleta do escore gasoso e amostragem de gás, e no Apêndice 2 um resumo de uma página do protocolo, para ser impresso e utilizado como orientação durante as necropsias. Para mais informações sobre a metodologia de amostragem e análise de gases, consulte Bernaldo de Quirós et al. (2011), e para a técnica de pontuação de gás, ver (Bernaldo de Quirós et al., 2013; Bernaldo de Quirós et al., 2016). Este protocolo está sujeito a melhorias contínuas, através do acesso a versão atualizada deste protocolo em: [www.iusa.eu](http://www.iusa.eu).

Além da embolia gasosa, a presença de embolia gordurosa foi descrita em baleias-bicuda encalhadas em associação com exercícios militares (Jepson et al., 2003; Fernández et al., 2005). A embolia gordurosa é descrita como o bloqueio de vasos sanguíneos por partículas de gordura circulantes (Hulman, 1995). O pulmão é o órgão tipicamente selecionado para detectar êmbolos gordurosos à medida que a gordura que entra na circulação venosa fica facilmente aprisionada dentro da microvasculatura pulmonar com diâmetro inferior a 20 µm (Levy, 1990).

As substâncias lipídicas são frequentemente solúveis no processamento de solventes (empregados para embutir tecidos em parafina para exame microscópico), portanto, devem ser pré-fixados antes que o tecido seja tratado com esses solventes. A pré-fixação com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) é uma técnica tradicionalmente utilizada (Abramowsky et al., 1981). Esta técnica provou detectar com sucesso os êmbolos de gordura nos pulmões, mesmo em tecidos decompostos/autolisados e/ou tecidos fixados em formaldeído por longos períodos de tempo (observações pessoais).

O protocolo aqui proposto para a demonstração histológica de material lipídico por meio da fixação de tetróxido de ósmio é uma atualização do protocolo desenvolvido por Abramowsky et al. (1981).

## 2.2-Amostragem e análises de presença de gás em tecidos de mamíferos aquáticos

### 2.2.1-Lista de material necessário para amostragem de gás

- a) Tubos a vácuo: Tubos de vidro de 5 mL BD vacutainer ® isentos de aditivos ou Tubos de vidro MONOJECTTM Red Stopper (com revestimento de silicone) de 2 mL (ref # 8881301116). Os tubos devem apresentar exatamente estas especificações, pois nenhuma outra marca ou material foi validado para esta metodologia. Este é o material mais importante necessário para adquirir. É nesse momento que se armazena o gás, mas também pode ocorrer sua perda. A maioria dos tubos evacuados é feita de plástico, e o plástico não é bom para o armazenamento de gás.
- b) Suportes de Tubo de Uso Único: BD Vacutainer ® (ref # 36481), ou equivalente em outra marca.
- c) Agulhas de pontas duplas: Agulhas de coleta de sangue BD Vacutainer (ref # 367210), ou seu equivalente em outra marca, mas o lado da perfuração do tubo das agulhas deve ter uma barreira de borracha encoberta.
- d) Seringas para Insulina Descartáveis: Insulina BD Plastipak U-100 (ref # 329651). As seringas devem apresentar exatamente estas especificações, pois nenhuma outra marca ou material foi validado para esta metodologia.

### 2.2.2-Protocolo para escore e amostragem de gás:

É muito importante que nenhum órgão seja cortado ou removido antes da contagem e da amostragem de gás. Após amostragem de gás, o protocolo de necrópsia pode prosseguir.

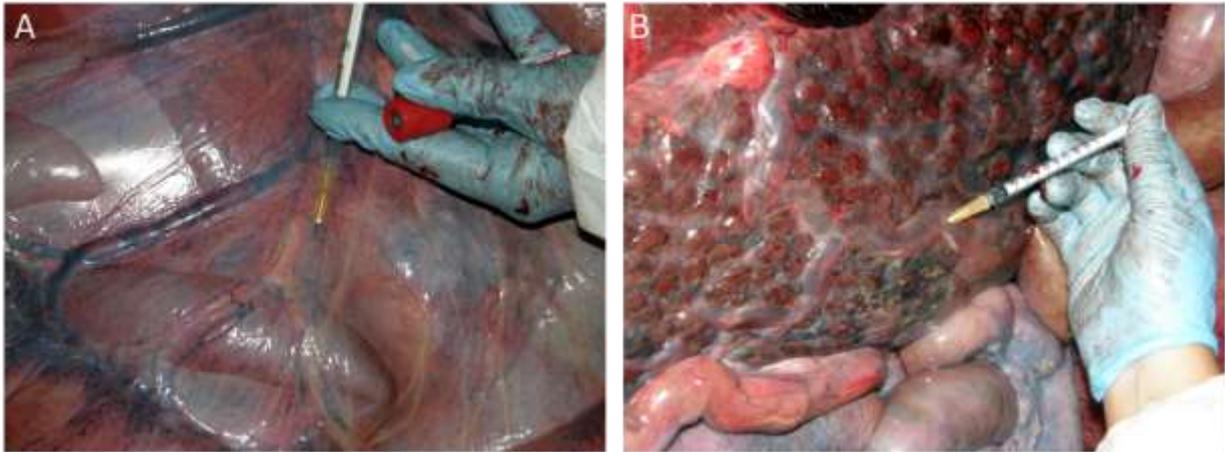
- a) Retirar com cuidado a pele e a gordura, minimizando os danos nas principais veias subcutâneas (Fig. 2A).
- b) Examinar as maiores e visíveis veias subcutâneas quanto a presença bolhas de gás e atribuir um escore gasoso (ver apêndice 2). Sempre registrar com fotos para demonstrar o escore de gás.



Figura 2: A) Remoção cuidadosa da pele e da gordura de uma baleia-bicuda (Ziphius cavirostris), B) visão aproximada das veias subcutâneas.

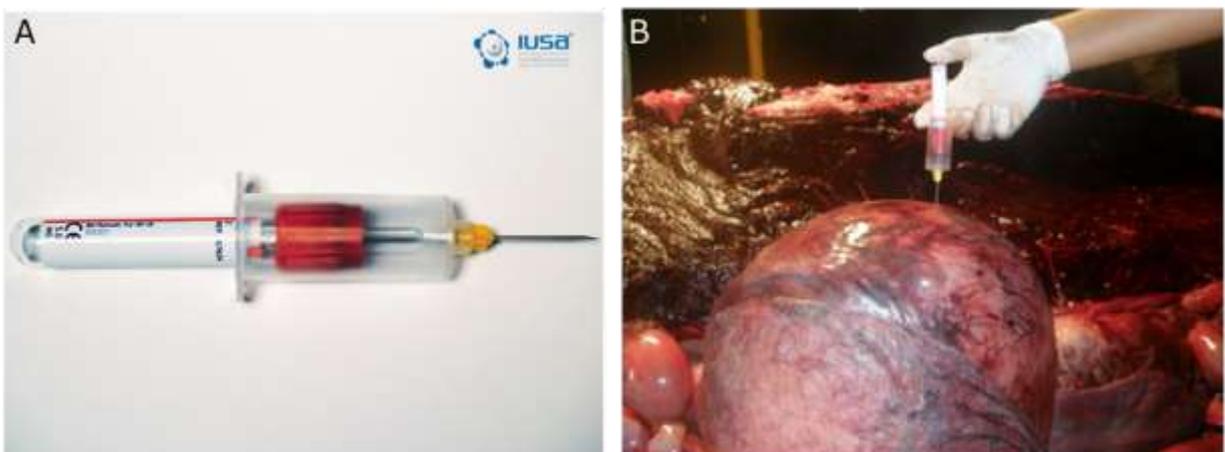
- c) Abrir as cavidades abdominal e torácica. Não cortar ou remover nenhum órgão ainda.
- d) Examinar e atribuir uma pontuação gasosa a cada um desses locais, registrando com fotos:
  - As veias mesentéricas;
  - O plexo venoso lombo-caudal e veias renais;
  - As veias coronárias, atribuindo uma pontuação de gás para cada um desses locais.
- e) Retirar amostras de até 5 bolhas de cada um desses locais. coletar amostras extras se observar bolhas em outros locais. Priorizar a coleta de amostras da vasculatura torácica. Coletar amostras de bolhas usando a seringa de insulina e injetar imediatamente o conteúdo nos tubos. Usar

uma nova seringa e um novo tubo para cada amostra de bolhas de gás (Fig. 3).



*Figura 3: A) Amostragem de bolhas de gás nas veias mesentéricas, B) Amostragem de bolhas de gás encontradas nas veias perirrenais.*

- f) Coletar amostras de gás intestinal das secções do intestino proximal, medial e distal, aplicando os tubos diretamente com as agulhas de pontas duplas acopladas aos porta-tubos de uso único.
- g) Coletar amostras de gás subcapsular, se presente, conforme descrito para o gás intestinal.



*Figura 4: A) Apresentação dos tubos evacuados de vidro com agulha de ponta dupla acoplada a um porta-tubo, B) Amostragem de gás de uma câmara gástrica.*

- h) Rotular cada tubo com a localização e a quantidade de amostras de gás (consulte o Apêndice 1).
- i) Rotular pelo menos três tubos vazios do mesmo pacote para controle.
- j) Armazenar os tubos com amostra e controle, à temperatura ambiente, de preferência com a tampa voltada para baixo.
- k) A análise deve ser realizada dentro de duas semanas e se enviado por aeronaves, utilizando um invólucro de plástico resistente a pressões negativas.

É possível analisar as amostras de gás em qualquer laboratório montado com um cromatógrafo a gás, equipado com um detector de condutividade térmica e um detector de ionização de chama dispostos um após o outro, e uma coluna CP7430 da Varian, seguindo o método descrito em Bernaldo de Quirós et al. (2011).

### 2.3-Coleta de material e análises histoquímica de êmbolos lipídicos

#### 2.3.1-Lista de material necessário para a pré-fixação com tetróxido de ósmio:

- a) Limpador ultrassônico: Buehler Ltd Ultramet® III Sonic Cleaner, ou equivalente.
- b) Ampola de tetróxido de ósmio 1 g: Aname® (ref # 19100), ou equivalente.
- c) Ácido periódico, 25 g: Aname® (ref # 19325), ou equivalente.
- d) Cristal de ácido píxico, ACS, 100 g: Aname® (ref # 19550), ou equivalente.
- e) Plataforma de balanço WT15: Biometra®, ou equivalente.
- f) Casseter de processamento de tecidos para identificar as amostras: Cateteres macros azuis AD DiagNost SA (ref. 720-2237), ou equivalente. Outros sistemas de identificação podem ser usados para identificar adequadamente cada amostra de pulmão.
- g) Frascos de vidro de borosilicato transparentes de boca larga.
- h) Tigela de aço inoxidável.
- i) Pinças de aço inoxidável.
- j) Folha de alumínio.
- k) Freezers para blocos de gelo.

A ampola de OsO<sub>4</sub>, bem como todo o material de laboratório (garrafas, taças, pinças e etc) que estará em contato com o tetróxido de ósmio, deve ser previamente lavado com ácido nítrico (para evitar a contaminação) e enxaguado várias vezes com água destilada.

### 2.3.2-Protocolo de pré-fixação com tetróxido de ósmio para demonstração histoquímica de êmbolos lipídicos

- Aparar os tecidos pulmonares fixados em formalina em amostras de  $\approx 1$  mm de espessura para garantir uma penetração adequada do reagente. Colocar as amostras em Cateteres de processamento de tecidos corretamente identificadas (Fig. 5A).
- Diluir o tetróxido de ósmio em água destilada para obter uma solução aquosa de OsO<sub>4</sub> a 1% por sonicação.
- Lavar as amostras por 20 min em água corrente (Fig. 5B), seguido por 10 min em água destilada.

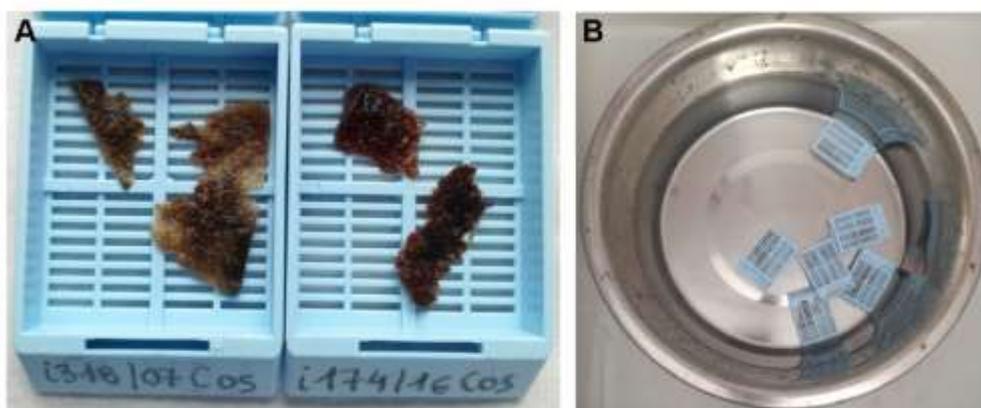
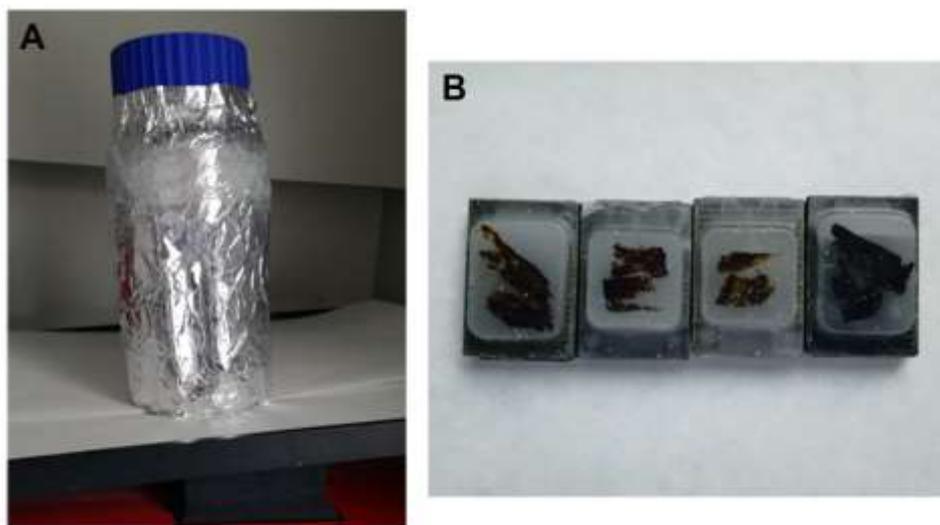


Figura 5: A) Detalhe das amostras de pulmão de  $\approx 1$  mm de espessura, B) Amostras sendo lavadas em água corrente

- Colocar as amostras na solução de OsO<sub>4</sub> dentro de um frasco de vidro de borossilicato hermeticamente selado e coberto com folha de alumínio com agitação contínua por duas horas (Fig. 6A).
- Lavar as amostras em água corrente por 30 min.
- Preparar uma solução de ácido periódico a 1% (em água destilada).

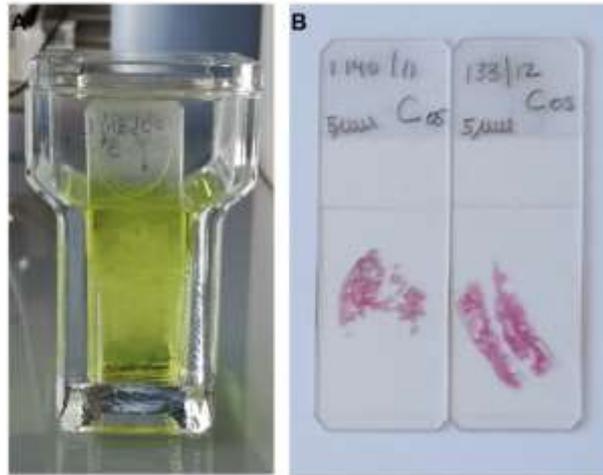
Preparar apenas antes de usar.

- d) Colocar as amostras na solução de ácido periódico a 1% em agitação até que o tecido ósseo escuro seja uniformemente limpo (aproximadamente 30 min).
- e) Lavar as amostras em água corrente por 30 min.
- f) Lavar as amostras várias vezes com água destilada.
- g) Processar e incorporar as amostras como de costume em cera de parafina (Fig. 6B).



*Figura 6: A) Amostras em completa escuridão dentro de solução de OsO<sub>4</sub> a 1% sob agitação, B) Detalhe das secções de parafina obtidas.*

- a) Cortar secções de tecido com 5  $\mu\text{m}$  de espessura no micrótomo e monte em lâminas de vidro.
- b) Introduzir as lâminas previamente desparafinados em uma solução de ácido pícrico a 1% (preparada com etanol a 96%) por 24 h (Fig. 7A).
- c) Enxaguar as amostras em água corrente até que não haja pigmento amarelo nas lâminas.
- d) Lavar as lâminas várias vezes com água destilada.
- e) Contra-coloração com hematoxilina e eosina (Fig. 7B).



*Figura 7: A) Lâminas mantidas em ácido pícrico dentro de um frasco de coplin, B) Lâminas totalmente coradas para serem examinadas por microscopia de luz.*

# Capítulo 3- Técnicas de coleta e análise de aparelho auditivo para avaliação de impactos de pesquisa sísmica em cetáceos

*Maria Morell*

## 3.1-Considerações Gerais

Existe uma preocupação crescente com os impactos do ruído subaquático antropogênico nas populações de cetáceos. Por esse motivo, a análise do ouvido e principalmente a presença de possíveis lesões no *órgão de Corti* (ou órgão auditivo) representa um esforço fundamental para avaliar a implicação da perda auditiva induzida por ruído nos eventos de encalhe.

Como o epitélio sensitivo do ouvido interno é muito sensível à autólise, a coleta e a fixação do ouvido devem ser iniciadas o mais rapidamente possível após a morte do animal.

Os ossos timpânicos e perióticos abrigam o ouvido médio e interno, respectivamente.

Essas estruturas são parcialmente fundidas formando o complexo timpano-periótico (Figura 1d). O complexo timpano-periótico é circundado por seios aéreos chamados seios peribulares e suspenso na cavidade peribular através de ligamentos que o fixam e acusticamente o isolam do restante dos ossos do crânio, exceto em cachalotes, baleias-bicuda, sirênios e misticetos que possuem o complexo timpano-periótico parcialmente fundido ao osso temporal. Consta especificada abaixo a lista de materiais necessários, bem como os passos a seguir para a coleta e fixação do ouvido.

Veja Raverty e colaboradores (2018), o “Protocolo de extração e fixação de orelha de cetáceos” (Morell e André, 2009, versão atualizada disponível em: [http://www.zoology.ubc.ca/files/Ear\\_extraction\\_and\\_fixation\\_protocol\\_UBC.pdf](http://www.zoology.ubc.ca/files/Ear_extraction_and_fixation_protocol_UBC.pdf)), ou Ketten et al. (2007) para mais informações.

## 3.2. Lista de equipamentos e materiais necessários

### 3.2.1. Para a coleta do ouvido

- a) Pinças (uma fina e outra grande);
- b) Tesouras;
- c) Bisturi (identificador número 3 e 4);
- d) Lâminas de bisturi (números 12 e 20-23);
- e) Faca;
- f) Equipamentos de proteção individual;

### 3.2.2. Para a fixação

- a) Recipientes à prova de vazamentos;
- b) Fixador (formalina tamponada neutra a 10% ou paraformaldeído a 4% pH 7,3, ver a FISPQ dos produtos para um manuseamento adequado).

### 3.2.3. Para a perfusão

- a) Agulha (calibre 25 ou similar);
- b) Seringa de 1mL;
- c) Cateteres: cateter 14G IV (para espécies pequenas), cateter de borboleta (para espécies pequenas e médias), 1mL de pipeta de plástico (para espécies de tamanho médio e grande);

No caso de baleias-bicuda, cachalotes, peixes-boi e misticetos, que têm o TPC parcialmente fundido ao crânio:

- Formas de diferentes tamanhos
- Martelo de borracha

## 3.3. Procedimentos para coleta do ouvido

1. Após a coleta de gás, recomenda-se retirar a cabeça dos pequenos

animais por desarticulação da articulação atlanto-occipital para facilitar a manipulação (Figura 1a).

2. A maneira mais fácil de acessar os ouvidos é remover cuidadosamente a mandíbula inferior. Os tecidos moles associados devem ser cuidadosamente examinados.

3. Colocar a cabeça com o lado ventral voltado para cima (Figura 1b) permite prosseguir para a extração do complexo timpano-periótico.

4. Fazer uma incisão suave ao redor do complexo timpano-periótico com uma pequena faca ou um bisturi curvo número 12 para cortar os ligamentos que mantêm as orelhas no seio paraótico (linha pontilhada na Figura 1c).

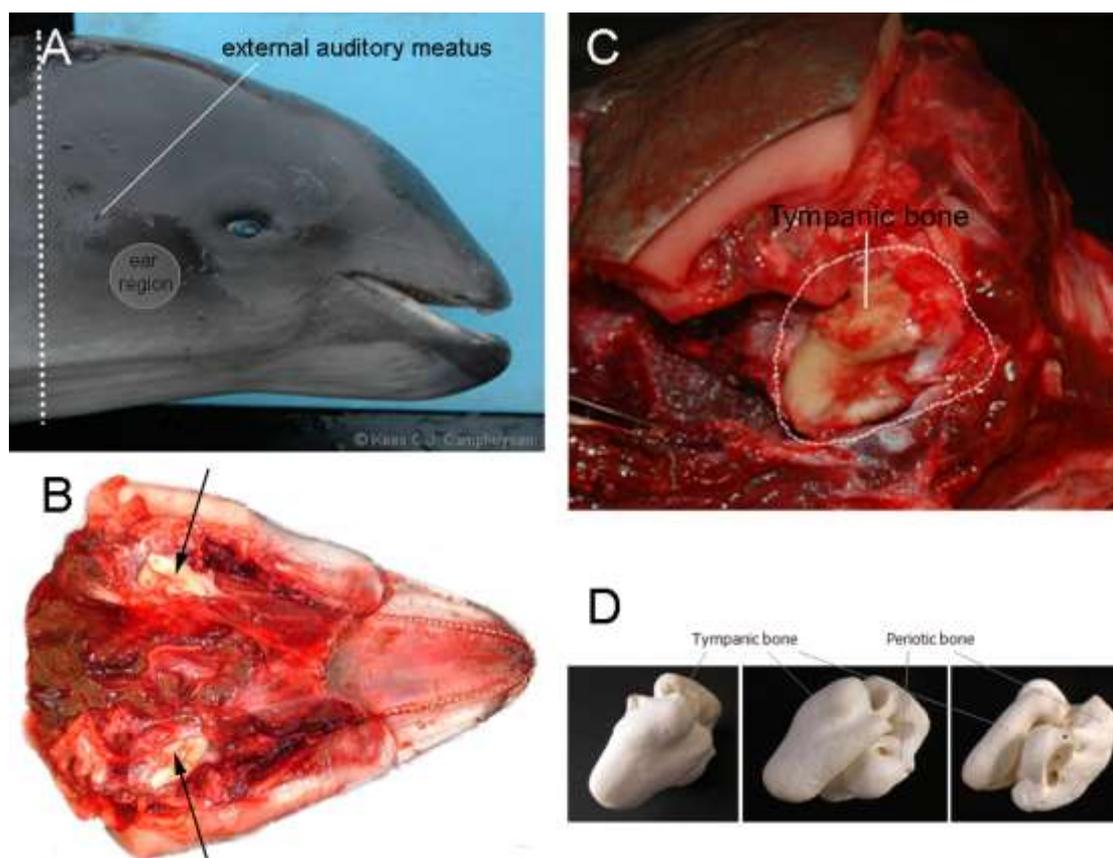


Figura 1. A) A posição do complexo timpano-periótico e do conduto auditivo externo de uma toninha (*Phocoena phocoena*) é indicada. A linha pontilhada marca o caminho da incisão para separar a cabeça do resto do corpo. Alternativamente, o sistema digestivo pode ser extraído da cabeça para facilitar o

acesso às orelhas. B e C) Imagens tiradas durante a necropsia de uma toninha. B) Esta imagem reflete como os complexos timpano-perióticos (setas) aparecem após a remoção da mandíbula (nenhum esforço foi feito aqui para limpar a área de extração). C) A linha pontilhada ilustra o local onde a lâmina de faca ou bisturi deve ser colocada para extrair o complexo timpano-periótico. D) Complexo Timpano-periótico de um Golfinho-riscado (Stenella coeruleoalba).

### 3.4. Procedimentos para Fixação do ouvido interno por perfusão

Recomendamos o uso de um dos seguintes fixadores:

- a) 10% de formalina tamponada neutra, ou
- b) 4% de paraformaldeído (pH 7,3-7,4), ou
- c) Glutaraldeído a 2,5% com tampão fosfato 0,1 M ou com tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,3-7,4)\*, ou
- d) Mistura de paraformaldeído a 1,5% com glutaraldeído a 1,5% com tampão de fosfato a 0,1 M ou tampão de cacodilato a 0,1 M (pH 7,3-7,4)\*.

Os melhores resultados são obtidos quando o ouvido interno é fixado nas primeiras 5 horas *post-mortem*, e então a qualidade da amostra diminui ao longo do tempo até cerca de 15 horas *post-mortem* (variando com relação a espécie e temperatura). No entanto, se o ouvido interno é perfundido com o fixador, é possível aumentar a janela de diagnóstico em que as células do *órgão de Corti* ainda estão presentes entre 24-30 horas *post-mortem* (Morell et al., 2017). A perfusão do ouvido interno é um procedimento delicado, e deve ser realizado por meio de injeção lenta e gradual do fixador através da janela oval e/ou ao redor (Apêndice 3).

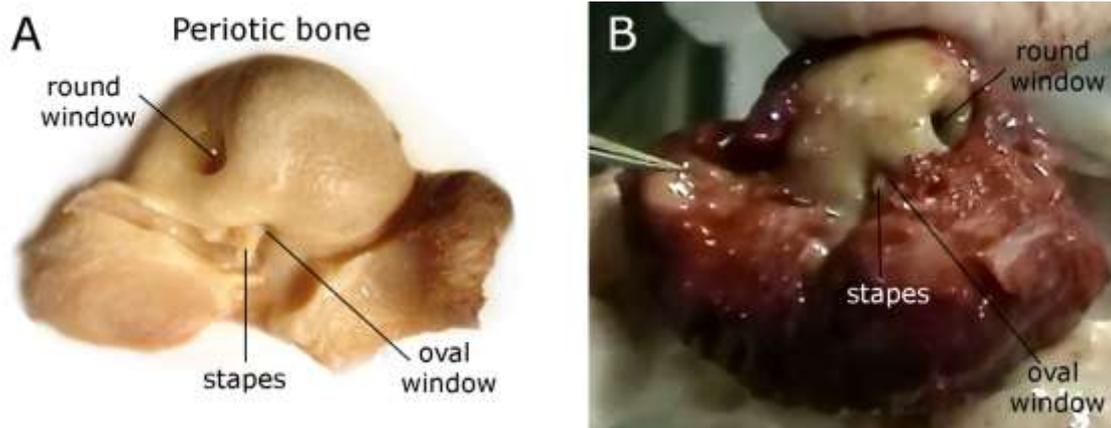


Figura 2.- A) Localização da janela oval e ao redor do osso periótico esquerdo. B) Imagem retirada durante necropsia, ilustrando a localização da janela oval e ao redor do osso periótico esquerdo (Fonte: Projeto Cetáceos da Costa Branca).

É crucial seguir os passos para a perfusão nesta ordem:

- a) Separação do osso periótico do osso timpânico (Figura 1D e 2);
- b) Seccionamento do ligamento estapediano e remoção do estribo. Se o estribo não sair facilmente, pode-se utilizar um bisturi ou agulha através da junção para auxiliar na secção.(Figura 3A e 3B);
- c) A perfuração das membranas da janela oval e ao redor devem ocorrer de forma cuidadosa e muito superficial com agulha (Figura 3C e 3D);
- d) A perfusão do fixador deve ocorrer de forma progressiva e muito lentamente (com pressão mínima) através da janela oval e ao redor (Figura 2) até que a solução saia pela outra janela, com o uso de um cateter mole (ou a ponta de um pipeta de plástico) do mesmo diâmetro que o tamanho das janelas (Figura 3E e 3F).

Posteriormente, os ossos timpânicos e perióticos devem ser imersos em frascos contendo a solução fixadora.

A perfusão é um processo muito delicado e se você não se sentir confortável com isso, entre em contato conosco. É importante mencionar se o ouvido foi perfundido ou não ao enviá-lo, assim como o tempo entre a morte do indivíduo e a perfusão.

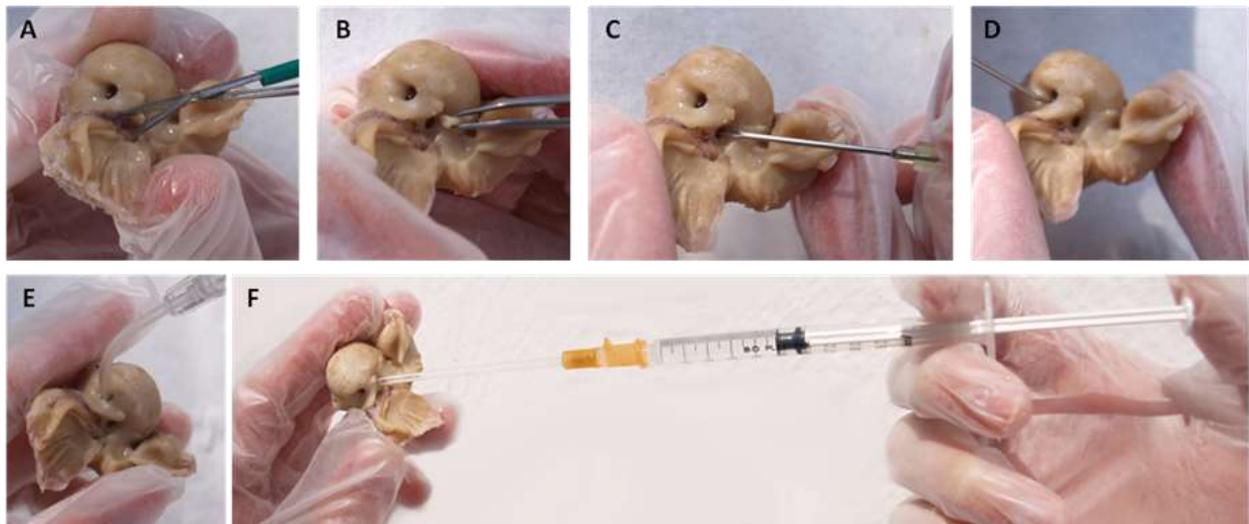


Figure 3 - Osso periótico de *Tursiops truncatus* usado para ilustrar todo o processo de perfusão: A) corte do ligamento estapediano, B) extração do estribo, C e D) desempenho de um pequeno e muito superficial orifício para as membranas oval e ao redor da janela respectivamente; E e F) perfusão muito lenta e progressiva (com muito pouca pressão) do fixador através da janela oval e da janela ao redor até que a solução saia pela outra durante alguns segundos.

Se o intervalo pós-morte for maior que 24 a 30 horas, ou se houver suspeita de uma etiologia, inflamação ou hemorragia infecciosa, o complexo tímpano-periótico intacto pode ser imerso na solução fixadora para posterior exame

# REFERÊNCIAS

Abramowsky, C. R., Pickett, J. P., Goodfellow, B. C. And Bradford, W. D. Comparative demonstration of pulmonary fat emboli by 'en bloc' osmium tetroxide and oil red O methods. *Human pathology* 12, 753-755. 1981.

Aguilar de Soto, N., Delorme, N., Atkins, J., Howard, S., Williams, J. and Johnson, M. Anthropogenic noise causes body malformations and delays development in marine larvae. *Scientific Reports* 3: 2831 DOI: 10.1038/srep02831. 2013.

Bernaldo De Quirós, Y., González-Díaz, Ó., Arbelo, M., Andrada, M., And Fernandez, A. Protocol for gas sampling and analysis in stranded marine mammals. *Protocol exchange*. 2012.

Bernaldo De Quirós, Y., González-Díaz, Ó., Saavedra, P., Arbelo, M., Sierra, E., Sacchini, S., Jepson, P.D., Mazzariol, S., Di Guardo, G., Fernández, A. Methodology for in situ gas sampling, transport and laboratory analysis of gases from stranded cetaceans. *Scientific Reports* 1, 193. 2011.

Bernaldo De Quirós, Y., Saavedra, P., Mollerlokken, A., Brubakk, A.O., Jorgensen, A., González-Díaz, O., Martín-Barrasa, J.L., And F Abramowsky, C. R., Pickett, J. P., Goodfellow, B. C.; Bradford, W. D. Comparative demonstration of pulmonary fat emboli by 'en bloc' osmium tetroxide and oil red O methods. *Human pathology* 12, 753-755. 1981.

Bernaldo De Quirós, Y., Seewald, J.S., Sylva, S.P., Greer, B., Niemeyer, M., Bogomolni, A.L., Moore, M.J. Compositional discrimination of decompression and decomposition gas bubbles in bycaught seals and dolphins. *PLoS One* 8, e83994. 2013.

Blackwell, S.B., Nations, C.S., McDonald, T.L., Thode, A.M., Mathias, D., Kim, K.H., Greene Jr., C.R., and Macrander, A.M. 2015. Effects of airgun sounds on bowhead whale calling rates: evidence for two behavioral thresholds. *PLoS One* 10(6): e0125720.

Bowles, A.E., Smultea, M., Würsig, B., DeMaster, D.P., and Palka, D. 1994. Relative abundance and behavior of marine mammals exposed to transmissions

from the Heard Island Feasibility Test. *J. Acoust. Soc. Am.* 96: 2469–2484. doi:10.1121/1.410120. PMID:7963037.

Castellote, M., Clark, C.W., and Lammers, M.O. 2012. Acoustic and behavioural changes by fin whales (*Balaenoptera physalus*) in response to shipping and airgun noise. *Biological Conservation* 147: 115–122.

Clark, C.W., Ellison, W.T., Southall, B.L., Hatch, L., Van Parijs, S., Frankel, A., and Ponirakis, D. 2009. Acoustic Masking in Marine Ecosystems as a Function of Anthropogenic Sound Sources. IWC document SC-61 E10.

Croll, D.A., Clark, C.W., Acevedo, A., Tershy, B., Flores, S., Gedamke, J., and Urban, J. 2002. Only male fin whales sing loud songs. *Nature (London)*, 417: 809. doi:10.1038/417809a. PMID:12075339.

Day, R.D., McCauley, R.D., Fitzgibbon, Q.P., Hartmann, K., and Semmens, J.M. 2017. Exposure to seismic air gun signals causes physiological harm and alters behavior in the scallop *Pecten fumatus*. *PNAS* 114(40): E8537-E8546.

DeRuiter, S.L. and Doukara, K.L. 2012. Loggerhead turtles dive in response to airgun sound exposure. *Endangered Species Research* 16(1): 55-63.

Di Iorio, L. and Clark, C.W. 2010. Exposure to seismic survey alters blue whale acoustic communication. *Biol. Lett.* 6 (1): 51-54. doi:10.1098/rsbl.2009.0651

Dutra, L.E.D. O Petróleo no Início do Século XX: alguns elementos históricos. In: *Revista Brasileira de Energia*, v.4, n.1, artigos selecionados. 24 p., 1995.

Engås, A., Løkkeborg, S., Ona, E., and Soldal, A.V. 1996. Effects of seismic shooting on local abundance and catch rates of cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 2238–2249. doi:10.1139/cjfas-53-10-2238.

Fernández, A., Edwards, J.F., Rodríguez, F., De Los Monteros, A.E., Herráez, P., Castro, P., Jaber, J.R., Martín, V.; Arbelo, M. "Gas and fat embolic syndrome" involving a mass stranding of beaked whales (Family Ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. *Veterinary Pathology* 42, 446-457. 2005.

Fewtrell, J.L., and McCauley, R. 2012. Impact of air gun noise on the behaviour of marine fish and squid. *Mar. Poll. Bull.* 64: 984-993. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.02.009.

Fitzgibbon, Q.P., Day, R.D., McCauley, R.D., Simon, C.J., and Semmens, J.M. 2017. The impact of seismic air gun exposure on the haemolymph physiology and nutritional condition of spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Mar. Poll. Bull.* 125 (1-2): 146-156.

Geraci, J. R.; Lounsbury, V. J. *Marine Mammals Ashore: A Field guide for strandings*. Galveston, Texas: Texas A&M University, 305 p., 1993.

Gray, H., and Van Waerebeek, K. 2011. Postural instability and akinesia in a pantropical spotted dolphin, *Stenella attenuata*, in proximity to operating airguns of a geophysical seismic vessel. *J. Nat. Cons.* 19 (6): 363-367. doi:10.1016/j.jnc.2011.06.

Guerra, A., González, A.F., and Rocha, F. 2004. A review of records of giant squid in the north-eastern Atlantic and severe injuries in *Architeuthis dux* stranded after acoustic exploration. *ICES CM 2004/CC*: 29.

Hassel, A., Knutsen, T., Dalen, J., Skaar, K., Løkkeborg, S., Misund, O.A., Østensen, Ø., Fonn, M., and Haugland, E.K. 2004. Influence of seismic shooting on the lesser sandeel (*Ammodytes marinus*). *ICES J. Mar. Sci.* 61: 1165–1173. doi:10.1016/j.icesjms.2004.07.008.

Heide-Jørgensen, M.P., Hansen, R.G., Westdal, K., Reeves, R.R. and Mosbech, A., 2013. Narwhals and seismic exploration: Is seismic noise increasing the risk of ice entrapments?. *Biological Conservation* 158: 50-54.

Hildebrand, J. A. 2005. Impacts of anthropogenic sound. In: Reynolds, J.E. et al. (eds.), *Marine mammal research: conservation beyond crisis*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, pp. 101-124.

Hirst, A.G. and Rodhouse, P.G. 2000. Impacts of geophysical seismic surveying on fishing success. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 10(1): 113-118.

HULMAN, G. The pathogenesis of fat embolism. *The Journal of Pathology* 176, 3-9. 1995.

IBAMA. *Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação 2002-2010*. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, versão II, 2° ed., 102p., 2002.

IWC (International Whaling Commission). 2005. Report of the scientific committee. Annex K. Report of the Standing Working Group on environmental concerns. *J. Cetacean Res. Manag.* 7 (Suppl.): 267–305.

IWC (International Whaling Commission). 2007. Report of the scientific committee. Annex K. Report of the Standing Working Group on environmental concerns. *J. Cetacean Res. Manag.* 9 (Suppl.): 227–296.

JASNY, M. Sounding the Depths II: The rising toll of sonar, shipping and industrial ocean noise on marine life. Natural Resources Defense Council – NRDC. 84 p. 2005.

Jepson, P.D., Arbelo, M., Deaville, R., Patterson, I.A.P., Castro, P., Baker, J.R., Degollada, E., Ross, H.M., Herraiez, P., Pocknell, A.M., Rodriguez, F., Howie, F.E., Espinosa, A., Reid, R.J., Jaber, J.R., Martin, V., Cunningham, A.A., Fernandez, A. Gas-bubble lesions in stranded cetaceans - Was sonar responsible for a spate of whale deaths after an Atlantic military exercise? *Nature* 425, 575-576. 2003.

Ketten, D. R.; Cramer, S. R.; Arruda, J. J. A Manual for the Removal, Fixation and Preservation of Cetacean Ears. Woods Hole Oceanographic Institution: Woods Hole. 2007.

Lenhardt, M. 2002. Sea turtle auditory behavior. *J. Acoust. Soc. Amer.* 112(5, Pt. 2):2314 (Abstract).

LEVY, D. The fat embolism syndrome: A review. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 261, 281–286. 1990.

Løkkeborg, S. 1991. Effects of a geophysical survey on catching success in longline fishing. *ICES C.M. B:* 40.

Løkkeborg, S., Ona, E., Vold, A., and Salthaug, A. 2012. Sounds from seismic air guns: gear-and species-specific effects on catch rates and fish distribution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 69 (8): 1278-1291.

Løkkeborg, S., and Soldal, A.V. 1993. The influence of seismic exploration with airguns on cod (*Gadus morhua*) behaviour and catch rates. *ICES Mar. Sci. Symp.* 196: 62-67.

McCauley, R., Day, R.D., Swadling, K.M., Fitzgibbon, Q.P., Watson, R.A., and Semmens, J.M. 2017. Widely used marine seismic survey air gun operations negatively impact zooplankton. *Nature Ecol. & Evol.* 1: 1-8.

McCauley, R.D., Duncan, A.J., Penrose, J.D., et al. 2000. Marine seismic surveys – a study of environmental implications. *APPEA J* 40: 692–706.

McCauley, R. D., Fewtrell, J., and Popper, A. N. 2003. High intensity anthropogenic sound damages fish ears. *Journal of the Acoustical Society of America* 113: 638–642.

McDonald, M. A., Hildebrand, J. A., and Webb, S. C. 1995. Blue and fin whales observed on a seafloor array in the Northeast Pacific. *J. Acoust. Soc. Am.* 98: 712–721.

Mendonça, P. M. M.; Spadini, A. R.; Milani, E. J. Exploração na Petrobras: 50 anos de sucesso. *Boletim de Geociências da Petrobras.* 12 (1): 9-58. 2004.

Miller P.J.O , Johnson, M.P., Madsen, P.T., Biassoni, N., Quero, M. and Tyack, P.L. 2009. Using at-sea experiments to study the effects of airguns on the foraging behaviour of sperm whales in the Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research I* 56 (7): 1168–1181. doi:10.1016/j.dsr.2009.02.008.

Morell, M.; André, M. Ear extraction and fixation protocol (available at [http://www.zoology.ubc.ca/files/Ear\\_extraction\\_and\\_fixation\\_protocol\\_UBC.pdf](http://www.zoology.ubc.ca/files/Ear_extraction_and_fixation_protocol_UBC.pdf)). 2009.

Morell, M.; Brownlow, A.; MCGovern, B.; Raverty, S.A.; Shadwick, R.E.; André, M. Implementation of a method to visualize noise-induced hearing loss in mass stranded cetaceans. *Scientific Reports* 7, 41848; doi: 10.1038/srep41848. 2017.

Nieukirk, S.L., Mellinger, D.K., Moore, S.E., Klinck, K., Dziak, R.P., and Goslin, J. 2012. Sounds from airguns and fin whales recorded in the mid-Atlantic Ocean, 1999–2009. *J. Acoust. Soc. Am.* 131 (2): 1102–1112.

O'Hara, J. and J.R. Wilcox. 1990. Avoidance responses of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, to low frequency sound. *Copeia* 1990 (2): 564-567.

Parente, C.L., Araújo, J.P. and Araújo, M.E. 2007. Diversity of cetaceans as tool in monitoring environmental impacts of seismic surveys. *Biota Neotrop.* 7 (1): 49-55. <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+bn01307012007>.

Paxton, A.B., Taylor, J.C., Nowacek, D.P., Dale, J., Cole, E., Voss, C.M., and Peterson, C.H. 2017. Seismic survey noise disrupted fish use of a temperate reef. *Mar. Policy* 78: 68-73.

Payne, J. F., Andrews, C. D., Fancey, L. L., Guiney, J., Cook, A., and Christian, J. R. 2008. Are seismic surveys an important risk factor for fish and shellfish? *Bioacoustics* 17: 262-265.

Pearson, W.H., Skalski, J.R., and Malme, C.I. 1992. Effects of sounds from a geophysical survey device on behavior of captive rockfish (*Sebastes* spp.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1343-1356.

Pirotta, E., Brookes, K.L., Graham, I.M., and Thompson, P.M. 2014. Variation in harbour porpoise activity in response to seismic survey noise. *Biol. Lett.* 10: 20131090. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.1090>.

Raverty, S.A., Duignan, P.J., Jepson, P.D., Morell, M. Gross Necropsy and Specimen Collection Protocols (Chapter 13). In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Third Edition* (Ed. Dierauf, Gulland). CRC Press/Taylor & Francis Group. 2018.

Romano, T.A., Keogh, M.J., Kelly, C., Feng, P., Berk, L., Schlundt, C.E., Carder, D.A., and Finneran, J.J. 2004. Anthropogenic sound and marine mammal health: measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61: 1124–1134. doi:10.1139/f04-055.

Santulli, A., Modica, A., Messina, C., Ceffa, L., Curatolo, A., Rivas, G., Fabi, G., and D'amelio, V. 1999. Biochemical responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) to the stress induced by off shore experimental seismic prospecting. *Mar. Pollut. Bull.* 38: 1105–1114. doi:10.1016/S0025-326X(99)00136-8.

Skalski, J.R., Pearson, W.H., and Malme, C.I. 1992. Effects of sounds from a geophysical survey device on catch-per-unit-effort in a hook-and-line fishery for rockfish (*Sebastes* spp.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1357–1365.

Slotte, A., Hansen, K., Dalen, J., and One, E. 2004. Acoustic mapping of pelagic fish distribution and abundance in relation to a seismic shooting area off the Norwegian west coast. *Fish. Res.* 67: 143–150. doi:10.1016/j.fishres.2003.09.046.

Solan, M., Hauton, C., Godbold, J.A., Wood, C.L., Leighton, T.G., and White, P. 2016. Anthropogenic sources of underwater sound can modify how sediment-dwelling invertebrates mediate ecosystem properties. *Sci. Rpt.* 6: 20540.

Stone, C.J., and Tasker, M.L. 2006. The effect of seismic airguns on cetaceans in UK waters. *J. Cetacean Res. Manag.* 8: 255–263.

Thompson, D., Sjoberg, M., Bryant, M.E., Lovell, P., and Bjorge, A. 1998. Behavioural and physiological responses of harbour (*Phoca vitulina*) and grey (*Halichoerus grypus*) seals to seismic surveys. Report to European Commission of BROMMAD Project. MAS2 C7940098.

VILARDO, C. N. G. Avaliação Ambiental De Pesquisas Sísmicas Marítimas No Brasil: Evolução e Perspectivas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 288 p. 2007.

Wardle, C.S., Carter, T.J., Urquhart, G.G., and Johnstone, A.D.F. 2001. Effects of seismic air guns on marine fish. *Cont. Shelf Res.* 21: 1005-1027. doi:10.1016/S0278-4343(00)00122-9.

Weilgart, L. 2018. The impact of ocean noise pollution on fish and invertebrates. Report for OceanCare, Switzerland. 34 pp.

Weir, C.R. 2008. Overt responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*), sperm whales (*Physeter macrocephalus*), and Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*) to seismic exploration off Angola. *Aquat. Mamm.* 34(1): 71-83. DOI 10.1578/AM.34.1.2008.71

Weller, D.W., Rickards, S.H., Bradford, A.L., Burdin, A.M., and Brownell, R.L., Jr. 2006a. The influence of 1997 seismic surveys on the behavior of western gray whales off Sakhalin Island, Russia. Paper No. SC/58/E4 presented to the International Whaling Commission Scientific Committee, Cambridge, UK.

Weller, D.W., Tsidulko, G.A., Ivashchenko, Y.V., Burdin, A.M., and Brownell, R.L., Jr. 2006b. A re-evaluation of the influence of 2001 seismic surveys on western gray whales off Sakhalin Island, Russia. Paper No. SC/58/E5 presented to the International Whaling Commission Scientific Committee, Cambridge, U.K.

Williams, R., Gero, S., Bejder, L., Calambokidis, J., Kraus, S.D., Lusseau, D., Read, A.J., and Robbins, J. 2011. Underestimating the damage: interpreting

cetacean carcass recoveries in the context of the Deepwater Horizon/BP incident.  
Conservation Letters 4: 228–233.

# APÊNDICES

## Apêndice 1

### FICHA DE DADOS DE AMOSTRAGEM E PONTUAÇÃO DE GASES

ID: \_\_\_\_\_ Sp: \_\_\_\_\_ Código de decomposição: 2 (fresco);  
3 (decomposto, mas órgãos intactos); 4 (decomposição avançada) 5 (as veias não podem ser distinguidas)

Data do óbito: \_\_\_\_\_ Data da necropsia: \_\_\_\_\_ Horas (PM): \_\_\_\_\_

Condições de Armazenamento:

- Encalhado: Vivo / Morto / Encontrado Morto / Encontrado morto, mas provavelmente encalhado vivo / Encontrado morto, e provavelmente encalhado morto (flutuante)
- Peso: \_\_\_\_\_
- Coleta da carcaça: Profundidade: \_\_\_\_\_ Tipo de armadilha (coleta da carcaça): \_\_\_\_\_
- Duração da infiltração: \_\_\_\_\_ Tempo de aquisição: \_\_\_\_\_ Temperatura da água: \_\_\_\_\_

#### 1) Pontuação do gás

Presença de bolhas de gás? (S/N)	v. Subcutânea (use pontuação da bolha)	V. Renal e Lumbo-caudal plexo venoso (use pontuação da bolha)	V. Mesentérico (use pontuação da bolha)	V. Coronário (use pontuação da bolha)	subcapsular* (use escore de enfisema)	TOTAL

\*Localização:

Pontuação da bolha	Definição
0	Ausência de bolhas de gás dentro da veia
I	Presença ocasional de uma pequena bolha
II	Presença de bolhas muito pequenas e dispersas, ou pequenas "descontinuidades de sangue"
III	Presença de descontinuidades de sangue mais abundantes e maiores
IV	Presença moderada de bolhas dentro de uma veia específica
V	Presença abundante de bolhas
V:	Presença de segmentos completos dos vasos, preenchidos com gás

Enfisema subcapsular	Definição
0	Ausência de gás
1	Presença escassa (afetando apenas um órgão: rins)
2	Presença moderada (afetando dois ou três órgãos)
3	Presença abundante de gás (afetando vários órgãos diferentes).

### **Amostragem de gás**

- Um mínimo de 3 amostras controle
- INTESTINO (use “vacutainers” com adaptadores): proximal / medial / distal
- BOLHAS OU EMFISEMA DA CAVIDADE ABDOMINAL (use seringas):

Localização: Vol (mL): Método:

Comentários:

- BOLHAS DE VEIAS CORONÁRIAS (abra uma pequena janela no saco pericárdico, use seringas para amostragem):

Localização: Vol (mL): Método:

Comentários:

Localização: Vol (mL): Método:

Comentários:

Localização: Vol (mL): Método:

Comentários:

- GÁS DO CORAÇÃO E VASOS GRANDES (use um aspirômetro, rotule a amostra com o volume e o número do tubo):
  - Ventrículo direito;
  - Ventrículo esquerdo;
  - Aorta;
  - Tronco pulmonar.

## Apêndice 2

### PROTOCOLO PARA AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DE ESCORE GASOSO

*Yara Bernaldo de Quirós, Óscar González-Díaz, and Antonio Fernández*

#### Material

- Tubos: BD vacutainer ® em vidro, isento de aditivos, de 5 mL ou 2 mL / MONOJECT™ Red Stopper (revestido com silicone) (ref # 8881301116). Nenhum outro material ou marca é válido para este protocolo.

- Seringas para Insulina descartáveis: Insulina BD Plastipak U-100 (ref # 329651).
- Suportes de Tubo de Uso Único. BD Vaculainer ® (ref # 36481), ou equivalente.
- Agulhas de pontas duplas para coleta de sangue: BD Vacutainer

#### Protocolo

É muito importante que nenhum órgão seja perfurado ou removido antes da contagem e da amostragem de gás. Após a amostragem de gás, os protocolos de necropsia podem prosseguir.

1. Remover cuidadosamente a pele e a gordura, minimizando os danos nas principais veias subcutâneas.
2. Examinar as veias subcutâneas visíveis e maiores quanto a presença de bolhas de gás e atribuir um escore gasoso (sempre registrar com foto para demonstrar o escore gasoso).
3. Abrir a cavidade abdominal e torácica
4. Examinar e determinar um escore gasoso para cada um desses locais (tirar fotos):
  - a. Veias mesentéricas;
  - b. Plexo venoso lombo caudal e veias coronárias;
  - c. Veias coronárias.

Presença de bolhas de gás? (S/N)	V. Subcutanea	Complexo venoso lombo-caudal	V. Mesentérica	V. Coronária	Eflêma subcapsular	TOTAL

5. Amostrar até 5 bolhas de cada um desses locais. Coletar amostras extras se observar bolhas em outros locais. Priorizar a coleta de amostras da vasculatura torácica. Amostrar as bolhas usando a seringa de insulina e injetando imediatamente o conteúdo nos tubos. Usar uma nova seringa e um novo tubo para cada bolha de gás.
6. Retirar amostras de gás intestinal das seções do intestino proximal, medial e distal, aplicando os tubos diretamente com as agulhas de pontas duplas acopladas aos suportes de tubo de uso único.
7. Amostrar o gás subcapsular, se presente, conforme descrito para o gás intestinal.
8. Colocar uma etiqueta em cada tubo com a localização e a quantidade de amostras de gás (ver anexo 2).
9. Identificar pelo menos três tubos vazios do mesmo pacote para controle.
10. Guardar os tubos com amostra "em branco" à temperatura ambiente, de preferência com a tampa para baixo.
11. Analisar o material dentro de duas semanas. Se for enviado por aeronave, é necessário um invólucro de plástico resistente a pressões negativas.

#### Scores gasosos



#### Contact information:

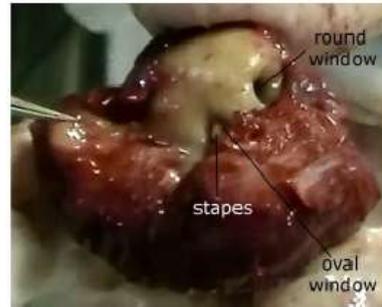
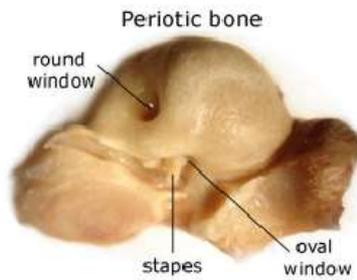
Yara Bernaldo de Quirós Miranda,  
E-mail: [yara.bernaldo@ulpgc.es](mailto:yara.bernaldo@ulpgc.es)  
Emergency phone: (+34) 650480647

#### Shipping address:

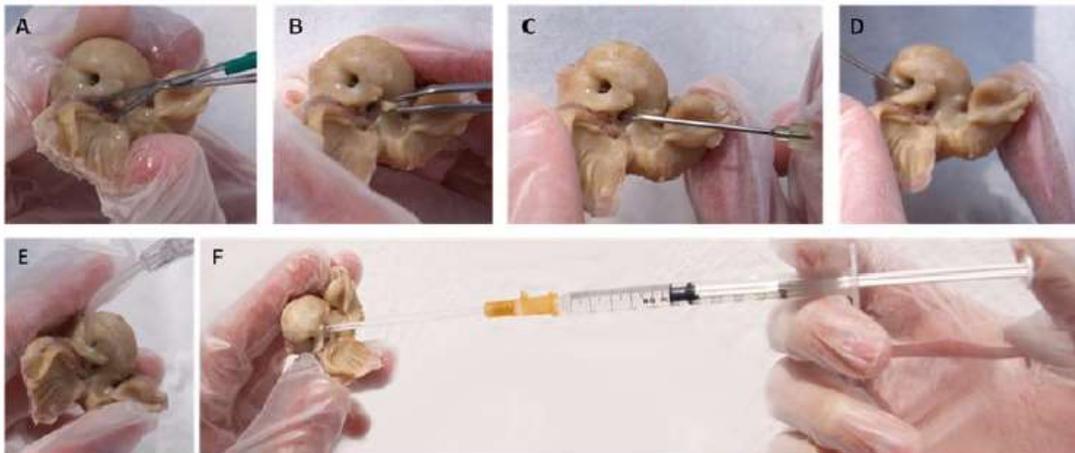
Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria  
Facultad de Veterinaria  
C/Transmontaña s/n  
35416, Arucas, Las Palmas, Spain

## Apêndice 3

### Protocolo de Perfusão do Ouvido Interno



- 1) Separação dos ossos tímpano-perióticos;
- 2) Seccionar o ligamento estapediano e remover do estribo. Se o estribo não soltar facilmente, passar um bisturi ou agulha através da junção;
- 3) Perfurar com agulha, de forma cuidadosa e superficial, as membranas da janela oval e redonda;
- 4) Realizar perfusão do fixador de forma progressiva e lenta (com pressão mínima) através da janela oval e da janela ao redor, até que a solução saia pela outra janela. Usando um cateter macio (ou a ponta de uma pipeta de plástico) com o mesmo diâmetro que o tamanho da janela.



#### Contact Information

Maria Morell  
E-mail: [maria.morell@inserm.fr](mailto:maria.morell@inserm.fr)  
Phone: +33-499636048

#### Shipping address:

Institute for Neurosciences of Montpellier  
Inserm UMR 1051  
80, rue Augustin Fliche  
34091 Montpellier  
France

## REALIZAÇÃO



## CONDICIONANTE AMBIENTAL





MINISTÉRIO DO  
MEIO AMBIENTE

