



## Planejamento e Protocolos para Experimentos com Peixes em Ambiente Controlado



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio Ambiente  
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**DOCUMENTOS 137**

**Planejamento e Protocolos para Experimentos  
com Peixes em Ambiente Controlado**

*Julio Ferraz de Queiroz  
Márcia Mayumi Ishikawa  
Vera Lúcia Scherholz S. de Castro  
José Henrique Vallim*

**Embrapa Meio Ambiente**  
Jaguariúna, SP  
2023

**Embrapa Meio Ambiente**

Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho  
CEP: 13918-110, Jaguariúna, SP  
Fone: +55 (19) 3311-2700  
<https://www.embrapa.br/meio-ambiente/>  
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente  
*Janaina Paula Marques Tanure*

Secretária-Executiva  
*Nilce Chaves Gattaz*

Membros  
*Cristiano Menezes, Victor P. M. Simão, Eliana de Souza Lima, Rafaela C R. M. Duarte, Fagoni F. Calegario, Ana Lúcia Penteado, Maria Cristina Tordin, Maria de Cleofas Faggion Alencar, Nilce Chaves Gattaz, Priscila de Oliveira*

Revisão de texto  
*Nilce Chaves Gattaz*

Normalização bibliográfica  
*Maria de Cleofas Faggion Alencar, CRB-8/1658*

Editoração eletrônica  
*Silvana Cristina Teixeira*

Foto da Capa  
*Márcia Mayumi Ishikawa*

**1ª edição**  
2023

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Embrapa Meio Ambiente**

---

Planejamento e protocolos para experimentos com peixes em ambiente controlado / Julio Ferraz de Queiroz... [et al.]. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2023.

PDF (23 p.) : il. color. – (Documentos / Embrapa Meio Ambiente, 1516-4691 ; 137).

1. Bem-estar animal 2. Peixes 3. Experimentos I. Queiroz, Julio Ferraz de. II. Ishikawa, Márcia Mayumi. III. Castro, Vera Lúcia Scherholz S. de. IV. Vallim, José Henrique. V. Série.

CDD (21. ed.) 636.0832

---

Maria de Cléofas Faggion Alencar, CRB-8/1658

© Embrapa, 2023

## Autores

### **Julio Ferraz de Queiroz**

Oceanólogo, doutor em Ciências Agrárias, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

### **Márcia Mayumi Ishikawa**

Médica veterinária, doutora em Parasitologia Veterinária, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

### **Vera Lúcia Scherholz S. de Castro**

Médica veterinária, doutora em Patologia Experimental e Comparada, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

### **José Henrique Vallim**

Farmacêutico e Bioquímico, doutor em Biologia Funcional e Molecular Ciência Florestal, analista da Embrapa Meio Ambiente, SP.

## Apresentação

Atualmente, quase metade da produção de pescado é originada da aquicultura. Portanto, a adoção de metodologias eficientes é fundamental para garantir o desempenho e a sanidade dos organismos aquáticos e, conseqüentemente, a rentabilidade e a sustentabilidade dos sistemas de produção aquícola. Nesse sentido, muitos experimentos executados em laboratórios têm servido de base para aprimorar o manejo produtivo da aquicultura.

Testes de desafio *in vivo* com peixes e agentes patogênicos, por exemplo, são realizados em pequena escala nos laboratórios para determinar os efeitos do uso de aditivos alimentares, probióticos, imunostimulantes e vacinas. Esses experimentos devem obedecer alguns princípios básicos metodológicos e adotar boas práticas de manejo sanitário (BPMS) para garantir a qualidade da água, o bem-estar dos peixes e, principalmente, a qualidade dos resultados esperados.

Os cuidados e procedimentos descritos neste documento tomaram como base aqueles realizados no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, particularmente, nos experimentos com biomarcadores hematológicos, enzimáticos e fisiológicos em peixes.

O objetivo deste documento é apresentar os procedimentos básicos para condução de experimentos *in vivo* com peixes em laboratórios, em conformidade com os princípios de bem estar animal, e com o objetivo de desenvolvimento sustentável (ODS 12) para assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis.

*Ana Paula Contador Packer*  
Chefe-Geral da Embrapa Meio Ambiente

## Sumário

Introdução.....	7
Bem-Estar Animal.....	7
Qualidade da Água.....	8
Experimentos com Peixes .....	9
Escolha da Espécie de Peixe .....	10
Etapas para Execução de Experimentos com Peixes.....	11
Documentos, Certificados e Autorizações.....	11
Princípios Éticos .....	12
Instalações, Sistemas de Aquários e Fonte de Água.....	13
Fontes de Abastecimento de Água .....	14
Infraestrutura e Equipamentos .....	16
Materiais, Organização e Planejamento.....	20
Equipe Técnica e Treinamento.....	21
Considerações Finais .....	22
Agradecimentos.....	22
Referências .....	22

## Introdução

O aumento da demanda global por alimentos de origem aquática tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias e sistemas de produção mais eficientes e menos danosas ao meio ambiente (Boyd et al., 2013; Boyd et al., 2020). O Brasil apresenta um grande potencial para a produção de peixes, crustáceos e moluscos, entretanto, é preciso adotar métodos de produção que contribuam para o aproveitamento sustentável dos recursos naturais e evitem eventuais impactos ambientais negativos (Valenti et al., 2021).

Nesse sentido, muitos experimentos com peixes vêm sendo executados nos laboratórios visando o aprimoramento do manejo produtivo da piscicultura. Esses experimentos envolvem a inclusão de aditivos alimentares nas rações, uso de produtos naturais, desenvolvimento de ferramentas de monitoramento, validação de tratamentos alternativos, entre outros. Em geral, os experimentos e os testes de desafio *in vivo* com uso de agentes patogênicos são realizados em pequena escala nos laboratórios para determinar os efeitos do uso de probióticos, imunostimulantes e vacinas, visando a promoção da melhoria do desempenho zootécnico e de resistência às doenças.

Todavia, é preciso observar que os experimentos *in vivo* com peixes realizados nos laboratórios devem obedecer os princípios básicos metodológicos referentes a ética animal, e também adotar boas práticas de manejo sanitário (BPMS). A finalidade é assegurar o bem-estar dos peixes, a qualidade da água e dos resultados esperados. A manutenção adequada dos sistemas experimentais instalados nos laboratórios e o monitoramento constante da qualidade da água têm influência direta sobre o bem-estar animal e na resposta fisiológica.

De acordo com a Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2016), os pesquisadores, professores e demais pessoas que trabalham com animais são responsáveis pelos aspectos relacionados ao bem-estar. Portanto, todos responsáveis por projetos ou protocolos com animais devem submeter ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) uma proposta escrita relatando sua justificativa e detalhamento experimental.

O objetivo deste Documento é apresentar os procedimentos básicos para condução de experimentos *in vivo* com peixes em laboratórios. Para tanto, os cuidados e procedimentos descritos tomaram como base aqueles realizados no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, particularmente, nos experimentos com biomarcadores hematológicos, enzimáticos e fisiológicos em peixes.

A seguir são apresentadas orientações divididas em temas relevantes na condução dos experimentos: bem-estar animal, delineamento experimental, aprovação do protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), cuidados com a estrutura física, preparo dos materiais e reagentes, e treinamento da equipe técnica.

### Bem-estar animal

O conceito de bem-estar animal representado pelo Diagrama de Appleby (Appleby et al., 1998) envolve três componentes fundamentais que são: físico, mental e a naturalidade. O diagrama é composto por três círculos que apresentam uma área em comum formada pela intersecção de cada um deles, evidenciando, portanto, a forte interação entre os componentes físico, mental e

a naturalidade (comportamento natural restrito). Esse conceito considera o estresse e o bem-estar animal de forma conjunta, e comprova que o estresse é um fenômeno psicossocial com repercussão biológica que ocorre quando há percepção de ameaça real ou imaginária que venha a ser interpretada como capaz de causar danos em nível psicológico ou físico em um indivíduo (Cohen et al., 2007; Santos, 2010). O estresse está relacionado a qualquer alteração do bem-estar, alteração nos estados físico e psicológico e das respostas fisiológicas, as quais podem ser determinadas a partir do uso de biomarcadores (Ishikawa et al., 2020).

Os tipos de resposta ao estresse variam de respostas primárias que podem evoluir para respostas secundárias e terciárias, caso o estressor não seja eliminado (Barton, 2002). Os agentes estressores podem ser químicos (presença de contaminantes, baixa concentração de oxigênio dissolvido, níveis inadequados de pH, e outros), físicos (manuseio, confinamento e transporte) e estressor por percepção (presença de predador, ameaça, entre outros). As respostas primárias são em geral hormonais, as secundárias podem ser alterações metabólicas, celulares e distúrbios osmorregulatórios, e as respostas terciárias, normalmente, são mudanças no animal como um todo (alterações no crescimento, comportamento e baixa resistência a doenças). Assim, três aspectos principais devem ser levados em consideração na avaliação do bem-estar dos peixes: saúde, estresse e comportamento (Oliveira; Galhardo, 2007).

A avaliação do estado de saúde dos peixes deve ser realizada a partir do recebimento dos peixes nos laboratórios e no decorrer do período de experimentação, até o final de cada um dos trabalhos. Os métodos de diagnóstico de doenças de peixes utilizados rotineiramente, como as análises parasitológicas, podem ser adaptados de acordo com a metodologia descrita por Ishikawa et al. (2016) e Jerônimo et al. (2012). As análises dos distúrbios hematológicos podem ser realizadas de acordo com a metodologia descrita por (Tavares-Dias, 2009).

Outros fatores como transporte, aclimatação, luminosidade, ruídos, alimentação e frequência alimentar, trocas de água, biometrias, procedimentos e protocolos para encerramento dos experimentos são muito importantes porque têm influência direta sobre o bem-estar animal.

## **Qualidade da água**

A água contém diversos componentes que existem no próprio ambiente natural ou que foram introduzidos a partir de atividades humanas. Para caracterizar a água são utilizados diversos parâmetros que representam as suas características físicas, químicas e biológicas. Esses parâmetros são utilizados como indicadores da qualidade da água e, quando alcançam valores diferentes aos estabelecidos para determinado uso, são considerados fora do padrão ou inadequados (Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005).

Os principais parâmetros físicos, químicos e biológicos que podem ser utilizados para o monitoramento e a avaliação da qualidade da água nos experimentos realizados nos laboratórios são: temperatura, turbidez, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e dureza total, nitrogênio amoniacal total, amônia, nitrito, demanda bioquímica de oxigênio, cloretos, fluoretos, componentes inorgânicos (metais pesados) e orgânicos (agrotóxicos e detergentes), coliformes totais e concentração de microalgas.

A falta de adoção de um protocolo para monitoramento da qualidade da água irá comprometer a estabilidade do sistema experimental podendo causar estresse aos peixes e aumento da mortalidade devido a redução da concentração de oxigênio dissolvido e do pH, bem como ao aumento da concentração de amônia e nitrito.

O acúmulo de amônia nos sistemas experimentais resulta no aumento do estresse dos peixes e, conseqüentemente, na ocorrência de doenças provocando grandes perdas em razão da mortalidade elevada (Francis-Floyd et al., 2022). Em situações adversas quando não há monitoramento e um controle constante da qualidade da água, os níveis de amônia tóxica na forma não ionizada ( $\text{NH}_3^+$ ) poderão ficar entre 0,70 e 2,40  $\text{mg/L}^{-1}$  o que pode ser letal para os peixes quando expostos por curto período de tempo. Concentrações de amônia não ionizada acima de 0,16  $\text{mg/L}^{-1}$  podem afetar o estado de saúde geral dos peixes e interferir no seu crescimento e reprodução (Pereira; Mercante, 2005; Martinez et al., 2006).

A Tabela 1 apresenta de forma resumida algumas das principais variáveis de qualidade de água e seus respectivos limites para evitar estresse dos peixes, além de algumas diretrizes para assegurar boas condições para o manejo sanitário e bem-estar dos peixes nos experimentos realizados em laboratórios.

**Tabela 1.** Valores limites de algumas variáveis de qualidade de água e aspectos relacionados ao manejo experimental e sanitário para evitar estresse dos peixes nos experimentos realizados em laboratórios.

• Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	< 12 $^{\circ}\text{C}$ e > 30 $^{\circ}\text{C}$
• Oxigênio dissolvido ( $\text{mg/L}^{-1}$ )	< 3,0 $\text{mg/L}^{-1}$ ou 60% saturação
• pH (unidades de pH)	< 5,5 e > 9,5
• Alcalinidade total ( $\text{mg/L}^{-1}$ )	< 20 ppm ( $\text{CaCO}_3$ )
• Dureza total ( $\text{mg/L}^{-1}$ )	< 10 ppm ( $\text{CaCO}_3$ )
• Amônia não ionizada ( $\text{mg/L}^{-1}$ ) e Nitrito ( $\text{mg/L}^{-1}$ )	Amônia < 0,02 $\text{mg/L}^{-1}$ e Nitrito < 0,1 $\text{mg/L}^{-1}$
• Intensidade luminosa (lux)	< 8.500 luxes
• Densidade (peixes/L) e (peixes/ $\text{m}^3$ )	80 peixes/ $\text{m}^3$ ou 200 Kg/peixes/ $\text{m}^3$ ou 15 peixes/L
• Sistema transporte (tempo/distância)	Uso de antibióticos e anestésicos
• Sanidade dos peixes (avaliação clínica)	Verificação de parasitas, fungos e bactérias
• Manejo dos aquários (alimentação)	Frequência alimentar e uso de produtos químicos
• Localização e forma (laboratório e aquários)	Ruídos, % troca de água, manuseio

## Experimentos com peixes

O conceito de *3Rs* (*Reduction, Refinement, Replacement*) visa diminuir o número de animais utilizados na pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (Fenwick et al., 2009). Contudo, mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos, os modelos animais ainda são importantes em muitas situações (Fenwick et al., 2009). Experimentos com peixes são necessários para avaliações do desempenho zootécnico, saúde animal, eficiência e segurança sobre o uso de produtos químicos ou naturais, dentre diversas outras linhas da pesquisa básica e aplicada.

As implicações éticas dos testes realizados com vertebrados devem ser cuidadosamente consideradas conforme a Lei n $^{\circ}$  11.794, de 8 de outubro de 2008, conhecida como “Lei Arouca” que regulamenta o uso de animais em pesquisas científicas no país. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2020) é uma instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal que tem como competências a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais em ensino e pesquisa científica, além de estabelecer condutas para instalação e funcionamento adequado de biotérios e de laboratórios que usam a experimentação animal.

Portanto, o uso de animais em experimentos nos laboratórios deverá ser feito somente quando não houver uma metodologia alternativa validada disponível ao uso de animais e, sobretudo, deve seguir normas e atender a legislação vigente para garantir o manejo adequado de acordo com princípios éticos, visando a manutenção do bem-estar animal.

A primeira ação a ser providenciada é a aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituição onde o experimento será executado como mostra a Figura 1. Além disso, os peixes a serem utilizados devem ser obtidos de biotérios, ou adquiridos de pisciculturas que estejam cadastradas nesta CEUA para que a sanidade e a biossegurança sejam garantidas.

Todos os peixes devem passar por um período de quarentena de pelo menos uma semana em um tanque apropriado para esta finalidade e, posteriormente, precisam ser transferidos e aclimatados ao ambiente experimental (aquários de vidro ou tanques de polietileno) por um período que pode variar de 3 a 7 dias, dependendo da procedência, da espécie e idade dos peixes. O monitoramento da qualidade da água deve ser feito de acordo com o delineamento experimental e considerar as características biológicas da espécie dos peixes.



M.CEUA.CNPMA No 00X/20XX

Jaguariúna, XX de xxxxxx de 20XX.

Nome do responsável pelo protocolo  
Embrapa Meio Ambiente

#### **AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA**

Certificamos que a proposta intitulada “ ”, registrada com o nº 0XX/20XX, sob a responsabilidade de Nome do responsável pelo protocolo que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de XX/XX/20XX.

Finalidade	( ) Ensino ( ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	XX/XX/20XX a XX/XX/20XX
Espécie/linhagem/raça	
Nº de animais	
Peso/Idade	
Sexo	
Origem	

\_\_\_\_\_  
Coordenador da CEUA

\_\_\_\_\_  
Secretário da CEUA

**Figura 1.** Modelo de Certificado de Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

## Escolha da espécie de peixe

A escolha da espécie de peixe para a realização de experimentos *in vivo* em laboratórios deve ser feita conforme os objetivos do trabalho e, sobretudo, considerar a infraestrutura do local, duração dos experimentos, quantidade e tamanho dos peixes, tipos de tratamento e análises que serão efetuadas. É importante escolher uma espécie de peixe que já tenha seu ciclo de cultivo conhecido e dominado, que possua altas taxas de sobrevivência, e que os parâmetros de qualidade de água, reprodução, nutrição e sanidade sejam conhecidos. Nesse sentido, o CONCEA publicou a Resolução Normativa nº 34/2017 que instituiu o capítulo “Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico” com informações sobre lambari, tilápia e zebrafish que fazem parte do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.

Além do uso de certas espécies recomendadas por protocolos nacionais e internacionais, os seguintes critérios devem ser considerados para padronização e comparação de resultados, como exemplo para o zebrafish: importância econômica como fonte proteica para a alimentação, relevância ecológica com relação a abundância em locais sujeitos a impactos ambientais mais frequentes e/ou resultantes de variações bruscas da qualidade da água.

A disponibilidade do estoque de peixes é um fator crítico, pois irá determinar qual a época do ano e a frequência em que os experimentos poderão ser realizados. A idade, a maturidade sexual para algumas espécies de peixes podem ser muito precoces, e isso poderá contribuir para que os peixes se reproduzam durante experimentos de longa duração. O uso de peixes de variedades domésticas é aconselhável em virtude da sua adaptação às condições locais, que permitem maior facilidade para o desenvolvimento dos experimentos. O nível trófico e a taxa de crescimento dos peixes também são fatores determinantes para o sucesso dos trabalhos, a exemplo de experimentos com peixes carnívoros e com taxa de crescimento muito lenta, terão custos mais altos e duração mais longa, além de exigirem uma infraestrutura mais complexa e onerosa.

Outros fatores como tolerância ao manuseio e às variações na qualidade da água, ao estresse e a resistência às doenças, são fundamentais para permitir maior adaptação dos peixes ao ambiente do laboratório e às condições experimentais de cada um dos trabalhos em particular. A tolerância às variações da temperatura, pH, e às concentrações de oxigênio dissolvido e amônia, devem ser consideradas no momento de escolher a espécie de peixe que será utilizada como objeto de estudo.

## Etapas para execução de experimentos com peixes

### Documentos, certificados e autorizações

Para facilitar e garantir que nenhuma ação importante seja esquecida é importante ter disponível um protocolo específico para cada fase ou etapa dos experimentos.

A primeira etapa consiste da parte legal e documental, ou seja, a elaboração e aprovação do Protocolo da CEUA, e impressão e fixação do Certificado de Autorização da CEUA na sala do laboratório onde o experimento com os peixes será executado. Além deste certificado é necessário elaborar um Resumo do Protocolo Experimental contendo as principais descrições do experimento, tais como: nome dos responsáveis pelo experimento, nome do projeto, espécie animal, e início e

período de execução. É importante conter informações práticas sobre alimentação, renovação da água, fotoperíodo da sala e aferição dos parâmetros de qualidade da água. Com este resumo, que deve ser fixado no ambiente do laboratório, toda equipe terá acesso rápido e prático para consulta sempre que houver qualquer dúvida durante o período experimental (Figura 2).

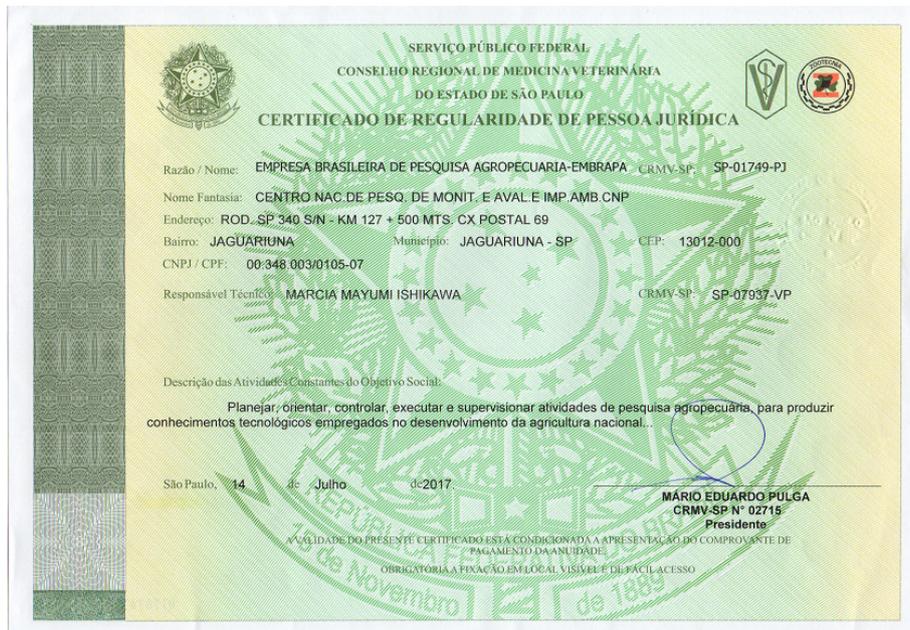
<p>Protocolo CEUA XXXX: Título do experimento “.....”</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>‣ <b>Aluno responsável:</b></li> <li>‣ <b>Orientador responsável:</b></li> <li>‣ <b>Equipe técnica:</b></li> <li>‣ <b>Equipe do LAE:</b></li> <li>‣ <b>Sistema de aquários:</b></li> <li>‣ <b>Período do experimento:</b></li> </ul>
<p>Resumo dos procedimentos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>‣ Delineamento experimental:</li> <li>‣ Renovação da água dos aquários ou recirculação:</li> <li>‣ Alimentação durante o experimento:</li> <li>‣ Fotoperíodo:</li> <li>‣ Monitoramento da qualidade da água (frequência e parâmetros a serem aferidos):</li> <li>‣ Monitoramento do comportamento, sinais clínicos e mortalidade:</li> <li>‣ Manter a temperatura ambiente constante, manter portas fechadas e caso necessário, ligar os termostatos e/ou resistências.</li> <li>‣ Telefone de emergência:</li> </ul>

**Figura 2.** Modelo do resumo de um protocolo experimental utilizado no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, que deve ficar fixado na sala experimental ao lado do certificado de autorização da CEUA.

### Princípios éticos

A Organização Mundial da Saúde Animal (World Organization for Animal Health) <https://www.woah.org/en/home/> considera que o bem-estar animal, em seu sentido amplo, designa os numerosos fatores que contribuem para a qualidade de vida de um animal. Correlaciona, também, o bem-estar animal à liberdade de viver livre de fome, sede e desnutrição, temor e angústia, desconforto físico e térmico, dor, lesão, doenças e liberdade para manifestar um comportamento natural. Para isso, todo experimento envolvendo o uso de animais precisa contar com o acompanhamento ou supervisão de um Responsável Técnico Veterinário (RTV) para os procedimentos onde é necessária

uma abordagem mais invasiva como cirurgia, aplicação de medicamentos controlados ou produtos tóxicos, coleta de amostras biológicas, anestesia, ou eutanásia. Toda instituição ou empresa que execute atividades com animais, inclusive pesquisa e ensino, precisa estar registrada no Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV) com seu respectivo RTV. No laboratório onde serão realizados os experimentos deve constar o Certificado de Regularidade de Pessoa Jurídica. (Figura 3).



**Figura 3.** Certificado de Regularidade de Pessoa Jurídica fixado na sala experimental do Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna, SP.

### Instalações, sistemas de aquários e fonte de água

A segunda etapa consiste em assegurar que a estrutura física disponível para a execução do experimento está em perfeitas condições de manutenção e funcionamento. Essa etapa é essencial para certificar que toda estrutura física da sala experimental e dos tanques de quarentena poderão ser utilizados sem problemas. É extremamente importante que o sistema de aquários disponível no laboratório atenda às características do experimento. A estrutura física deve ser avaliada e testada, caso contrário, será necessário fazer a manutenção e a adequação do espaço físico e do sistema a ser utilizado antes do início de qualquer experimento. A estrutura física também deve atender as exigências relacionadas à biossegurança, como o controle do trânsito de pessoas no local, tratamento dos efluentes a serem gerados e o descarte adequado dos materiais e efluentes contaminados. (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Sistema de recirculação da água dos aquários sendo preparado para início de um experimento *in vivo*.



**Figura 5.** Aviso de área restrita que deve ser fixado na porta da sala experimental.

### Fontes de abastecimento de água

O laboratório onde serão instalados os aquários deve ter um sistema de abastecimento de água que pode ser da própria rede de tratamento local, poços artesianos e fontes de água naturais. Em muitos locais será necessário utilizar um reservatório para armazenamento da água por um período de pelo menos 12 a 24 horas antes do abastecimento dos aquários para eliminação do cloro da água. O ideal é que o reservatório esteja localizado acima do nível dos aquários para que eles possam ser abastecidos por gravidade. Nos sistemas experimentais com recirculação de água deve ser instalada uma bomba para renovação e abastecimento da água dos aquários.

A fonte de água utilizada para abastecimento dos aquários ou de outros componentes dos sistemas experimentais usados nos laboratórios deve ser de boa qualidade e livre de qualquer contaminante. Em geral, a água utilizada nos laboratórios é retirada de poços artesianos ou, em alguns casos, de fontes naturais como rios e lagoas. Nos laboratórios onde a água é tratada e mantida em caixas d'água para uso geral, deve-se verificar se há resíduos de cloro antes de usar para abastecimento dos aquários. Para isso, *kits* de piscina ou de aquários podem ser utilizados, e caso confirmada a presença de cloro na água, pode ser eliminado com o uso de produtos para essa finalidade, como por exemplo, anti-cloro ou removedor de cloro usado em aquários, e tiosulfato de sódio. Porém, em experimentos que utilizem muitos aquários com grande volume de água é mais eficiente fazer a eliminação do cloro deixando evaporar naturalmente da água contida nos tanques de armazenamento por um dia, ou por meio da aeração da água, até que não seja mais detectado nenhum resíduo de cloro.

O cloro é muito volátil e se dissipa naturalmente da água e o uso de aeradores acelera muito esse processo. Todavia, em algumas regiões a água contém cloramina que é menos volátil que o cloro, e para isso recomenda-se o uso de aditivos que podem ser adquiridos em lojas de aquários e seguir as recomendações de aplicação indicadas pelo fabricante. Embora a aeração se destaca como um dos métodos mais práticos e menos onerosos para eliminar o cloro da água, outros processos e formas para eliminar o cloro podem ser utilizados, como por exemplo: filtros de carvão ativado, filtros de osmose reversa e lâmpadas ultravioleta.

Em alguns locais a água dos poços pode conter uma alta concentração de fluoretos, o que é natural em função da composição do solo do local, ou devido ao uso de flúor e outros compostos para tratamento da água. Breseghelo et al. (2004) observaram que a concentração de 5 mg/L<sup>-1</sup> de fluoreto de sódio não é letal e não apresentou danos significativos no comportamento e nas estruturas teciduais e celulares do guaru (*Poecilia vivipara*) durante o período de experimentação com o uso de tratamento crônico. Atualmente, a potabilidade da água para consumo humano é disciplinada pelas Portarias 2.914/11 (Brasil, 2011) e 05/17 do Ministério da Saúde (Brasil, 2017) que estipula em 1,5 mg F/L<sup>-1</sup> o valor máximo de flúor permitido para que a água seja considerada potável. Portanto, salvo algumas exceções em que a água utilizada para abastecimento dos aquários nos laboratórios não seja utilizada diretamente da rede de abastecimento, pode-se considerar que não se espera problemas resultantes de altas concentrações de fluoreto na água que poderiam afetar o bem-estar dos peixes e, conseqüentemente, os resultados dos experimentos.

Por outro lado, em locais onde a água utilizada é retirada diretamente de rios e lagos, podem ocorrer problemas em virtude da grande quantidade de sólidos em suspensão ou de algas. Nestes casos, é preciso usar tanques extras para a decantação dos sólidos em suspensão ou utilizar produtos químicos para a eliminação das algas, como por exemplo, cloro ou outros algicidas.

Nos casos em que a concentração de oxigênio dissolvido da água mantida nos tanques utilizados para abastecimento dos aquários estiver frequentemente abaixo de  $3,0 \text{ mg/L}^{-1}$ , comprova que há excessiva turbidez de argila e alta demanda de oxigênio dissolvido nas fontes de água locais, o que é frequentemente causado pelo acúmulo de sedimentos com grande quantidade de matéria orgânica no fundo desses locais. Recomenda-se, portanto, verificar a qualidade da água utilizada para abastecimento e eliminar a entrada de sólidos suspensos, além de remover os sedimentos acumulados no fundo desses locais.

### Infraestrutura e equipamentos

É importante lembrar que existem experimentos nos quais não se pode utilizar filtros durante o período de tratamento, por exemplo, quando se trabalha com algum composto tóxico, pois este seria retido pelo sistema de filtragem. Para isso, utiliza-se sistemas fechados nos quais não há recirculação da água através de filtros. Os experimentos realizados nesses sistemas têm algumas limitações com relação à densidade de peixes que podem ser estocados nos aquários, e também com relação à qualidade da água que irá se deteriorar em poucos dias. Nesses casos, é necessário fazer trocas de água mais frequentes para prevenir a redução do pH e do acúmulo de amônia nos aquários.

Como regra geral, os sistemas de recirculação de água devem, preferencialmente, ser instalados no interior de laboratórios ou de estufas agrícolas para facilitar o controle da temperatura ambiente, da luminosidade, e dos parâmetros de qualidade da água (Figuras 6 a 11).

Os sistemas de recirculação de água utilizados para experimentos nos laboratórios são constituídos basicamente por aquários de vidro, caixas d'água de polietileno, tanques elevados e de filtros para tratamento da água. Em todos os sistemas de recirculação, os aquários e demais unidades para estocagem dos peixes são interligados a um módulo de filtragem, com exceção dos sistemas estáticos onde não há circulação de água. Normalmente, o módulo de filtragem é constituído por um decantador para remoção de sólidos, por um filtro biológico para reciclagem de nutrientes, e de um tanque provido com forte aeração para eliminação de gases, onde é instalada uma bomba elétrica para recircular a água. Muitos experimentos devem ter o fotoperíodo controlado que poderá ser feito com *timers* conectados ao sistema de iluminação para ajustar a luminosidade do local e variar de acordo com os experimentos, por exemplo, 16 horas claro e 8 horas escuro.

O aquecimento da água poderá ser feito com resistências elétricas blindadas conectadas a termostatos e mantidas no interior dos tanques utilizados para aeração e retorno da água para os aquários. A segurança do sistema é feita por meio de disjuntores elétricos instalados em um painel lógico programado para prevenir qualquer acidente devido às fugas de energia e para a manutenção da temperatura dentro dos limites desejados. Em algumas situações o controle do pH poderá ser feito com a adição de hidróxido de cálcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e/ou hidróxido de potássio (KOH).

A infraestrutura do laboratório dependerá muito da sua própria missão e também dos objetivos dos trabalhos que serão realizados. Os sistemas modulares de aquários de vidro e tanques de grande volume estão instalados no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.



Foto: Julio Ferraz de Queiroz

**Figura 6.** Sistema modular composto por 32 aquários de 300 litros interligados a 4 sistemas de filtragem independentes para recirculação e aquecimento da água.



Foto: Julio Ferraz de Queiroz

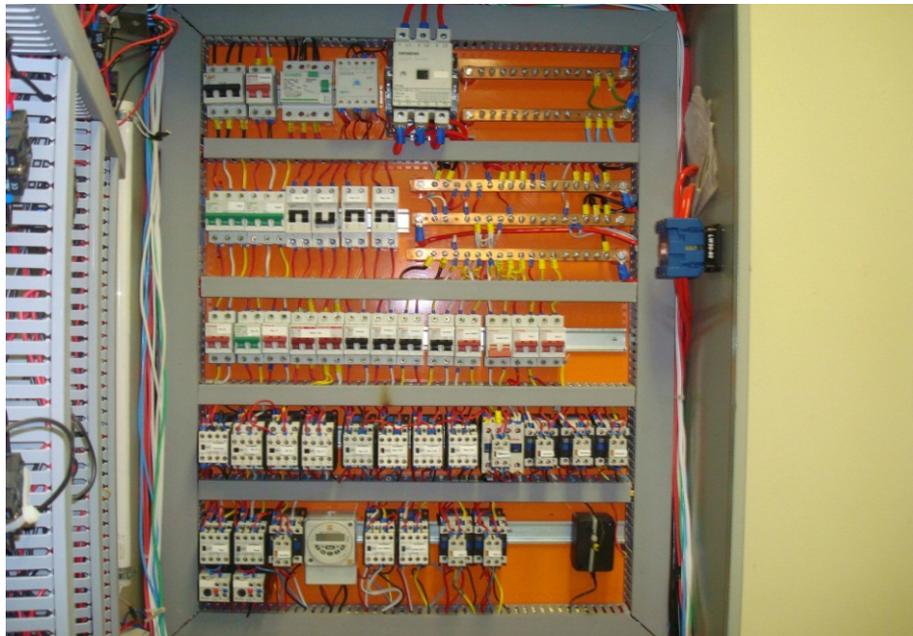
**Figura 7.** Sistema modular composto por 18 aquários de 200 litros sem recirculação de água.

Foto: Julio Ferraz de Queiroz



**Figura 8.** Painel elétrico constituído de controles lógicos programados para monitoramento da temperatura da água dos aquários, do funcionamento das bombas elétricas de recirculação da água e dos aeradores.

Foto: Julio Ferraz de Queiroz



**Figura 9.** Detalhe interno dos componentes do painel elétrico para monitoramento da temperatura da água dos aquários, do funcionamento das bombas elétricas de recirculação da água e dos aeradores.



Foto: Julio Ferraz de Queiroz

**Figura 10.** Sistema fechado com recirculação de água para tratamento dos efluentes e descarte da água utilizada em experimentos de sanidade e ecotoxicologia.



Foto: Julio Ferraz de Queiroz

**Figura 11.** Sistema modular composto por 15 aquários de vidro de grande volume com recirculação de água - 3 aquários de 1.444 litros e 12 aquários de 944 litros.

## Materiais, organização e planejamento

A terceira etapa consiste na elaboração do *checklist* dos materiais, da aquisição e preparo dos reagentes que serão necessários durante a execução do experimento.

Os materiais e reagentes devem ser conferidos, e para cada experimento deve-se elaborar um *checklist* detalhado. Um *checklist* modelo pode ser elaborado para cada laboratório em particular e adaptado de acordo com a finalidade dos experimentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Modelo de Checklist para o preparo dos materiais e reagentes utilizados nos experimentos in vivo no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

<p><b>Título do Experimento:</b> _____</p> <p style="text-align: right;">Data: _____</p> <p style="text-align: center;">CHECKLIST – Material e roteiro dos procedimentos</p>
<p><b>Manejo dos peixes e biometria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dois baldes com água sem anestésico, um balde com água com anestésico, e uma bomba para aerar a água nos baldes</li> <li>✓ Puçá, luvas e EPIs que forem necessários de acordo com os produtos utilizados no experimento</li> <li>✓ Balança digital, régua, bandeja plástica rasa ou tábua de corte em polietileno ou plástico, pano úmido, ficha para anotar a biometria e lápis</li> <li>✓ Lixeira para descarte de lixo comum</li> </ul>
<p><b>Materiais para hematologia</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bandeja rasa ou tábua de carne, pano úmido e papel-toalha</li> <li>✓ Coletor de perfurocortante e lixeira para descarte das agulhas e seringas</li> <li>✓ Seringas com agulhas descartáveis e anticoagulante (EDTA 3%)</li> <li>✓ Tubos tipo eppendorf para armazenar o sangue coletado de peixes que são identificados com números</li> <li>✓ Isopor com gelo reutilizado e estante para os tubos eppendorf</li> <li>✓ Tiras de glicemia e aparelho para dosagem de glicemia</li> <li>✓ Tubos para dosagem de hemoglobina e eppendorfs para contagem de eritrócitos</li> <li>✓ Tubos de microhematócrito, centrífuga e massinha para vedar o microhematócrito</li> <li>✓ Micropipetas automáticas (10µl, 20µl, 100µl, 200µl) e ponteiros</li> <li>✓ Lâminas de vidro identificadas com número dos peixes em duplicatas e lâmina extensora</li> <li>✓ Refratômetro, espectrofotômetro e centrífuga para microtubos</li> <li>✓ Pissete com água destilada, papel-toalha e papel macio para limpar o refratômetro</li> <li>✓ Caixa para lâminas, suporte para lâminas e corante MGGW</li> </ul>

continua...

Tabela 2. Continuação.

<b>Título do Experimento:</b> _____  Data: _____  CHECKLIST – Material e roteiro dos procedimentos
<b>Materiais para histologia</b> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Bandeja com pano úmido para manter os peixes em ordem até o momento da necropsia</li><li>✓ Papel vegetal ou papel comum e lápis para identificar os peixes</li><li>✓ Tábua de corte em polietileno ou plástico</li><li>✓ Frascos com formol 10% identificados com o número dos peixes</li><li>✓ Material cirúrgico e lâminas para bisturi</li><li>✓ Pissete com água, pissete com álcool e papel-toalha</li><li>✓ Ficha para anotar observações ou lesões, saco para descarte das carcaças</li></ul>
<b>Materiais para filetagem e coleta de fígado e/ou intestino</b> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Balança digital</li><li>✓ Bandeja com pano úmido para manter os peixes em ordem até o momento da necropsia</li><li>✓ Papel vegetal ou papel comum e lápis para identificar os peixes</li><li>✓ Tábua de corte para abrir os peixes, filetar e dissecar o fígado</li><li>✓ Material cirúrgico (tesouras, pinças, bisturis) e lâminas para bisturi</li><li>✓ Potes e/ou placas de vidro para manter amostras a serem analisadas</li><li>✓ Potes e/ou sacos plásticos para congelar os filés, os fígados ou intestinos</li><li>✓ Pissete com água destilada, pissete com álcool e papel-toalha</li><li>✓ Ficha para anotar observações ou lesões, saco para descarte das carcaças</li></ul>

## Equipe técnica e treinamento

A quarta etapa refere-se à mão-de-obra qualificada para execução do experimento. A equipe técnica precisa ser qualificada e deve contemplar todos os procedimentos que serão necessários na execução dos experimentos. Por isso, o número de pessoas envolvidas pode variar muito para cada experimento e, geralmente, a equipe é multidisciplinar, o que reforça e justifica a necessidade de treinamentos contínuos. Cabe ressaltar que todos da equipe diretamente envolvidos nos procedimentos com os peixes devem possuir experiência comprovada e previamente aprovada pela CEUA de acordo com a Resolução Normativa CONCEA Nº 49/2021.

A equipe deve atender todas as atividades referentes a realização do experimento, desde o manejo dos peixes, condução do experimento, coleta e processamento das amostras, realização das análises e interpretação dos resultados. Deverá seguir o protocolo aprovado pela CEUA, assim como fazer uso dos EPs, conhecer e seguir as normas de segurança do Laboratório.

Cada experimento exige um *checklist* das atividades e dos materiais necessários, e todos devem estar cientes sobre os objetivos do experimento e da função de cada um, e deve ocorrer uma comunicação efetiva entre todos os envolvidos. Caso existam dúvidas ou pessoas que ainda não estejam familiarizados com os procedimentos, é necessário realizar um treinamento específico para o experimento ou um teste piloto. Muitas vezes, o treinamento específico e o teste piloto podem ser realizados sem o uso dos animais, mas com amostras conservadas e coletadas em experimentos anteriores, ou mesmo com amostras não biológicas.

## Considerações Finais

A execução de experimentos que envolve animais exige planejamento, comprometimento e dedicação de todos os participantes. A pesquisa que envolve o uso de animais deve ser conduzida quando não houver outra alternativa, e nestes casos, para garantir o bem-estar dos animais, o treinamento, a educação e a informação dos envolvidos devem ser priorizados. Este documento apresenta, também, os procedimentos básicos para orientar técnicos, alunos e profissionais que trabalham com experimentos *in vivo* com peixes para agilizar e viabilizar a execução com qualidade, bem-estar animal e segurança de todos.

## Agradecimentos

Ao “Projeto BRS Aqua”, parceria celebrada entre o BNDES e a Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA, contrapartida da Embrapa e apoio do CNPq.

## Referências

- APPLEBY, M. C.; OLSSON, I. A.; GALINDO, F. (ed.). *Animal welfare*. 3.ed. Wallingford, CABI, 1998. 440 p.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v. 42, p. 517–525, 2002.
- BOYD, C. E.; D'ABRAMO, L. R.; GLENCROSS, B. D.; HUYBEN, D. C.; JUAREZ, L. M.; LOCKWOOD, G. S.; MCNEVIN, A. A.; TACON, A. G. J.; TELETCHEA, F.; TOMASSO, J. R.; TUCKER, C. S.; VALENTI, W. C. Achieving sustainable Aquaculture: historical and current perspectives and future needs and challenges. **Journal of the World Aquaculture Society**, volume 51, 578 – 633. 2020.
- BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F.; MCNEVIN, A. Perspectives on the responsible aquaculture movement. **World Aquaculture**, v. 44, n. 4, p. 14-21, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de consolidação n. 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do sistema único de saúde. **Diário Oficial da União**, n.190 de 03 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, n. 39, de 14 dez. 2011.

BRESEGHELO, L.; CARDOSO, M. P.; OLIVEIRA, R. B.; COSTA, M. F.; BARRETO, J. C. B.; SABÓIA-MORAIS, S. M.; T.YAMADA, A. T. Effects of sodium fluoride in gill epithelium of guppy fish (*Poecilia vivipara*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.4, p. 274-280, 2004.

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. **Psychological stress and disease**. **JAMA**, v. 298, n. 14, p. 1685-1687, 15 oct. 2007.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução normativa n. 30 de 02 de fevereiro de 2016**. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos: DBCA. Disponível em: <<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>>. Acesso em: 16 jul. 2020.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58.

FENWICK, N.; GRIFFIN G.; GAUTHIER, C. The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 523–530, 2009.

FRANCIS-FLOYD, R.; WATSON, C.; PETTY, D.; POWDER, D. B. **Ammonia in aquatic systems**. University of Florida/IFAS Extension, revised June 2022. 6 p. (School of Forest, Fisheries, and Geomatics Sciences, UF/IFAS Extension, FA16). Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FA03100.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2023.

ISHIKAWA, M. M.; SILVA, M. S. G. M. e; PÁDUA, S. B. de; OLIVEIRA, J. A.; DIAS, D. V. L.; SOUZA, B. H. **Procedimentos básicos para monitoramento da parasitofauna de peixes**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2016. 5 p. (Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica, 24).

ISHIKAWA, M. M.; QUEIROZ, J. F. de; NASCIMENTO, J. L. do; PÁDUA, S. B. de; MARTINS, M. L. **Uso de biomarcadores em peixe e boas práticas de manejo sanitário para a piscicultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2020. 28 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 126).

JERÔNIMO, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. **Coleta de parasitos em peixes de cultivo**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 36 p.

MARTINEZ, C. B. R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E. U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2006. p.81-90.

OLIVEIRA, R. F.; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.77-86, suplemento especial, 2007.

PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n. 1, 81 - 88, 2005.

SANTOS, A. F. **Determinantes psicossociais da capacidade adaptativa**: um modelo teórico para o estresse. 2010. 318 p. Tese (Doutorado em Psicologia Social) - Instituto de Psicologia, UFBA, Salvador.

TAVARES-DIAS, M. (org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. 723 p.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v.19, 10611, p.1-17. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513421000272>>. Acesso em: 02 ago. 2021.

**Embrapa**

---

**Meio Ambiente**

**MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA E  
PECUÁRIA**

**GOVERNO FEDERAL**  
  
**UNIÃO E RECONSTRUÇÃO**