



Revista Bioética

ISSN: 1983-8042

bioetica@portalmedico.org.br

Conselho Federal de Medicina

Brasil

dos Santos Silva, Josielma; Barros dos Santos Rocha, Iolanda Karoline; Carvalho de  
Freita, Lucenilde; Jovita Pereira, Natália; Nonata Fortes Carvalho Neta, Raimunda

Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos

Revista Bioética, vol. 23, núm. 2, 2015, pp. 409-418

Conselho Federal de Medicina

Brasília, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361540658020>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos

Josielma dos Santos Silva<sup>1</sup>, Iolanda Karoline Barros dos Santos Rocha<sup>2</sup>, Lucenilde Carvalho de Freitas<sup>3</sup>, Natália Jovita Pereira<sup>4</sup>, Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta<sup>5</sup>

## Resumo

A ecotoxicologia aquática analisa os efeitos adversos dos poluentes químicos na biota, utilizando-se de animais nos ensaios laboratoriais. Neste trabalho, objetivou-se analisar a adequação dos ensaios laboratoriais realizados com organismos aquáticos com base nos princípios dos 3 R. Foram realizadas revisões de 20 artigos sobre ecotoxicologia aquática, publicados no período de 2010 a 2014. A análise verificou o número de animais utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, aclimação, aprovação da pesquisa por comitê de ética e uso de anestésicos. Os resultados indicam que os princípios de refinamento e substituição, do programa dos 3R, foram os que mais ocorreram nas pesquisas, porém a maioria delas não citou aprovação dos protocolos experimentais por um comitê de ética nem o uso de anestésicos nos organismos durante os experimentos. As pesquisas publicadas indicam a necessidade de redução do número de organismos nos bioensaios, bem como a aplicação dos princípios bioéticos na experimentação realizada com organismos aquáticos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia. Experimentação animal. Bioética. Ética-Animais.

## Resumen

### Principios bioéticos aplicados a los estudios ecotoxicológicos acuáticos

La ecotoxicología acuática analiza los efectos adversos de los contaminantes químicos en la biota, utilizando animales en las pruebas de laboratorio. En este trabajo se tuvo como objetivo analizar la adecuación de las pruebas de laboratorio realizados con organismos acuáticos basadas en los principios de las 3Rs. Se realizaron revisiones en 20 artículos sobre Ecotoxicología acuática, publicados en el periodo de 2010 a 2014. Se verificó el número de animales utilizados en las pruebas ecotoxicológicas y en la aclimatación. La investigación fue aprobada por el comité de ética y para la utilización de anestésicos. Los resultados indican que los principios Refinamiento y Sustitución, del programa de las 3Rs, fueron los más encontrados en los estudios, pero que la mayoría no citó aprobación de los protocolos experimentales por un comité de ética, ni para el uso de anestésicos en los organismos durante los experimentos. Las investigaciones publicadas indican la necesidad de reducir el número de organismos en las biopruebas, así como la aplicación de los principios de la bioética en la experimentación realizada con los organismos acuáticos.

**Palabras-clave:** Ecotoxicología. Experimentación animal. Bioética. Ética-Animales.

## Abstract

### Bioethical principles applied to aquatic ecotoxicological studies

Aquatic ecotoxicology analyzes the adverse effects of chemical pollutants in the biota. The aim of this study was to analyze the adequacy of the laboratory trials with aquatic organisms, based on the principles of the 3Rs. Twenty articles on aquatic ecotoxicology published from 2010 to 2014 were reviewed. The numbers of animals utilized in ecotoxicology trials, acclimatization, research approved by the committee on ethics and utilization of anesthetics were verified. The findings indicate that the principles of refinement and replacement, of the 3Rs program, were the most encountered in the research; while most did not cite approval of experimental protocols by an ethics committee, nor the use of anesthetics on the organisms during the experiments. The research published indicates a need to reduce the number of in the bio-trials, and to apply principles of bioethics in experimentation with aquatic organisms.

**Keywords:** Ecotoxicology. Animal experimentation. Bioethics. Ethics-Animals.

1. **Graduanda** josielmasilva@hotmail.com.br 2. **Graduanda** iolanda.rbarros@gmail.com 3. **Graduanda** lucenildecf@hotmail.com 4. **Graduanda** natalia.jovita@hotmail.com 5. **Doutora** raifortes@gmail.com – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís/MA, Brasil.

## Correspondência

Josielma dos Santos Silva – Rua 6, quadra 92, bloco A, casa 3, Cidade Olímpica CEP 65058-501. São Luís/MA, Brasil.

Declararam não haver conflito de interesse.

A ecotoxicologia descreve a relação entre os poluentes químicos, o ambiente em que são liberados e os organismos que ali vivem. Estudos mais aprofundados dessas substâncias se fazem necessários, a fim que de seus riscos potenciais possam ser minimizados e medidas saneadoras possam ser efetivadas, de modo a atenuar seus prováveis impactos <sup>1</sup>. Logo, a ecotoxicologia apresenta-se como ferramenta destinada a analisar a exposição dos diversos xenobiontes ao meio em que foram inseridos <sup>2</sup> e os efeitos adversos de poluentes exógenos no ambiente e nos organismos aquáticos <sup>3</sup>.

A avaliação ecotoxicológica é de extrema importância no controle, regulamentação e classificação das substâncias tóxicas quanto a seu potencial de risco ambiental. A identificação dos efeitos e a avaliação da relação da dose-resposta são etapas iniciais no processo de análise do risco ambiental <sup>4</sup>. Muitos ensaios também são realizados com o propósito de avaliar tanto a sensibilidade relativa de organismos aquáticos em relação a determinado agente tóxico quanto a eficiência de diferentes métodos de tratamento de efluentes industriais <sup>5</sup>.

A bioética exige a conjunção de várias disciplinas, visando à correta utilização dos conhecimentos adquiridos pela ciência, bem como valores éticos e fatos biológicos. Sua primeira e mais conhecida linha teórica, a bioética principialista é norteada pelos princípios da beneficência, da não maleficência, da autonomia e da justiça <sup>6</sup>. A beneficência é definida como a análise dos benefícios gerados ao indivíduo participante da pesquisa e posteriormente à sociedade; a não maleficência é caracterizada por evitar danos decorrentes do andamento do estudo, os quais poderiam afetar o sujeito da pesquisa; a autonomia é definida como o respeito à capacidade de escolha do indivíduo; e a justiça está relacionada a uma distribuição equitativa dos benefícios pelos seres <sup>7</sup>. Em relação aos princípios propostos pela *Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos* (DUBDH) <sup>8</sup>, benefício e dano referem-se à maximização de bens e minimização de danos aos indivíduos do estudo e outros envolvidos; e à proteção do meio ambiente, da biosfera e da biodiversidade, caracterizada pela compreensão da interdependência entre seres humanos e outras formas de vida.

Em muitos casos, os princípios da bioética – que incluem, além da teoria do principialismo e da DUBDH <sup>8</sup>, as ideias dos 3 R, propostas pelos estudiosos Russell e Burch <sup>9</sup> – não são observados quando se trabalha com a maioria dos organismos utilizados em procedimentos, ou essas informações não

são citadas nos artigos científicos publicados. Além disso, as discussões bioéticas propõem diversas metodologias alternativas, cujo desenvolvimento e implantação nas instituições que utilizam animais em trabalhos científicos são processos complexos e amplos <sup>10</sup>.

A utilização de animais na pesquisa tem sido razão de diversas discussões bioéticas focadas no número elevado de animais e no sofrimento causado a eles. O programa dos 3 R – redução (*reduction*), refinamento (*refinement*) e substituição (*replacement*) – objetiva diminuir o número de animais, minimizar sua dor, desconforto e proporcionar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* <sup>10</sup>. E, com base nos princípios dos 3 R, este trabalho visou analisar a adequação de ensaios laboratoriais realizados com organismos aquáticos, em artigos publicados entre 2010 e 2014.

## A bioética e seus princípios

O termo “bioética” foi difundido pelo oncolologista e biólogo norte-americano Van Rensselaer Potter em seu livro “Bioethics: bridge to future” <sup>11</sup>. A disciplina foi criada com o objetivo de possibilitar que as ciências biológicas se tornassem mantenedoras da qualidade e melhoria de vida das futuras gerações <sup>12</sup>. Com o avanço das tecnologias, cresceu a utilização de animais em experimentos científicos, tornando necessária a ampliação das discussões éticas acerca dessas pesquisas. Como já mencionado, o zoólogo William M. S. Russell, juntamente com o microbiologista Rex L. Burch, propôs em 1959 os princípios dos 3 R, conhecidos como substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*) <sup>13</sup>. Tais princípios redirecionaram os trabalhos científicos envolvendo pesquisa com animais para o uso de modelos alternativos, a fim de *reduzir* não apenas a utilização de animais em experimentos, mas também a dor e o sofrimento que esses ensaios lhes causam <sup>14</sup>.

Historicamente, a discussão bioética esteve mais ligada a contextos médicos, tanto que, inicialmente, a formulação dos princípios éticos norteadores da atividade científica se deu mais em função de estudos envolvendo seres humanos. Tal concepção, mais tarde conhecida como teoria principialista, é moldada a partir de quatro princípios: não maleficência, beneficência, justiça e respeito à autonomia <sup>15</sup>. A não maleficência supõe não fazer mal ou evitar danos aos seres vivos; a beneficência refere-se à realização do bem e à máxima redução

do mal que se pode causar ao outro, reconhecendo seus valores morais; a justiça tem a equidade como principal eixo, isto é, todos devem ser atendidos da mesma forma, e o respeito à autonomia é descrito como a aceitação da autodecisão perante as situações do meio <sup>16</sup>, entendendo autonomia como a capacidade de escolha própria do indivíduo <sup>7</sup>.

Outro marco fundamental, relacionado com a organização e o direcionamento das questões bioéticas, foi a *Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos*, aprovada em outubro de 2005 pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Unesco) <sup>8</sup>. No documento constam alguns princípios, como dignidade humana e direitos humanos, autonomia e responsabilidade individual, consentimento, privacidade e confidencialidade, responsabilidade social e saúde. Além disso, cabe ressaltar outro dois preceitos contemplados na DUBDH, que são de particular interesse da pesquisa científica: benefício e dano, referente à maximização de bens e minimização de danos aos participantes da pesquisa e a outros envolvidos; proteção do meio ambiente, da biosfera e da biodiversidade, que pressupõe a interdependência dos sujeitos humanos com as outras formas de vida.

Tais princípios são muito mais aplicados em estudos vinculados aos seres humanos do que aos animais das diferentes categorias taxonômicas, razão pela qual ainda persistem inúmeras questões éticas a serem discutidas, entre as quais se inclui uma, bastante pertinente a este artigo: será que esses princípios da bioética podem ser aplicados a todos os grupos de organismos?

### Os ensaios ecotoxicológicos aquáticos e a bioética

Com a alta demanda por novos produtos tecnológicos e a contínua destruição dos recursos naturais pelas ações antrópicas, vários xenobiontes têm sido incorporados ao meio por via direta ou indireta, em fontes pontuais ou difusas <sup>17</sup>. Estudos sobre esses seres podem ser conduzidos diretamente no ambiente ou por bioensaios em laboratório (testes experimentais com metodologias distintas), regulados, inclusive, por normas nacionais e internacionais quanto à utilização de organismos bioindicadores em testes desse tipo <sup>18</sup>. Os organismos aquáticos são usualmente utilizados em testes ecotoxicológicos por vários motivos <sup>19</sup>, entre eles os seus processos fisiológicos, como nutrição e respiração, já que muitos respiram pelas brânquias, que estão em con-

tato direto com a água, o que pode carrear diversos contaminantes para o interior desses organismos, causando-lhes alterações morfofisiológicas <sup>20</sup>.

Para a identificação dessas mudanças morfofisiológicas (biomarcadores) nas espécies aquáticas, é necessário o uso de técnicas laboratoriais capazes de avaliar o grau de contaminação de uma área por certo poluente <sup>21</sup>. Nesses bioensaios, é possível verificar danos aos organismos (que morrem ou ficam imóveis), estimando-se a extensão de seus impactos no ambiente e nos seres humanos <sup>22</sup>. Os principais organismos utilizados nesses estudos são os peixes e os macroinvertebrados bentônicos, como, por exemplo, crustáceos do gênero *Daphnia*, que são facilmente cultivados *in situ* e apresentam características reprodutivas que satisfazem a finalidade desses estudos <sup>23</sup>. No caso dos peixes, entre as espécies consideradas padrão de referência internacional está a *Danio rerio*, principalmente porque o sequenciamento de seu genoma é semelhante aos demais vertebrados, inclusive os seres humanos <sup>24</sup>.

Atualmente, a comunidade científica tem se voltado para os aspectos éticos ligados à pesquisa com animais do filo *Chordata* (subfilo *Vertebrata*), para a qual existe legislação brasileira específica <sup>25</sup>. Existem também comitês de ética que avaliam estudos realizados com insetos e cefalópodos, mas sua atuação ainda é restrita, já que a legislação atual prioriza os organismos sencientes, que abrangem os animais vertebrados, cuja senciência é amplamente reconhecida no meio científico <sup>26</sup>; já os organismos considerados não sencientes, entre os quais se incluem os invertebrados, não recebem a mesma proteção destinada aos seres sencientes <sup>27</sup>.

Na maioria das vezes, as pesquisas que envolvem ensaios ecotoxicológicos (ou com invertebrados, ou com vertebrados) ocorrem sem aprovação dos comitês de ética. Além disso, muitos pesquisadores da área de ecotoxicologia aquática ainda mantêm pouco contato com a bioética, seja em sua formação inicial, seja em sua atuação laboratorial. Essa situação necessita ser considerada e alterada para que possa ter influência positiva sobre os resultados das pesquisas que chegam a ser publicadas e que servem de referência a novos trabalhos na área.

Diante do que foi até aqui exposto, objetivou-se, neste trabalho, analisar a adequação dos ensaios laboratoriais realizados com organismos aquáticos em artigos publicados no período de 2010 a 2014, baseado nos princípios dos 3 R. Nesse sentido, foram objeto de análise 20 artigos científicos publicados em 16 periódicos distintos, que abordam

estudos ecotoxicológicos com animais de diferentes categorias taxonômicas, visando à identificação dos princípios bioéticos aplicados à experimentação animal mais difundidos entre os pesquisadores.

## Percurso metodológico

Este estudo é revisão bibliográfica, cujas informações foram coletadas em artigos científicos sobre os procedimentos realizados em ensaios ecotoxicológicos aquáticos produzidos entre os anos de 2010 e 2014. Foram analisados 20 artigos, a partir de busca definida sistematicamente nas bases de dados cadastradas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Scientific Electronic Library Online (SciELO), contendo os seguintes descritores: “ecotoxicologia”; “estudos ecotoxicológicos”; “bioética”; “ética”.

Primeiramente, na organização dos dados, realizou-se a leitura dos resumos das 20 publicações científicas selecionadas, a fim de identificar os objetos de estudo dos trabalhos, priorizando os ensaios ecotoxicológicos<sup>28,29</sup>. Foram observados pelo menos

um dos princípios bioéticos em todos os 20 trabalhos. A técnica adotada pelas autoras na análise de conteúdo baseou-se na leitura dos trabalhos científicos escolhidos mediante o exame das principais informações, como número de animais utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, fase de desenvolvimento e aclimação, origem dos organismos (*in situ* ou *ex situ*) e pesquisa aprovada por comitê de ética. Pela análise de conteúdo de cada trabalho, verificou-se a adequação desses dados aos princípios dos 3 R (*replacement, reduction e refinement*)<sup>13</sup>. O “refinamento” foi analisado tendo-se como base a aclimação, a pesquisa aprovada pelo comitê de ética, protocolos metodológicos da ABNT (NBR 12713/2009<sup>30</sup> e 13373/2010<sup>31</sup>), a utilização de anestésicos. A técnica de identificação dos princípios bioéticos de William M. S. Russell e Rex L. Burch<sup>9</sup> foi a análise de conteúdo “temático-categorial”, envolvendo as seguintes etapas: pré-análise; exploração do material ou codificação; tratamento dos resultados; inferência e interpretação. Na organização dos dados referentes às produções científicas, foram utilizados *softwares* estatísticos, a fim de obter o gráfico e percentuais. Os 20 trabalhos estão listados no Quadro 1, a seguir.

**Quadro 1.** Artigos publicados entre os anos de 2010 e 2014 e utilizados na revisão bibliográfica deste estudo.

Nº	Autores	Nome do artigo	Revista	Ano
1	Rechenmacher C, Siebel AM, Goldoni A, Klauck CR, Sartori T, Rodrigues MT, Rodrigues MAS, Gehlen G, Ardenghi PG, Silva LB <sup>28</sup>	A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil	Brazilian Journal of Biology	2010
2	Nepomuceno JC, Silva AC <sup>32</sup>	Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo ( <i>Pimelodus maculatus</i> ) do rio Paranaíba	Perquirere: Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do Unipam	2010
3	Brandolt TD, Lobo E <sup>33</sup>	Avaliação Ecotoxicológica Utilizando Bioensaios com <i>Daphnia magna</i> em água de lavoura de arroz no município de Mostardas, RS, Brasil	Tecno-Lógica	2010
4	Barbola IF, Moraes MFP, Anazawa TM, Nascimento EA, Sepka ER, Polegatto CM, Milléo J, Schühli GS <sup>34</sup>	Avaliação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do rio Pitangui, Paraná, Brasil	Iheringia, Série Zoologia	2011
5	Moraes AV, Cortez FS, Bretas ES, Cesar E, Pereira CDS, Santos AR <sup>35</sup>	Avaliação da qualidade ambiental do rio Itaguaré, Bertioga-SP, com base em testes de toxicidade e indicadores microbiológicos de balneabilidade	O Mundo da Saúde	2011
6	Mendes BG, Budziak D, Stolberg J, Peixer ZI, Dalmarco JB, Simionatto EL, Pedrosa RC, Felipe KB, Ogawa J, Pegoraro C, Scheffer L, Besen MR, Oliveira LJGG, Geremias R <sup>36</sup>	Estudo da qualidade das águas do rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios	Revista de Ciências Ambientais	2011

Continua

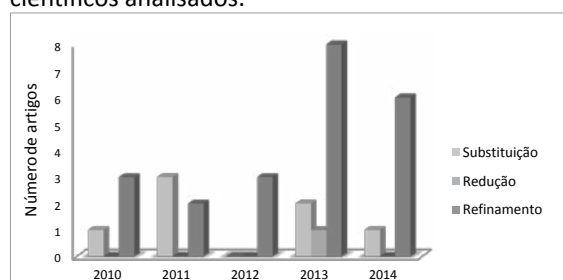
Nº	Autores	Nome do artigo	Revista	Conclusão	
				Ano	
7	Holanda JN, Maciel AP, Santos RL <sup>37</sup>	Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando <i>Danio rerio</i> como organismo-teste	Boletim do Laboratório de Hidrobiologia	2012	
8	Damato M, Barbieri E <sup>38</sup>	Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe <i>Hyphessobrycon callistus</i> utilizado como indicador de saúde ambiental	O Mundo da Saúde	2012	
9	Mannarino CF, Moreira JC, Ferreira JA, Arias ARL <sup>39</sup>	Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática	Ciência & Saúde Coletiva	2013	
10	Mohr G, Lobo EA <sup>40</sup>	Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento da água em pequena propriedade rural, utilizando bioensaios	Revista Jovens Pesquisadores	2013	
11	Gaspar N, Gago J, Repolho T, Luís O <sup>41</sup>	Avaliação da toxicidade das lamas de cal sobre o ouriço-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816). Perspectivas para novas aplicações destes resíduos industriais	Revista da Unidade de Investigação do Instituto Politécnico de Santarém	2013	
12	Hernandez OD, Castro F, Paez M <sup>42</sup>	Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia	Acta Biológica Colombiana	2013	
13	Canto T, Pich CT, Geremias R <sup>43</sup>	Bioensaios de toxicidade em percolados no aterro sanitário do município de Araranguá (Santa Catarina, Brasil)	Revista Biociências	2013	
14	Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF <sup>44</sup>	Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense, Brasil	Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia	2013	
15	Jacobowski AC, Zobiolo NN, Padilha PM, Moreno SE, Arruda EJ <sup>45</sup>	Efeito mutagênico do edetato de cobre ([Cu(EDTA)]-2) livre e nanoencapsulado em camundongos e peixes	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2013	
16	Rezende KFO, Santos RM, Santos RM, Shimada JCB, Silva JRMC, Muniz CASD <sup>46</sup>	Histopatologia das brânquias de tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> , provenientes da represa Billings, área de proteção ambiental Bororé-Colônia	Atlas de Saúde Ambiental – ASA	2013	
17	Pereira DP, Santos DMS, Carvalho Neta AV, Cruz CF, Carvalho Neta RNF <sup>47</sup>	Alterações morfológicas em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil)	Bioscience Journal	2014	
18	Benites LM, Doncato KB, Minho TS, Perazzo GX <sup>48</sup>	Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai	Ciência e Natura	2014	
19	Franco-Bernardes MF, Maschio LR, Azeredo-Oliveira MTV, Almeida EA <sup>49</sup>	Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in <i>Oreochromis niloticus</i> of different sizes	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2014	
20	Nour EAA, Candello FP, Santos EMR, Barretto AS, Domingues LM <sup>29</sup>	Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com <i>Daphnia similis</i>	Ecotoxicology and Environmental Contamination – EEC	2014	



## Uso dos princípios da bioética nos ensaios ecotoxicológicos

Os dados obtidos nas análises dos artigos científicos anteriormente elencados demonstram haver certa preocupação dos autores com o programa dos 3 R, já que a maioria dos trabalhos apresentava algum tipo de informação relacionada ao cuidado com os animais utilizados em estudos ecotoxicológicos. De acordo com esse programa, os conceitos encontrados foram refinamento, substituição e redução (Gráfico 1), dos quais os dois primeiros apareceram com maior frequência.

**Gráfico 1.** Distribuição dos 3 R em relação aos artigos científicos analisados.



Em relação ao número de animais usados nos procedimentos ecotoxicológicos, 4 artigos não citaram a quantidade de animais, porém os demais trabalhos (16) apresentaram essa informação. A maioria dos trabalhos analisados (14) utilizou entre 11 e 50 indivíduos nas pesquisas; todavia, 4 trabalhos utilizaram entre 300 e 18.473 exemplares. Somente 1 artigo científico utilizou até 10 indivíduos, adequando-se ao conceito “redução” do programa 3 R<sup>50</sup>. O grande número de organismos usados em um experimento científico pode ser explicado pela ausência de legislação que limite o uso de invertebrados em estudos científicos<sup>24</sup>, haja vista que esses estudos foram realizados com macroinvertebrados aquáticos e semiaquáticos. Esses tipos de estudo, que usam milhares de indivíduos, ainda não contemplam o programa dos 3 R<sup>29,50</sup>.

Até o presente momento, a preocupação com os aspectos éticos concentra-se em ensaios com animais do filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*. Existem alguns grupos e comitês de ética que também avaliam estudos realizados em insetos e cefalópodos. Tal fato, porém, ainda é exceção. Em função disso, também podem ser usados, em lugar dos animais vertebrados, organismos inferiores na escala zoológica, classificados como não protegidos, caracterizando o conceito “substituição”. Exemplo disso é a utilização de *Daphnia pulex*, *Artemia*

*salina* e abelhas em estudos, principalmente de ecotoxicologia<sup>51</sup>. Dessa forma, 30% dos trabalhos analisados que utilizaram espécies como *Daphnia similis*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Artemia sp.* foram avaliados como importantes no item “substituição” do programa dos 3 R.

Pouco mais da metade dos trabalhos analisados (53%) informou que foi realizada a aclimação dos organismos antes dos procedimentos ecotoxicológicos, indicando que se observou o princípio do refinamento, já que os animais foram mantidos em condições que minimizaram sua dor e estresse<sup>52</sup>. Esse tipo de procedimento é, inclusive, previsto pela legislação brasileira<sup>53</sup>. A aclimação é caracterizada por duradouros ajustamentos fisiológicos adaptativos dos organismos, que resultam em aumento da tolerância a contínuas ou repetitivas exposições a vários estressores climáticos, normalmente produzidos sob condições de campo<sup>54</sup>. A aclimação e a redução ou alívio da dor são consideradas aprimoramentos no cuidado dos animais, já que os pesquisadores devem saber como avaliar e monitorar a dor de modo a proporcionar tratamento ético aos animais<sup>55</sup>. Além das preocupações éticas, a dor e o estresse dos animais acarretam variáveis indesejáveis à pesquisa, já que podem interferir significativamente na interpretação dos resultados dos estudos<sup>56</sup>.

A utilização de anestesia foi informada em 15% dos artigos analisados, indicando que se considerou o princípio do refinamento, uma vez que essa técnica proporciona diminuição do sofrimento dos organismos utilizados nos experimentos<sup>52</sup>. Durante a prática de alguns procedimentos laboratoriais, os animais são submetidos a variados tipos de dor e sofrimento; logo, devem ser sedados e anestesiados corretamente<sup>57,58</sup>.

É importante ressaltar que 20% dos trabalhos científicos realizados *in situ* coletaram sangue periférico para confecção de esfregaços em lâminas, e, em seguida, os animais foram devolvidos ao seu *habitat*. Pesquisas desse tipo – que efetuam a devolução de todos os organismos ao ambiente, beneficiando tanto os pesquisadores quanto os animais pesquisados – são desejáveis porque diminuem os impactos sobre a fauna local e produzem informações mais fidedignas sobre a real situação do *habitat* natural das espécies analisadas, o que torna possível trabalhar até mesmo com mamíferos e espécies ameaçadas de extinção<sup>59</sup>.

Pouquíssimos artigos (20%) citaram a aprovação de seu protocolo experimental por um comitê de ética institucional. A grande maioria dos traba-

lhos (80%) não informou tal aprovação, nem mesmo destacou que a pesquisa envolvia larvas de espécies que se classificavam na categoria de “menor preocupação” pela International Union for Conservation of Nature (IUCN), e somente 25% citaram o uso de protocolos padronizados pela ABNT (NBR 12713/2009<sup>30</sup> e 13373/2010<sup>31</sup>). Trabalhos científicos envolvendo animais devem ser analisados por um comitê de ética, cuja função é orientar e revisar protocolos, bem como ampliar os conhecimentos sobre a conduta moral apropriada para com os animais<sup>60</sup>. É importante que o protocolo experimental seja analisado quanto ao aspecto das metodologias utilizadas, a fim de identificar os impactos causados aos animais em relação a dor, sofrimento, confinamento, estresse e morte<sup>14</sup>.

Os pesquisadores têm a responsabilidade de submeter seus protocolos de pesquisa a um comitê de ética que garanta a possibilidade de adaptar guias de boas práticas que assegurem o bem-estar dos organismos submetidos a estudo. O uso de espécies animais em diferentes contextos (desde testes ecotoxicológicos até produção animal e gestão de populações no âmbito de programas de conservação) merece a observação dos princípios da bioética<sup>61</sup>,

a fim de que a ciência possa evoluir no sentido de respeitar todas as formas de vida do planeta.

## Considerações finais

A discussão sobre metodologias e conceitos inovadores, introduzidos na pesquisa científica com animais, tem sido crescente nas publicações científicas nos últimos anos. Todavia, nos trabalhos publicados contendo resultados de testes ecotoxicológicos em ambientes aquáticos, ainda persistem diversas questões que precisam ser debatidas, tais como a necessidade concreta de aprovação dos protocolos experimentais por comitês de ética; observação dos princípios bioéticos atrelados às metodologias laboratoriais; uso de anestesia para minimizar o sofrimento dos animais; redução do número de organismos nos testes laboratoriais, e adoção de métodos alternativos à utilização de animal, sem afetar necessariamente o resultado da pesquisa. Discutir ideias bioéticas é fundamental, e os princípios dos 3 R devem ser considerados na elaboração de projetos e nas práticas da pesquisa científica atual na área de ecotoxicologia aquática.

## Referências

1. Stützer G, Guimarães G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: Zambolim L, Conceição MZ, Santiago T, organizadores. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV; 2003. p. 69-84.
2. Carvalho NL, Pivoto TS. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. Monografias Ambientais. [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];2(2):176-92. Disponível: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2315/1598>
3. Lombardi JV, Ferreira CM, Rodrigues EL. Toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM, Lizama MAP, organizadores. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela; 2004. p. 262-97.
4. United States Environmental Protection Agency. Short-term methods for estimating the toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. [Internet]. 4ª ed. Washington: EPA; 2002 [acesso 6 fev 2015]. Disponível: [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_wet\\_disk3\\_ctf1-6.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk3_ctf1-6.pdf)
5. Metcalf L, Eddy HP. Wastewater engineering: treatment in reuse. [Internet]. 4ª ed. Boston: McGraw Hill; 2003 [acesso 6 fev 2015]. Disponível: [http://www.mumbaidp24seven.in/reference/Ch\\_1WastewaterEngineering4thed\\_byMetcalfandEddy.pdf](http://www.mumbaidp24seven.in/reference/Ch_1WastewaterEngineering4thed_byMetcalfandEddy.pdf)
6. Schatzmayr HG, Müller CA. As interfaces da bioética nas pesquisas com seres humanos e animais com a biossegurança. Ciênc Vet Tróp. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];11(Supl 1):130-4. Disponível: <http://www.rcvt.org.br/suplemento11/130-134.pdf>
7. Silva JACD, Teixeira RKC, Monma CA, Neotti T. Perfil bioético dos anteprojetos enviados ao comitê de ética em pesquisa da Universidade do Estado do Pará. Rev. bioét. (Impr.). [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];19(2):563-75. Disponível: [http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/645/673](http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/645/673)
8. Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (Unesco). Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos. [Internet]. Paris: Unesco; 2006 [acesso 17 mar 2015]. Disponível: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180por.pdf>
9. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Londres: Ufaw; 1992.
10. Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – RBCF. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];40(3):289-99. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/04.pdf>



11. Potter VR. Bioethics: bridge to the future. Upper Saddle River: Prentice Hall; 1971.
12. Clotet J. Por que bioética? Revista Bioética. [Internet]. 1993 [acesso 6 fev 2015];1(1):13-9. Disponível: [http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/474/291](http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/474/291)
13. Franco AL, Nogueira MNM, Guimarães KS, Frota MF, Fernandes CMS, Sena MC. Animal research: a bioethical reflection. Acta bioeth. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];20(2):247-53. Disponível: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1726-569X2014000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-569X2014000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
14. Feijó AGS, Sanders A, Centurião AD, Rodrigues GS, Schwanke CHA. Análise de indicadores éticos do uso de animais na investigação científica e no ensino em uma amostra universitária da área da saúde e das ciências biológicas. Sci Med. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];18(1):10-9. Disponível: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewFile/2234/2807>
15. Hossne WS. Bioética: princípios ou referenciais. Mundo Saúde. [Internet]. 2006 [acesso 6 fev 2015];30(4):673-6. Disponível: [http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo\\_saude/41/20\\_bioetica\\_principio.pdf](http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/41/20_bioetica_principio.pdf)
16. Koerich MS, Machado RR, Costa E. Ética e bioética: para dar início à reflexão. Texto Contexto Enferm. [Internet]. 2005 [acesso 6 fev 2015];14(1):106-10. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v14n1/a14v14n1.pdf>
17. Andréa MM. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. Acta Zoológica Mexicana. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];26(número especial 2):95-107. Disponível: <http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v26nspe2/v26nspe2a7.pdf>
18. Torres GA, González SP, Peña ES. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Int J Morphol. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];28(3):703-12. Disponível: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022010000300008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022010000300008&script=sci_arttext)
19. Montes CS, Ferreira MAP, Santos SSD, Von Ledebur EICF, Rocha RM. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. Acta Scientiarum: Biological Sciences. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];32(1):93-99. Disponível: <http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/4800/5085>
20. Cantanhêde SM, Medeiros AM, Ferreira FS, Ferreira JRC, Alves LMC, Cutrim MVJ et al. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA. Arq Bras Med Vet Zootec. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];66(2):593-601. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352014000200037&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352014000200037&script=sci_arttext)
21. Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espíndola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim Nova. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];31(7):1820-30. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>
22. Linde-Arias AR, Inácio AF, Novo LA, Albuquerque C, Moreira JC. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. Environmental Pollution. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];156(3):974-9. Disponível: [http://ac.els-cdn.com/S0269749108002522/1-s2.0-S0269749108002522-main.pdf?\\_tid=5807f0ee-ae40-11e4-ac4e-00000aacb360&acdnat=1423255390\\_213d451feb2b30287c588875e3bdd976](http://ac.els-cdn.com/S0269749108002522/1-s2.0-S0269749108002522-main.pdf?_tid=5807f0ee-ae40-11e4-ac4e-00000aacb360&acdnat=1423255390_213d451feb2b30287c588875e3bdd976)
23. Domingos, FXV. Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
24. Oliveira EM, Goldim JR. Legislação de proteção animal para fins científicos e a não inclusão dos invertebrados: análise bioética. Rev. bioét. (Impr.). [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];22(1):45-56. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/bioet/v22n1/a06v22n1.pdf>
25. Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União. 10 set 2008;145(196): Seção 1, p. 1-2.
26. Presgrave OAF. The need for the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BracVAM). Altern Lab Anim. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];36(6):705-8. Disponível: [http://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/ATLA\\_BraCVAM\\_2008.pdf](http://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/ATLA_BraCVAM_2008.pdf)
27. Luna SPL. Dor, sensibilidade e bem-estar em animais: sensibilidade e dor. Revista Ciência Veterinária nos Trópicos. [Internet]. 2008 [acesso 6 fev 2015];11(Supl 1):17-21. Disponível: <http://www.rcvt.org.br/suplemento11/17-21.pdf>
28. Rechenmacher C, Siebel AM, Goldoni A, Klauck CR, Sartori T, Rodrigues MT et al. A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil. Braz J Biol. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];70(4 Supl):1223-30. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842010000600012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842010000600012&script=sci_arttext)
29. Nour EAA, Candello FP, Santos EMR, Barretto, AS, Domingues LM. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. Ecotoxicology and Environmental Contamination. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];9(1):77-85. Disponível: <http://siaiweb06.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/4557/3647>
30. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: ecotoxicologia aquática, toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT; 2009.

31. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13373: ecotoxicologia aquática, toxicidade crônica: método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT; 2010.
32. Nepomuceno JC, Silva AC. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. Perquirere. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];7(1):167-79. Disponível: [http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/36602/Avaliacao\\_da\\_frequencia\\_de\\_micronucleos\\_em\\_e\\_ritrocitos.pdf](http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/36602/Avaliacao_da_frequencia_de_micronucleos_em_e_ritrocitos.pdf)
33. Brandolt TD, Lobo EA. Avaliação ecotoxicológica utilizando bioensaios com *Daphnia magna* em água de lavagem de arroz no município de Mostardas, RS, Brasil. Tecno-Lógica. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];14(2):47-51. Disponível: <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/1580/1147>
34. Barbola IF, Moraes MFPG, Anazawa TM, Nascimento EA, Sepka ER, Polegatto CM et al. Avaliação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do rio Pitangui, Paraná, Brasil. Iheringia, Sér Zool. [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];101(1-2):15-23. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/isz/v101n1-2/v101n1-2a02.pdf>
35. Morais AV, Cortez FS, Bretas ES, Cesar A, Pereira CDS, Santos AR. Avaliação da qualidade ambiental do rio Itaipu, Bertioga-SP, com base em testes de toxicidade e indicadores microbiológicos de balneabilidade. Mundo Saúde (Impr.). [Internet]. 2011 [acesso 6 fev 2015];35(1):55-63. Disponível: [http://saocamillo-sp.br/pdf/mundo\\_saude/83/55a63.pdf](http://saocamillo-sp.br/pdf/mundo_saude/83/55a63.pdf)
36. Mendes BG, Budziak D, Stolberg J, Peixer ZI, Dalmarco JB, Simionatto EL et al. Estudo da qualidade das águas do rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. Revista de Ciências Ambientais. [Internet]. 2011 [acesso 7 fev 2015];5(2):43-58. Disponível: <http://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/260/252>
37. Holanda JN, Maciel AP, Santos RL. Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio rerio* como organismo-teste. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia. [Internet]. 2012 [acesso 6 fev 2015];25(1):13-20. Disponível: <http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/blabohidro/article/viewFile/1924/73>
38. Damato M, Barbieri E. Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. Mundo Saúde (Impr.). [Internet]. 2012 [acesso 6 fev 2015];36(4):574-81. Disponível: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/artigos/mundo\\_saude/estudo\\_toxicidade\\_aguda\\_alteracoes\\_metabolicas.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/artigos/mundo_saude/estudo_toxicidade_aguda_alteracoes_metabolicas.pdf)
39. Mannarino CF, Moreira JC, Ferreira JA, Arias ARL. Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática. Ciênc Saúde Coletiva. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];18(11):3235-43. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v18n11/14.pdf>
40. Mohr G, Lobo EA. Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento da água em pequena propriedade rural, utilizando bioensaios. Revista Jovens Pesquisadores. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];3(1):12-22. Disponível: <http://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/3752/2660>
41. Gaspar N, Gago J, Repolho T, Luís O. Avaliação da toxicidade das lamas de cal sobre o ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Perspectivas para novas aplicações destes resíduos industriais. Revista da UIIPS. [Internet]. 2013 [acesso 9 fev 2015];1(2):82-102. Disponível: [http://www.ipsantarem.pt/wp-content/uploads/2013/06/Revista-da-UIIPS\\_N2\\_Vol1\\_2013\\_ISSN-2182-9608.pdf](http://www.ipsantarem.pt/wp-content/uploads/2013/06/Revista-da-UIIPS_N2_Vol1_2013_ISSN-2182-9608.pdf)
42. Hernandez OD, Castro F, Paez M. Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. Acta Biol Colomb. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];18(2):341-8. Disponível: <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319028011010.pdf>
43. Canto T, Pich CT, Geremias R. Bioensaio de toxicidade em percolados no aterro sanitário do município de Araranguá (Santa Catarina, Brasil). Revista Biociências. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];19(2):53-60. Disponível: <http://revistas.unitau.br/ojs-2.2/index.php/biociencias/article/viewFile/1650/1263>
44. Sousa DBP, Almeida ZS, Carvalho-Neta RNF. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense, Brasil. Arq Bras Med Vet e Zootec. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];65(2):369-76. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n2/11.pdf>
45. Jacobowski AC, Zobiolo NN, Padilha PM, Moreno SE, Arruda EJ. Efeito mutagênico do edetato de cobre ([Cu (EDTA)]-2) livre e nanoencapsulado em camundongos e peixes. Ecotoxicol Environ Contam. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];8(1):13-9. Disponível: <http://siaiweb06.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/4620/2544>
46. Rezende KFO, Santos RM, Santos RM, Shimada JCB, Silva JRM, Muniz CASD. Histopatologia das brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, provenientes da represa Billings, área de proteção ambiental Bororé-Colônia. Atas de Saúde Ambiental - ASA. [Internet]. 2013 [acesso 6 fev 2015];1(1):57-68. Disponível: <http://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ASA/article/view/308/486>

47. Pereira DP, Santos DMS, Carvalho Neta AV, Cruz CF, Carvalho Neta RNF. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). Biosc J. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];30(4):1213-21. Disponível: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/21852/14937>
48. Benites LM, Doncato KB, Minho TS, Perazzo GX. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. Ciência e Natura. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];36(2):107-13. Disponível: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaenatura/article/view/13610/pdf>
49. Bernardes MFF, Maschio LR, Azeredo-Oliveira MTV, Almeida EA. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. Ecotoxicological Environmental Contamination. [Internet]. 2014 [acesso 6 fev 2015];9(1):59-67. Disponível: <http://www6.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/5779/3440>
50. Muñoz DR. Bioética: a mudança da postura ética [editorial]. Rev Bras Otorrinolaringol. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];70(5):578-9. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72992004000500001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992004000500001)
51. Presgrave OAF. Métodos alternativos. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM, organizadores. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 619-34.
52. Balls M. The three Rs and the humanity criterion. Nottingham: FRAME; 2009.
53. Alvim MS. A experimentação animal na nova Lei 11.794/08 à luz da interpretação conforme a Constituição. Revista Brasileira de Direito Animal. [Internet]. 2010 [acesso 6 fev 2015];7(5):221-49. Disponível: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/RBDA/article/viewFile/11045/7966>
54. Bridi AM. Adaptação e aclimação animal. [Internet]. s.d. [acesso 7 fev 2015]. Disponível: [http://www.uel.br/pessoal/ambredi/Bioclimatologia\\_arquivos/AdaptacaoAclimacaoAnimal.pdf](http://www.uel.br/pessoal/ambredi/Bioclimatologia_arquivos/AdaptacaoAclimacaoAnimal.pdf)
55. Flecknell PA. Refinement of animal use: assessment and alleviation of pain and distress. Laboratory Animals. [Internet]. 1994 [acesso 6 fev 2015];28(3):222-31. Disponível: <http://lan.sagepub.com/content/28/3/222.full.pdf+html>
56. Broom DM, Molento CFM. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas: revisão. Archives of Veterinary Science. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];9(2):1-11. Disponível: <http://www.unb.br/posgraduacao/docs/fav/BEMESTARANIMALCONCEITOQUESTOESRELACIONADAS.pdf>
57. Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. Acta Cir Bras. [Internet]. 1998 [acesso 15 abr 2015];13(2). Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86501998000200010>
58. Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. Rev Bras Anestesiol. [Internet]. 2003 [acesso 15 abr 2015];53(2):278-85. Disponível: <http://www.scielo.br/pdf/rba/v53n2/v53n2a14>
59. Rocha-Mendes F, Napoli RP, Mikich SB. Manejo, reabilitação e soltura de mamíferos selvagens. Arq Ciên Vet Zool Unipar. [Internet]. 2006 [acesso 6 fev 2015];9(2):105-9. Disponível: <http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/download/351/318>
60. Feijó AGS. A função dos comitês de ética institucionais ao uso de animais na investigação científica e docência. Bioética. [Internet]. 2004 [acesso 6 fev 2015];12(2):11-22. Disponível: [http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista\\_bioetica/article/view/131/136](http://www.revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/131/136)
61. Oliveira RF, Galhardo L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleosteos e implicações para a piscicultura. Rev Bras Zootec. [Internet]. 2007 [acesso 7 fev 2015];36(Suppl):77-86. Disponível: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982007001000009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007001000009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

#### Participação dos autores

Josielma dos Santos Silva contribuiu na confecção do mapa conceitual de elaboração do artigo, na redação de todas as partes do texto e na revisão. Iolanda Karoline Barros dos Santos Rocha contribuiu na leitura e análise dos artigos de revisão e na elaboração do gráfico. Lucenilde Carvalho de Freitas contribuiu na leitura e análise dos artigos de revisão e na redação da introdução. Natália Jovita Pereira contribuiu na leitura e análise dos artigos de revisão e na elaboração do quadro. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta contribuiu na redação e revisão de todas as partes do texto.

