

MANUTENÇÃO DE ANFÍBIOS E PEIXES EM LABORATÓRIO: PRÁTICAS E PROTOCOLOS

**VALENTINA WARKEN PRIGOL^{1,2*}; JENIFER EDUARDA LUTEREK^{1,2};
CRISTINA BRIDI^{2,3}; GABRIEL HENRIQUE KLEIN^{2,4}; FLÁVIA CHAGAS^{2,5}; ALINE
POMPERMAIER^{2,6}; PAULO AFONSO HARTMANN^{2,7}; MARILIA HARTMANN^{2,8}**

1 Introdução

Os peixes são organismos modelo padronizados, por isso fornecem respostas robustas sobre a toxicidade de contaminantes aquáticos (Aschener et al., 2025). Os anfíbios são outro grupo de vertebrados que dependem do ambiente aquático e têm sido utilizados como bioindicadores pela sua sensibilidade a alterações ambientais (Li et al., 2025) e por estarem em declínio (Pottier et al., 2025). Os bioensaios com esses dois grupos de animais são realizados principalmente, em microcosmos, em ambiente laboratorial, e dependem da adequada criação e manutenção das espécies.

Em peixes, as metodologias para *Danio rerio* são descritas principalmente nos protocolos da ABNT NBR 15088 (2022), NBR 15499 (2022), mas para anfíbios não existem normas brasileiras, sendo necessário utilizar as internacionais como base (e.g. ASTM E729, 2014). Esses protocolos padronizados nem sempre são acessíveis para a realidade dos laboratórios, pois a criação e manutenção de peixes e anfíbios em diferentes locais tem necessidades e adequações ao espaço, infraestrutura e a disponibilidade de insumos. Para anfíbios existem poucos estudos sobre a padronização (Felicioni et al., 2025), mas ainda existem lacunas a serem cobertas sobre as metodologias de criação, que se adequem as realidades de cada laboratório.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, contato: valentina.prigol@gmail.com;

² Grupo de Pesquisa: Conservação e Biodiversidade da Fauna;

³ Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UFFS campus Erechim;

⁴ Mestrando no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UFFS campus Erechim;

⁵ Doutoranda no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UFFS campus Erechim;

⁶ Pós-doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental, professora substituta da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim;

⁷ Doutor em Ciências Biológicas, Professor titular da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim;

⁸ Doutora em Ciências Biológicas, Professora titular da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim – **Orientadora.**

2 Objetivos

O objetivo deste estudo foi realizar a criação e manutenção de *Danio rerio* e girinos de *Physalaemus cuvieri*, no ambiente laboratorial da Universidade Federal Fronteira Sul – Campus Erechim, avaliando condições adequadas para a sobrevivência e bem-estar dos animais.

3 Metodologia

Para os peixes *D. rerio*, foram realizados e documentados os protocolos para procedimentos de criação e manutenção já utilizadas no Laboratório de Ecologia e Conservação (LABECO) da UFFS - Campus Erechim. No protocolo foram reunidas as principais metodologias de orientações para aclimação, alimentação, limpeza dos aquários, qualidade da água, indicadores de bem-estar e reprodução. Também, foram documentados outros procedimentos do laboratório como Sal de Banho e água deionizada. Os exemplares adultos de *D. rerio* foram adquiridos comercialmente

Para anfíbios, além de documentar o protocolo utilizado, foram realizados três experimentos (CEUA 1299100124), seguindo a metodologia descrita por Felicioni et al., (2025), para análise de alimentação, e condições de pH e oxigênio na água. Para os três experimentos, foram utilizadas desovas de *P. cuvieri*, coletadas na natureza. No laboratório, os embriões, no estágio 15 de desenvolvimento (Gosner, 1960) foram transferidos para um aquário contendo 3 litros de água FETAX (protocolo ASTM E1439-12) e um aerador para oxigênio, onde foram mantidos até atingirem o estágio 25, girinos completos.

Para o ensaio sobre alimentação, girinos foram separados grupos de 10, colocados em potes de vidro com FETAX e oxigenação constante. Foram utilizados 3 potes para cada tipo de alimento a ser testado, formando triplicatas: 1) ração artificial para peixe, Alcon Basic, Alcon® (a mesma utilizada na criação), 2) alface cozida, 3) espinafre cozido, 4) ração + alface cozida e 5) ração + espinafre cozido. O ensaio teve duração de 13 dias em sistema estático. Ao final do ensaio, os girinos foram medidos e pesados, e foi calculado o índice de massa corporal (IMC).

No segundo experimento, foram avaliados os efeitos de diferentes níveis de pH e no terceiro, o oxigênio dissolvido ambos com 10 girinos por pote em triplicata, com duração de 96 horas para avaliar sobrevivência. O pH foi ajustado e foram testados os valores de 5,5 (ácido), 7,3 (neutro) e 8,3 (básico), com oxigenação constante em todos. No Oxigênio, foi testada alta

oxigenação, com valores de 6,8 mg/L; média, com 5,5 mg/L e sem oxigenação; onde os valores ficaram em 3,8 mg/L em média. A alimentação nesses ensaios foi ração comercial. A sobrevivência foi observada todos os dias e os mortos foram retirados. A análise de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, usando a razão de risco (HR: Hazard Ratio) de Mantel-Haenszel, pelo programa GraphPad Prism. A concentração letal (CL50) foi calculada utilizando o software CompuSyn.

4 Resultados e Discussão

4.1 Danio rerio

Ao chegarem ao laboratório, os adultos de *D. rerio* passam por um período de aclimatação de 15 dias e permanecem em quarentena antes de serem introduzidos nos aquários, mantidos em aeração constante, temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo controlado. A alimentação foi realizada com ração comercial para peixe Alcon Basic, Alcon®, ad libitum, duas vezes ao dia durante a semana e uma vez ao dia nos finais de semana.

A água utilizada foi deionizada, com qualidade monitorada regularmente quanto ao pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito, dureza e alcalinidade. A cada 7 dias foi realizada limpeza dos vidros dos aquários e a cada 3 dias a troca parcial da água (TPA), em diferentes dias. Além disso, foram monitorados os indicadores de bem-estar dos peixes, como comportamento de natação, alimentação, respiração, crescimento e ausência de alterações na coloração ou deformidades. Peixes com alterações foram separados em aquários menores e monitorados continuamente.

Na ocasião em que houve suspeita de doença nos *D. rerio*, foi realizado banho de sal, com solução salina de 0,5% por 10 minutos, observando-os por 40 minutos e após recolocando-os no aquário, sendo o procedimento repetido por três dias consecutivos. Houve melhora após esse tratamento.

Não foi evidenciado diferença na rotina diária de manejo no Laboratório de Ecologia e Conservação e os métodos descritos nos protocolos elaborados, sendo que a contribuição deste trabalho se constitui na padronização e organização das práticas já adotadas em um documento único, com o objetivo de uniformizar os procedimentos e manter a qualidade no manejo dos animais em laboratório e criar o Procedimento Operacional Padrão.

4.2 Physalaemus cuvieri

Durante a criação até o estágio 25, os girinos foram alimentados uma vez ao dia com ração artificial para peixe, Alcon Basic, Alcon®, não houve troca de água e foi mantida aeração constante. Esse procedimento é o utilizado normalmente no laboratório e não tem ocorrência de mortalidade.

No ensaio sobre alimentação os girinos de *P. cuvieri* apresentaram massa similar ao final do ensaio ($F_{(4,97)} = 0,935$, $p = 0,4466$), no entanto o comprimento foi maior nos girinos alimentados com espinafre + ração ($F_{(4,97)} = 8,047$, $p < 0,0001$). Já o índice de massa corporal (IMC) foi maior nos alimentados somente com alface e com espinafre + ração ($F_{(4,97)} = 3,133$, $p = 0,0181$). Felicioni et al. em ensaio usando girinos de *P. cuvieri*, encontrou que a melhor alimentação seria com dieta mista (ração para peixes + alface). O presente estudo complementa essas informações, incluindo alface cozida e espinafre + ração como boas alternativas em laboratório.

No segundo ensaio a sobrevivência dos girinos foi afetada apenas na água com pH ácido ($\chi^2 = 8,65$; $p = 0,01$). No terceiro, não houve diferença na sobrevivência dos girinos nas três medidas de oxigênio testado ($\chi^2 = 3,81$, $p = 0,14$), embora a maior mortalidade tenha sido nos potes com 3,8 mg/L.

Isso demonstra que a manutenção da qualidade da água em laboratório é muito importante, com ajustes de pH quando necessário, especialmente se ele tender para ácido. A oxigenação constante também melhora a qualidade de vida dos animais, pois embora não tenha tido diferença, houve maior mortalidade quando a água não recebeu aeração.

5 Conclusão

A organização, documentação e descrição dos métodos de práticas e protocolos dos procedimentos de criação e manutenção de *D. rerio* já utilizados no Laboratório de Ecologia e Conservação (LABECO) da UFFS - Campus Erechim, possibilitam a padronização das rotinas do laboratório, permitindo maior organização das atividades, segurança e confiabilidade dos experimentos e principalmente o bem-estar dos animais.

Para *P. cuvieri*, percebe-se que existem várias alternativas de alimentação que podem ser usadas para manter boas condições fisiológicas dos animais, e que os outros fatores: como pH e oxigênio, que já são cuidados no laboratório, realmente são importantes. Esse estudo visa o bem-estar dos animais no laboratório, pois ambos os organismos são organismos modelo,

importantes na pesquisa científica.

Referências Bibliográficas

ABNT, NBR15088, 2022. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Normas técnicas.

ABNT, NBR15499, 2022. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes. Normas técnicas.

ASCHNER, M. et al. **Model organisms in toxicology**. Frontiers in Toxicology, v. 7, p. 1560492, 2025.

ASTM E729, 2014. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM International.

FELICIONI, G. et al. Standardization of methods for conducting ecotoxicological bioassays with amphibians: A case study on *Physalaemus cuvieri*. In: Hartmann et al. **Water, Pesticides, Organisms: Current Approach of Ecotoxicology**, Nova Publisher, 2025.

LI, Z. et al. **Identifying priority conservation areas for threatened amphibian habitats in the Yangtze river Delta region to maintain regional biodiversity**. Journal of Environmental Management, v. 373, p. 123766, 2025.

POTTIER, P. et al. **Vulnerability of amphibians to global warming**. Nature, p. 1-8, 2025.

Palavras-chave: *Danio rerio*; *Physalaemus cuvieri*; manutenção; bem-estar

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0148

Financiamento

