

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS COMO CAMA PARA CRIAÇÃO DE RATO WISTAR

(Evaluation of different substrates as bedding for breeding wistar rats)

Vitória Costa NUNES; Thalita Moreira PARAGUASSÚ;
Guilherme Nascimento CUNHA; Luiz Fernando Rocha BOTELHO

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Rua Major Gote, 808. Caiçaras,
Patos de Minas/MG, CEP: 38.700-207. *E-mail: thalitamoreira47@gmail.com

RESUMO

Os biotérios são instalações onde são criados animais para pesquisas científicas, sendo divididos em micro e macroambiente. O microambiente é caracterizado pela oferta de água, alimento e forração da gaiola, que deve utilizar um substrato macio e capaz de absorver amônia, visto que elevados níveis de amônia podem afetar a saúde e bem-estar dos animais. No macroambiente há iluminação, temperatura, umidade e ventilação externa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da bucha vegetal como cama na criação de rato Wistar comparados ao sabugo de milho e maravalha de pinus. Foram utilizados 45 ratos Wistar divididos em três grupos com 15 animais cada: Maravalha de pinus; Sabugo de Milho e o Bucha Vegetal. Cada substrato foi avaliado durante 7 dias. Foram mensurados a concentração de amônia e umidade, temperatura do macro e microambiente diariamente e a facilidade de limpeza. Realizou-se análise estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e análise de Regressão. Ao avaliar o microambiente constatou-se que a maravalha de pinus apresentou aumento gradativo da concentração de amônia, dentro dos valores permitidos. O sabugo de milho demonstrou excelente absorção da amônia, mas não teve resultados ideais para umidade. A utilização da bucha vegetal como cama não teve índices/parâmetros satisfatórios para amônia, umidade e temperatura. O macroambiente manteve-se estável e dentro dos valores permitidos para estas variáveis. Assim, concluiu-se que a maravalha de pinus foi o melhor substrato para todas as variáveis. O sabugo de milho não apresentou bons resultados para a umidade, enquanto a bucha vegetal não foi favorável para nenhuma das variáveis.

Palavras-Chave: Macroambiente, microambiente, rato, substrato.

ABSTRAC

Vivariums are facilities where animals are bred for scientific research, being divided into micro and macro environments. The microenvironment is characterized by the provision of water, food, and cage bedding, which should use a soft substrate capable of absorbing ammonia, as high levels of ammonia may affect the health and well-being of animals. The macroenvironment includes lighting, temperature, humidity, and external ventilation. Thus, this study aimed to evaluate the effectiveness of loofah as bedding for Wistar rats compared to corncob and pinewood shavings. Forty-five Wistar rats were used, divided into three groups of 15 animals each: Pinewood shavings, Corncob, and Loofah. Each substrate was evaluated over 7 days. Daily measurements were taken for ammonia concentration, humidity, temperature in both macro and microenvironments, and ease of cleaning. Statistical analysis was performed using Tukey's test ($p < 0.05$) and regression analysis. When evaluating the microenvironment, it was observed that pinewood shavings showed a gradual increase in ammonia concentration, but remained within permitted levels. Corncob demonstrated excellent ammonia absorption but did not yield ideal results for humidity. The use of loofah as bedding did not provide satisfactory results for ammonia, humidity, and temperature. The macroenvironment remained stable and within the permissible values for these variables. Thus, it was concluded that pinewood shavings were the best substrate for all variables. Corncob did not perform well in terms of humidity, while loofah was not favorable for any of the variables.

Keywords: Macroenvironment, microenvironment, rat, substrate.

INTRODUÇÃO

O biotério representa a instalação na qual são criados ou utilizados animais para atividades de ensino ou pesquisa científica. A instalação deve possuir infraestrutura adequada para atender aos requisitos ambientais, sanitários e de bem-estar animal para a espécie utilizada

(CONCEA, 2016a). Os estudos com animais de laboratório devem considerar as questões éticas relacionadas ao uso dos animais. A ética deve se concretizar em ações e práticas voltadas para evitar e minimizar o desconforto e o sofrimento, cabendo aos profissionais envolvidos atuarem para esse fim (RIVERA, 2010).

O material de confecção das gaiolas, o tipo de substrato (popularmente chamado de “cama”), o espaço disponível para cada animal, o contato social e a alimentação são fatores importantes a serem levados em consideração para o bem-estar dos animais. O tipo de material de cama pode influenciar nos níveis de estresse, resposta imune, processo de regulação térmica, peso corpóreo, vocalização e também perfil de enzimas hepáticas (SAKHAI *et al.*, 2013).

O substrato empregado varia de acordo com a espécie de animal a ser alojado no mini-isolador e deve satisfazer os requisitos físicos e químicos essenciais para a saúde e o bem-estar desses animais. Dessa forma, deve ser macio, absorvente e possuir pouco pó, a fim de minimizar danos no sistema respiratório e evitar infecções bacterianas (ANDRADE *et al.*, 2018).

O ambiente de uma instalação animal pode ser dividido em macroambiente e microambiente, e os animais estão sujeitos a ambos, sendo a gaiola, que faz parte do microambiente, o meio divisor entre eles. O macroambiente é composto pelos elementos da edificação (sala) em que estão alojados, onde se encontram parâmetros ambientais tais como ruídos, vibração, temperatura, iluminação, umidade e composição do ar. O microambiente de um animal é o espaço físico imediatamente próximo a ele, e compreende fatores como dimensionamento dos mini-isoladores, densidade de animais, alimentação, itens de enriquecimento ambiental e forragem das gaiolas (CONCEA, 2016b).

A umidade relativa exerce um importante papel no bem-estar animal, com a liberação contínua de vapor d’água, através de respiração e pela evaporação da urina, a umidade dentro das salas tende a aumentar, tornando-se necessário a retirada do excesso de água do ambiente (ANDRADE *et al.*, 2002)

A exposição à amônia em roedores de biotério causa irritação das vias respiratórias, inflamação pulmonar e maior suscetibilidade a infecções. Além de prejudicar o bem-estar dos animais, pode interferir na função imunológica e comprometer a qualidade dos dados experimentais, tornando o controle dessa variável essencial em estudos científicos. (FABRÍCIO *et al.*, 2014).

Alguns materiais têm sido usados como cama, tais como palha de arroz, maravalha de flocos de pinus, maravalha de Aspen, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho. A cama de sabugo de milho triturado foi introduzida em substituição à maravalha de pinus, dentro dos mini-isoladores, demonstrando ser mais absorvente e gerar menor concentração de amônia, o que acaba refletindo numa melhora das condições do microambiente dos animais (KOONTZ *et al.*, 2016).

A maioria dos biotérios brasileiros utilizam três tipos de substratos para a gaiola de roedores: a maravalha de *Pinus* em lâminas, a maravalha de *Pinus* em flocos e o sabugo de milho triturado, sendo a primeira a mais utilizada devido a sua maior disponibilidade de compra e de custo mais acessível (CHAGAS *et al.*, 2016; SCHIRATO *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a avaliação da viabilidade de diferentes tipos de substrato é fundamental, pois através destes estudos pode-se propor um refinamento para um microambiente que favoreça a absorção de amônia e o controle de umidade e temperatura para bem-estar animal, com baixo custo e de fácil acesso. Sendo assim, o objetivo do projeto foi

avaliar a eficácia de diferentes substratos, como a cama na criação de rato Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O presente estudo utilizou ratos provenientes do Biotério do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas/MG. Este possui sistema de dois corredores (limpo e sujo) entre as salas de experimentação, com fluxo de pessoas e insumos definidos, protegidos com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar, diferencial de pressão, air-lock etc.). A temperatura ambiente é mantida a 22 °C. Possui um sistema de insuflação, exaustão e filtração do ar das salas, impedindo a dispersão da amônia no ambiente, realizando 15 a 20 trocas de ar/h e o ciclo de luz é definido 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Os animais foram acondicionados em mini isoladores (264mm x 341mm), contendo três ratos Wistar cada, acoplados a uma rack ventilada. A alimentação e água serão fornecidas ad libitum. Todo o sistema é ligado a um gerador, que garante a manutenção em caso de falta de energia elétrica.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob número de protocolo 18/23 (Anexo A), em 21 de março de 2023, com termo adendo aprovado (Anexo B), em 14 de junho de 2023

Grupos

No presente trabalho foram utilizados 45 ratos Wistar de aproximadamente 180g, divididos em três grupos com 15 animais cada. Sendo os grupos: Grupo Maravalha de pinus (GM); o Grupo Sabugo de Milho (GS) e o Grupo Bucha Vegetal (GB). Os 15 ratos de cada grupo foram alocados em três mini-isoladores, com cinco animais em cada. Foram utilizadas maravalha de pinus em lâminas, com espessura média de 1,5mm. O sabugo de milho triturado com granulometria entre 2,2 a 2,5mm, aproximadamente. A bucha vegetal adquiriu-se como peça vegetal inteira, sendo então picada em tamanhos 1,5cm² sem casca e sementes (Fig. 01).

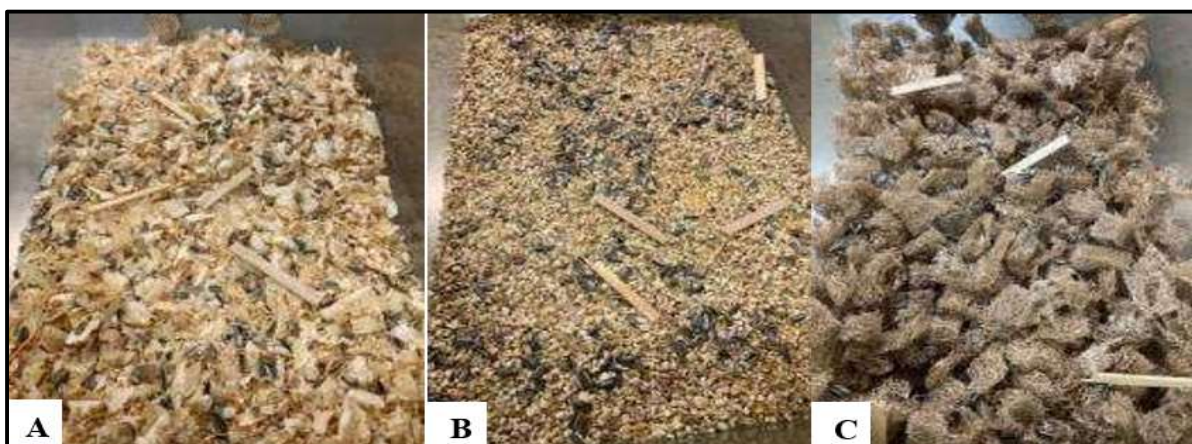


Figura 01: Substratos utilizados como cama para os ratos Wistar alocados nos minis isoladores.

Obs: A = Maravalha de pinus; B = Sabugo de milho triturado; C = Bucha vegetal.

Todos os substratos utilizados na cama foram previamente colocados em mini-isolador e, autoclavados, para posterior utilização. A espessura da cama para todos os substratos maravalha de pinus, sabugo de milho e bucha vegetal foi de 2cm altura.

Avaliação dos substratos

Os substratos utilizados nos mini-isoladores foram avaliados inicialmente antes da alocação dos animais e, em seguida, diariamente no final da manhã. Cada substrato foi testado por um período contínuo de sete dias, após o qual era substituído por outro tipo para novo teste. As variáveis analisadas a cada 24 horas incluíram a concentração de amônia, umidade e temperatura. A facilidade de limpeza dos mini-isoladores foi avaliada semanalmente, no momento da troca, por meio de uma inspeção visual que verificava a aderência da maravalha à superfície e a capacidade de absorção do substrato.

A mensuração da concentração do gás amoníaco (amônia – NH₃) foi realizada dentro da Sala de Experimentação de Ratos (macroambiente) (Fig. 02) e do mini-isolador (microambiente) com uso do detector de amônia, SP2nd NH₃ (ASKO produtos eletrônicos, Coreia do Sul). Os valores máximos permitidos de tolerância de amônia, citados no Anexo 11 da Norma Regulamentadora 15 da Portaria 3.214/78 do Ministério do Trabalho e Emprego (TEM), são de 20ppm por 48 horas/semana (TEM, 2008).

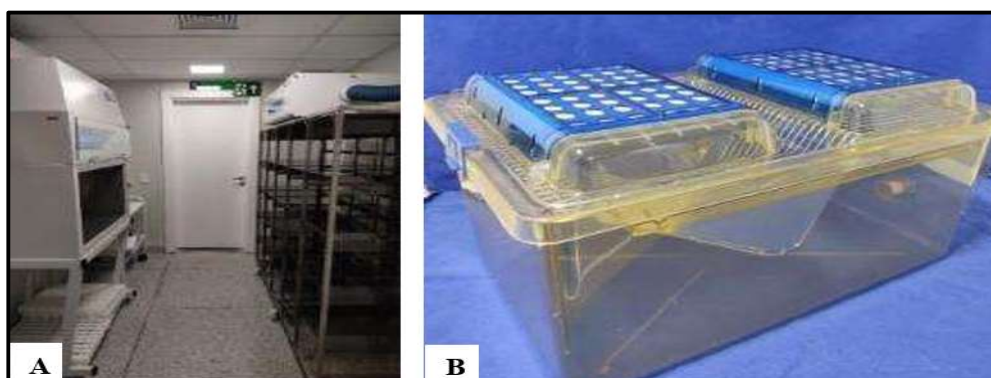


Figura 02: Visualização do macro e microambiente do biotério da UNIPAM.

Obs.: A = Sala de experimento de ratos; B = Microambiente/ Mini isolador de polisulfona para ratos.

Para o parâmetro umidade, são aceitas leves alterações, podendo variar entre 40% e 60% sem consequências a saúde dos animais, valores inferiores a 30% ou superiores a 70% podem causar problemas a colônia, sendo aferido por termohigrômetro digital de máxima e mínima (Kasvi, Brasil, Paraná) (CONCEA, 2013). Por fim, a facilidade de limpeza dos mini-isoladores foi avaliada pela aderência da cama ao assoalho, Como: ausente (-), pouco (+), médio (++) e muito (+++). Foi utilizado como enriquecimento ambiental a semente de girassol e palitos de madeira (abaixador de língua), auto clavados antes de alocados nos mini-isoladores.

Destino dos animais

Não foi realizada eutanásia nos animais, uma vez que os ratos serão doados para o Centro de Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETRAS) para a alimentação dos animais em cativeiro.

Análise Estatística

Para as variáveis amônia, umidade e temperatura foram analisadas utilizando-se o teste Tukey com nível de significância de 5% ao se comparar os substratos. Para avaliar o efeito do dia em cada substrato no macro e microambiente foi utilizado o teste de Regressão linear e quadrática nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para ambos os testes foi utilizado o programa computacional Sisvar.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Referente à concentração de amônia no microambiente durante o período de avaliação com duração de sete dias observou-se que sua concentração se mostrou mais elevada e acima dos valores permitidos no grupo bucha vegetal, com diferenças estatísticas significativas em relação aos demais grupos. Não foi observado diferença entre os grupos maravalha e sabugo de milho, sendo que estes se mantiveram dentro dos parâmetros de referência. Estes resultados encontram-se apresentados na Tab. 01.

Tabela 01: Concentração de amônia, umidade e temperatura do microambiente presentes nos minis isoladores contendo diferentes tipos de substratos, Patos de Minas, MG, 2023

Substratos	Amônia (ppm)			Umidade (%)			Temperatura (°C)		
	Min	Max	M ± DP	Min	Max	M ± DP	Min	Max	M ± DP
Bucha Vegetal	11,68	36,37	21,89 ^b ±9,56	60,55	67,88	64,44 ^a ±3,44	23,36	25,42	24,40±0,62
Maravalha	11,26	32,11	19,48 ^{ab} ±8,25	55,77	68,22	64,02 ^a ±3,88	24,32	25,32	24,64±0,37
Sabugo de Milho	11,34	23,11	13,78 ^a ±4,21	61,55	69,88	67,97 ^b ±2,97	23,91	25,16	24,51±0,53
P valor	<0,01			<0,01			0,24		
Coeficiente	43,75			9,81			3,35		

Obs.: Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para animais em laboratório o nível de amônia deve se manter o mais baixo possível, por esse motivo é necessário um substrato absorvente. A ureia é uma substância tóxica proveniente do metabolismo proteico que é eliminada na urina dos animais. A alta concentração tem impacto sobre a fisiologia do animal por meio de seu efeito que eleva a umidade relativa dentro da caixa. Essa condição não permite que urina e fezes ressequem e cria um ambiente que propicia a proliferação de bactérias uréase-positivas com consequente produção de amônia (GONZÁLES e SALDANHA, 2001).

O número de trocas por semana está diretamente relacionado à capacidade de absorção do substrato. Substratos menos absorventes podem exigir trocas mais frequentes (até várias vezes por semana) para controlar adequadamente a umidade e os níveis de amônia. Por outro lado, substratos de alta absorção permitem que as trocas sejam menos frequentes, mantendo os níveis de amônia e umidade dentro de padrões aceitáveis por períodos mais longos (ANDRADE *et al.*, 2018).

A manutenção dos níveis de amônia em concentrações aceitáveis é essencial, sendo os

limites de exposição a humanos, recomendados pela “American Conference of Governmental Industrial Hygienists” (ACGHI), de 25ppm para uma jornada de trabalho diário de 8 horas, durante cinco dias por semana (GREEN *et al.*, 2008). Ao considerar os roedores, os parâmetros recomendados pela Resolução Normativa nº 15 do CONCEA é de até 20ppm.

De acordo com Perkins e Lipman (1995) um estudo realizado com ratos, comparando diferentes substratos, mostrou que após sete dias, o acúmulo de amônia foi mais alto com o uso da maravalha (300 a 400ppm), do que com o sabugo de milho (considerado valores insignificantes). Nesse sentido, o uso de cama de sabugo de milho garantiu menor acúmulo de amônia prejudicial e permitiu que as instalações funcionem de forma mais eficiente com menos trocas nos minis isoladores.

Carbone *et al.* (2016) em um estudo com os substratos sabugo de milho, casca de arroz, madeira reciclada e aparas de pinheiro observaram que apenas a cama de sabugo de milho não apresentou no microambiente níveis de amônia superior ao limite de corte de 25ppm, medido por um analisador multigás, durante o período de estudo de 30 dias.

Após comparar a concentração de amônia entre o macro e microambiente durante os sete dias de avaliação utilizando diferentes substratos observou-se que para a maravalha somente após o 3º dia de avaliação apresentou um aumento intenso da amônia dentro do mini isolador quando comparado com o macroambiente. Referente ao sabugo de milho notou-se que houve um aumento discreto entre o 4º e 6º dia, com um aumento abrupto a partir do 6º dia. Para a bucha vegetal o aumento da concentração de amônia deu-se de forma bem mais precoce, ocorrendo a partir do 3º dia (Fig. 03).

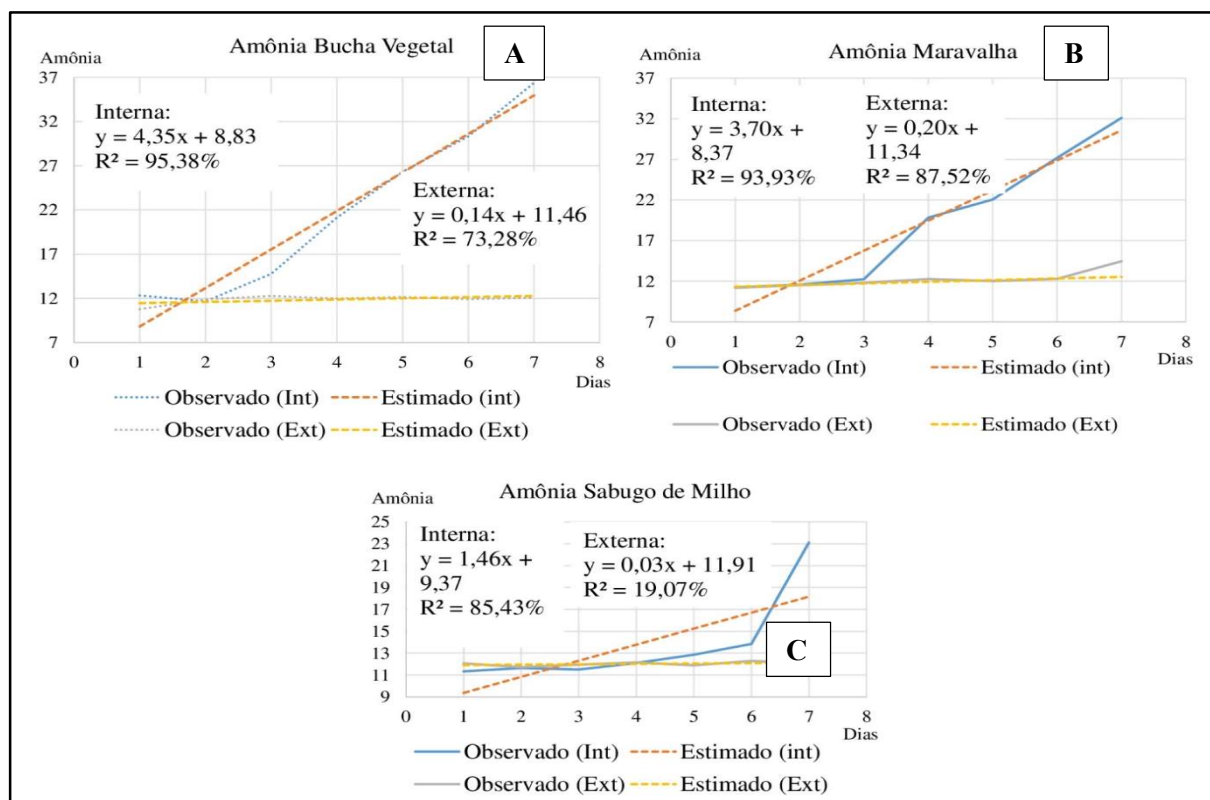


Figura 03: Comparativos da concentração de amônia no macro e microambiente conforme o tipo de substrato utilizado.

Obs.: A = Bucha Vegetal; B = Maravalha de pinus; C = Sabugo de Milho.

Os resultados do presente estudo mostraram que os níveis de amônia dos substratos Maravalha e Sabugo de milho estão dentro do limite máximo permitido. Notou-se que a concentração de amônia foi superior ao permitido com uso da bucha vegetal, enquanto o substrato maravalha revelou-se semelhante ao do sabugo de milho. No entanto, notou-se que as menores concentrações foram aferidas com uso de sabugo de milho. Este achado deve-se conforme Silva *et al.* (1998), provavelmente à xilana, seu principal componente, a qual apresenta em sua estrutura um alto percentual de polissacarídeos (60%) e baixa contaminação por proteínas (0,4%) e compostos fenólicos (>0,01%). Apresenta também 70% de atividade ligante de íons de ferro de onde se pode inferir sua capacidade de ligação com íons hidrogênio da ureia, permitindo o máximo controle da amônia e consequentemente de seu odor.

Quanto à avaliação da umidade relativa do ar, durante o período de experimentação, observou-se que a concentração de amônia se manteve dentro do intervalo entre 40 e 70%, para os três substratos utilizados. Os parâmetros recomendados pela Resolução Normativa n° 15 do CONCEA para roedores e lagomorfos, em relação à umidade relativa do ar, é de 40 a 70%. No entanto, notou-se que o grupo GS apresentou diferença de concentração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos GM e GB.

Reeb-Whitaker *et al.* (2001) em um estudo sobre os níveis de amônia no microambiente, relataram que no grupo utilizando sabugo de milho, a concentração de amônia ultrapassou 25 ppm no 7º dia, durante a troca da cama. Apesar disso, a umidade relativa do ar permaneceu em $60 \pm 10\%$. O estudo testou três diferentes taxas de ventilação nas gaiolas: 30, 60 e 100 trocas de ar por hora (ACH), totalizando nove condições experimentais. As taxas de ventilação de 60 ACH foram identificadas como ideais para a saúde animal e para práticas de criação.

Ao comparar a concentração de umidade relativa do ar entre o macro e microambiente durante a avaliação dos diferentes substratos, observou-se que para a maravalha houve uma pequena diferença, sendo que no microambiente a concentração ficou entre 55 e 70%, tendo um aumento a partir do segundo dia do experimento. Para o macroambiente seus valores permaneceram entre 50 e 55%.

Para o sabugo de milho, a concentração da umidade relativa do ar no macro e microambiente manteve-se constante, sendo os valores entre 40-70%, não havendo uma alteração entre eles (Fig. 04).

Os resultados do presente estudo revelaram que os níveis de umidade relativa do ar dos substratos comparados ao do macroambiente estão dentro do limite máximo permitido. Notou-se que para sabugo de milho e bucha vegetal os valores ficaram semelhantes, apresentando maior concentração no mini isolador. O substrato sabugo de milho absorveu melhor a amônia, mas falhou no controle da umidade relativa do ar dentro dos minis isoladores.

Referente à temperatura no microambiente durante o período de avaliação observou-se que não houve diferença em seus valores entre os grupos bucha vegetal, maravalha e sabugo de milho. Segundo o CONCEA (2016b), a temperatura recomendada para camundongos e ratos é de 20 a 26 °C e deve ser mantida em uma faixa de variabilidade máxima de 4 °C, sendo a média dessa temperatura durante os sete dias 24 °C.

Reeb-Whitaker *et al.* (2001) após experimentos utilizando sabugo de milho, casca de arroz como cama para ratos Wistar, ao analisarem a variável temperatura, observaram que para o substrato sabugo de milho, a temperatura se permaneceu estável em 22 ± 3 °C.

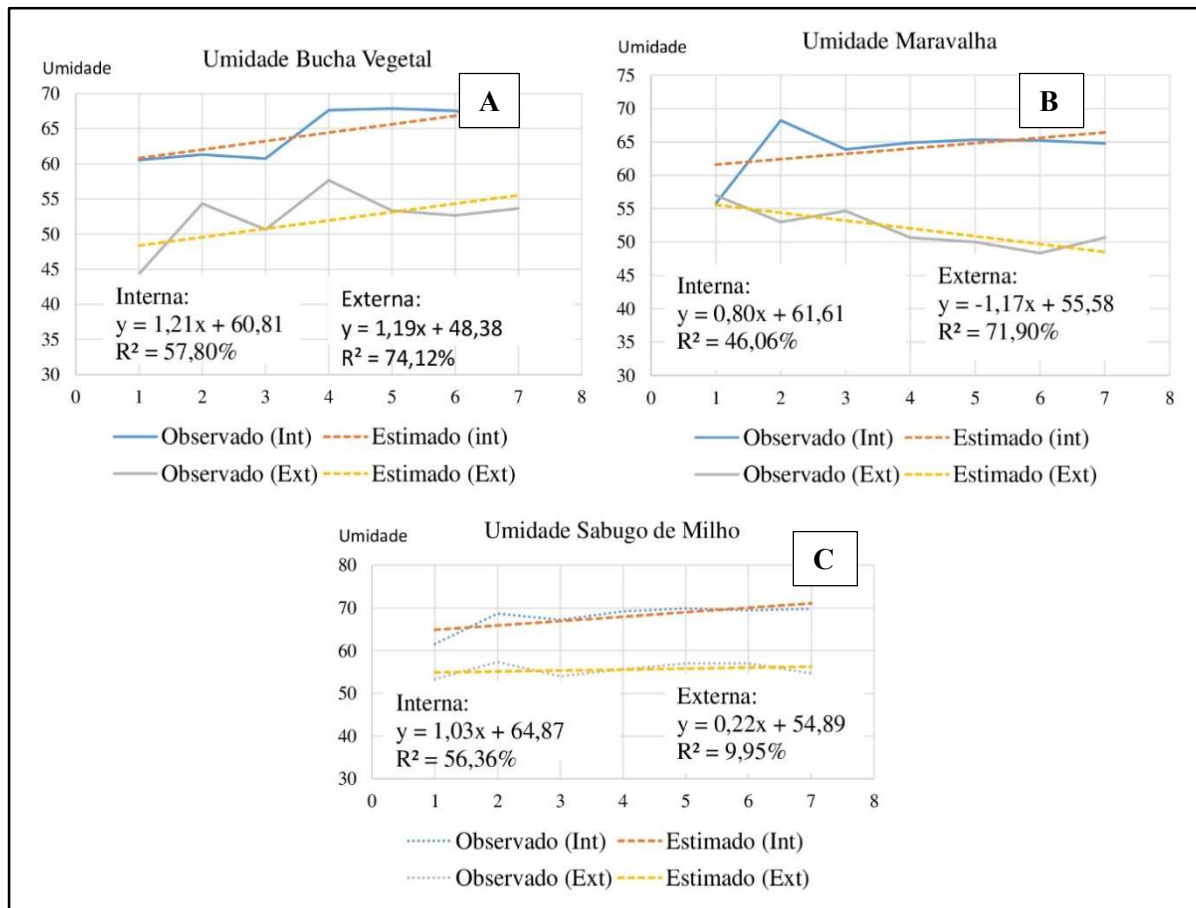


Figura 04: Comparativos de umidade no macro e microambiente conforme o tipo de substrato utilizado.

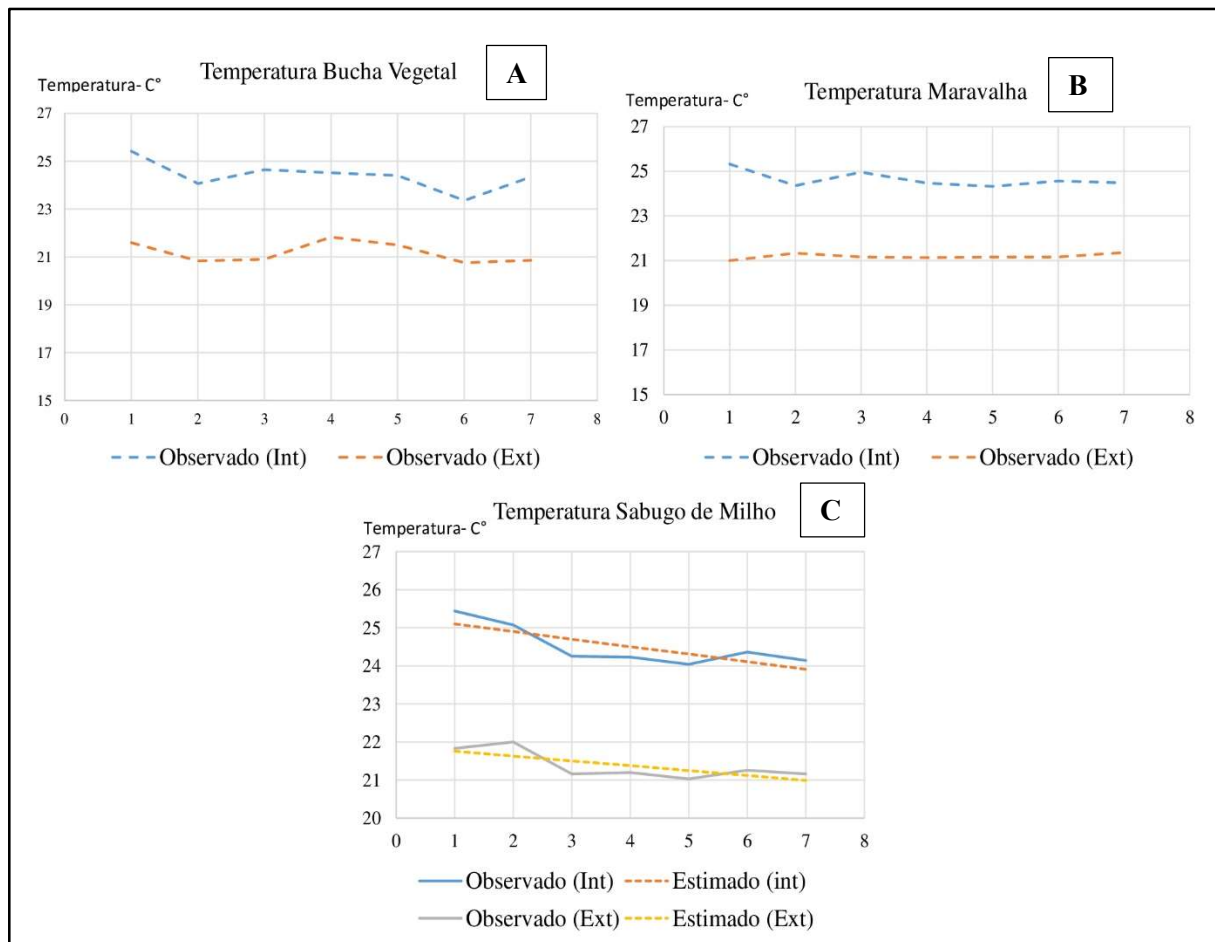
Obs.: A = Bucha Vegetal; B = Maravalha de pinus; C = Sabugo de Milho.

Os resultados do presente estudo revelaram que os níveis de umidade relativa do ar dos substratos comparados ao do macroambiente estão dentro do limite máximo permitido. Notou-se que para sabugo de milho e bucha vegetal os valores ficaram semelhantes, apresentando maior concentração no mini isolador. O substrato sabugo de milho absorveu melhor a amônia, mas falhou no controle da umidade relativa do ar dentro dos minis isoladores.

Referente à temperatura no microambiente durante o período de avaliação observou-se que não houve diferença em seus valores entre os grupos bucha vegetal, maravalha e sabugo de milho. Segundo o CONCEA (2016b), a temperatura recomendada para camundongos e ratos é de 20 a 26 °C e deve ser mantida em uma faixa de variabilidade máxima de 4 °C, sendo a média dessa temperatura durante os sete dias 24 °C.

Reeb-Whitaker *et al.* (2001) após experimentos utilizando sabugo de milho, casca de arroz como cama para ratos Wistar, ao analisarem a variável temperatura, observaram que para o substrato sabugo de milho, a temperatura se permaneceu estável em 22 ± 3 °C.

Ao comparar as temperaturas do macro e microambiente durante a avaliação nos diferentes substratos, observou-se que para o microambiente os valores variaram entre 24 e 26 °C entre os grupos. Enquanto para o macroambiente os valores oscilaram entre 20 e 22 °C (Fig. 05).



De acordo com Blom *et al.* (1996), partículas menores tendem a absorver mais urina e eventualmente água que vaza dos bebedouros, estabelecendo assim uma umidade e temperatura mais adequada.

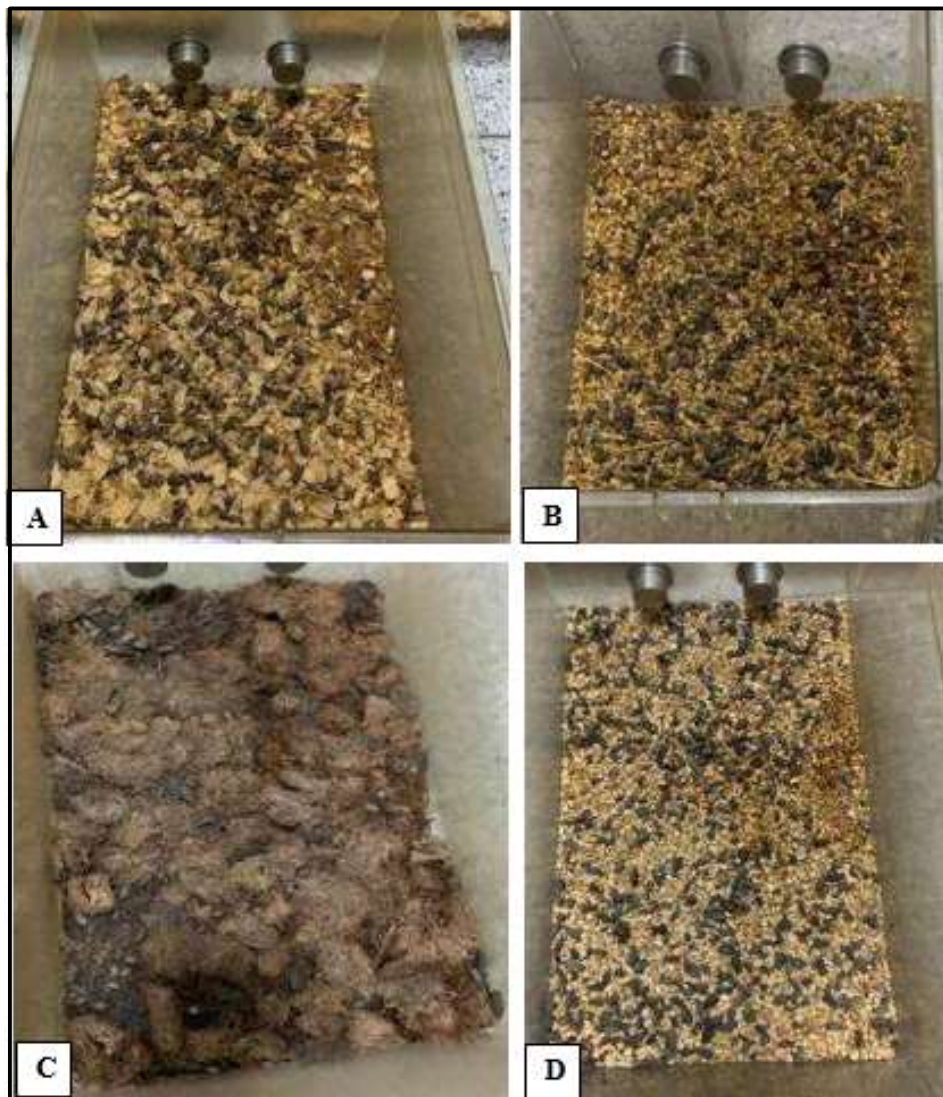


Figura 06: Aderência das sujidades nos fundos dos mini isoladores após sete dias de avaliação, sendo os substratos.

Obs.: A = Maravalha de pinus; B = Sabugo de Milho; C = Bucha Vegetal; D = Partículas agregadas no substrato sabugo de milho.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que nas condições do estudo a maravalha de pinus foi o melhor substrato para absorver umidade e manter a temperatura, sendo eficaz na redução da amônia. O sabugo de milho mostrou-se eficaz, porém garantindo menores níveis da amônia por mais tempo e de mais fácil limpeza, enquanto a bucha vegetal não foi favorável para nenhuma das variáveis, uma vez que todas mostraram-se acima dos valores permitidos e de difícil limpeza.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. 1. ed., Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- ANDRADE, J.F.A.; PINHEIRO, A.B.; FARIAS, M.N.A.C.; DAMASCENO, A.V.B.S.; MONTEIRO, A.M.; COSTA, M.A.R.C.; ANDRADE, M.A.H.; SOARES, R.H.F.C. Aspectos relacionados a qualidade ambiental em biotério: revisão de literatura. **RESBCAL**, v.6, n.1, p.9-15, 2018.
- BLOM, H.J.M.; VAN, T.G.; VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V.; BAUMANS, V.; BEYNEN, A.C. Preferences of mice and rats for types of bedding material. **Laboratory Animals**, v.30, n.3, p. 234-244, 1996.
- CARBONE, E.T.; KASS, P.H.; EVANS, K.D. Feasibility of using rice hulls as bedding for laboratory mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, .55, n.3, p. 268-276, 2016.
- CHAGAS, D.C.G.; AFONSO, J.P.; MARINHO, C.R.F.; BOSCARDIN, S.B. Benefícios sanitários dos flocos de pinus elliotti como cama para camundongos isogênicos. Avaliação dos parâmetros hematológicos, sanitários e reprodutivos. **RESBCAL**, v.4, n.1, p. 48-49, 2016.
- CONCEA. **Baixa a estrutura física e ambiente de roedores e lagomorfos do guia brasileiro de criação e utilização de animais para atividades de ensino e pesquisa científica**, Brasília, Distrito Federal, 2013. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_15_de_16122013.html. Acesso em: 11 mar. 2023.
- CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica**. Brasília, Distrito Federal, 2016a. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_30_de_02022016.html. Acesso em: 11 mar. 2023.
- CONCEA. **Guia brasileiro de criação e utilização de animais para atividades de ensino e pesquisa científica**. Brasília, Distrito Federal, 2016b. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/paginas/publicacoes-legislacao-e-guia/guia-brasileiro-de-producao-manutencao-ou-utilizacao-de-animais-para-atividades-de-ensino-ou-pesquisa-cientifica>. Acesso em: 11 mar. 2023.
- GONZÁLES, E.; SALDANHA, E.S.P.B. **Os Primeiros Dias de Vida do Frango e a Produtividade Futura**. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 11. Anais. AZEG/ABZ, p.312-313, Goiânia, 2001.
- GREEN, A.R. Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia. **The Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.47, n.2, p.49-56, 2008.
- KOONTZ J.M, KUMSHER D.M, STALLINGS J.D. Effect of 2 Bedding Materials on Ammonia Levels in Individually Ventilated Cages. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.55, n.1, p.25-28, 2016.

PERKINS, S.E.; LIPMAN, N.S. Characterization and qualification of microenvironmental contaminants in isolator cages with a variety of contact beddings. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v.34, n.3, p.93-98, 1995.

REEB-WHITAKER, C.; PAIGEN, B.; BEAMER, W.; BRONSON, R.; CHURCHILL, G.; SCHWEITZER, I.; MYERS, D. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. **Laboratory Animals**, v.35, n.1, p.58-73, 2001.

RIVERA, E.B.; RODRIGUES, U.P. Ética na Utilização de Modelos Animais. In: LAPCHIK, V.B.V.; MATTARIA, V.G.M.; KO, G.M. (Orgs.). **Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2010. p.37-41.

SAKHAI, S.A.; PRESLIK, J.; FRANCIS, D.D. Influence of housing variables on the development of stress-sensitive behaviors in the rat. **Physiology & Behavior**, v.120, n.5, p.156–63, 2013.

SCHIRATO, G.V.; SANTOS, I.B.; ARAÚJO, M.M.; SILVA, A.A.S.; REGO, N.J.; GONÇALVES, M.A.B. Substrato (cama), ofertados aos animais do centro de experimentação animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEA-IOC) da Fiocruz: maravalha de pinus sp. X sabugo de milho (xilana). **RESBCAL**, v.4, n.1, p.56-57, 2016.

SHEK, K.C.; TSUI, K.L.; LAM, K.K.; CROW, P.; KENNET, H.H.L.; ADES, G. Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. **Hong Kong Medical Journal**, v.15, n.3, p.183, 2009.

SILVA, S.S.; CARVALHO, R.R.; FONSECA, J.L.C.; GARCIA, R.B. Extração e Caracterização de Xilanas de Sabugo de Milho. **Sciello**, v.8, n.2, p.25-33, 1998.

TEM. Ministério do Trabalho e Emprego. **NR 15 “atividades e operações insalubres”**. In: segurança e medicina do trabalho. São Paulo: atlas, 2008. Disponível em: <https://www.gov.br/trabalho-e-previdencia/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/conselhos-e-orgaos-colegiados/ctpp/arquivos/normas-regulamentadoras/nr-15.pdf>. Acesso em: 10 de mar. 2023.