

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANGELITA MUZZOLON

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS SOBRE O DESEMPENHO, A
HEMATOLOGIA, SISTEMA IMUNE E MORFOLOGIA INTESTINAL DO PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS - PR
2018

ANGELITA MUZZOLON

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS SOBRE O DESEMPENHO, A
HEMATOLOGIA, SISTEMA IMUNE E MORFOLOGIA INTESTINAL DO PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UTFPR – Campus Dois Vizinhos, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia – Área de concentração em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado

Co-orientadora: Profa. Dra. Maude Regina de Borba

M994e Muzzolon, Angelita.
Efeito do extrato do própolis sobre o desempenho, a hematologia, sistema imune e morfologia intestinal do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Angelita Muzzolon – Dois Vizinhos, 2018.
50f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado
Coorientadora: Prof. Dra. Maude Regina de Borba
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos, 2018.
Bibliografia p. 38-48

1. Peixes - Criação 2. Peixes - Doenças 3. Imunologia I. Sado, Ricardo Yuji, orient. II. Borba, Maude Regina de, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos IV. Título.

CDD: 636.213



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 091

Efeito de extrato de própolis sobre desempenho, hematologia, sistema imune e morfologia intestinal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Angelita Muzzolon

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia sete de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Ricardo Yuji Sado
UTFPR-DV

Sabrina Endo Takahashi
UTFPR-DV

Álvaro José de Almeida Bicudo
UFPR - Palotina

Coordenador do PPGZO
Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Aos meus pais

Dedico.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado, pela oportunidade profissional proporcionada ao me aceitar como orientada, por toda dedicação, paciência e atenção designada a mim durante esses dois anos, pelo convívio, cobranças e ensinamentos repassados e pelo deslumbrante exemplo profissional. Meu sincero muito obrigada.

A minha adorada Prof. Dra Maude Regina de Borba que me aceitou como co-orientada, minha eterna “mãe acadêmica”, meu muito obrigada pelo apoio e pelas correções e sugestões na elaboração deste trabalho.

Agradeço, aos meus pais, Laura e Marcos por estarem sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Agradeço também pelo incentivo, companheirismo, preocupação e cuidado comigo nos momentos difíceis, com toda certeza sem o apoio de vocês não teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu querido Wilson, por ter me apoiado e se mantido ao meu lado em todos os momentos, seu amor foi fundamental para que eu alcançasse esse objetivo.

Aos meus avós, Lauro e Thereza (*in memoriam*), por todo carinho, cuidado, preocupação, apoio e incentivo que sempre tiveram comigo, levo-os em meu coração.

As minhas irmãs de coração, Suelen e Zilmara, agradeço pelo companheirismo e pelas demonstrações de apoio nos momentos difíceis e pelos ótimos momentos que me proporcionaram, das muitas risadas aos momentos sérios, ao lado de pessoas especiais como vocês, sempre desfrutamos de momentos inesquecíveis.

As amigas Bruna, Joselaine, Aliciane, Andreia, Priscila, por todo companheirismo e amizade, a vida em Dois Vizinhos foi mais divertida com vocês.

Aos colegas do setor UNEPE-Piscicultura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES,
pela concessão de bolsa;

Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito. ”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Muzzolon, Angelita. Efeito do extrato de própolis sobre o desempenho, a hematologia, sistema imune e morfologia intestinal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2018. N° 91. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Sistemas intensivos de produção aquícola aumentam a susceptibilidade às doenças em consequência das condições de estresse, influenciando negativamente o sistema imune dos peixes. Assim, há necessidade de adoção de boas práticas de cultivo, reduzindo a aplicação de quimioterápicos e favorecendo o uso de substâncias imunoestimulantes, como a própolis. Objetivou-se determinar o efeito de dietas suplementadas com extrato etanólico de própolis (EEP) sobre o desempenho, variáveis hematológicas, imunológicas, morfológicas e composição corporal do pacu. Com peso médio de $200,8 \pm 44,6$ g juvenis de pacu foram distribuídos aleatoriamente em quatro caixas (250L; dez peixes por caixa) e alimentados por 60 dias com dieta contendo EEP (0,0; 1,5; 3,0; 4,5%) em delineamento inteiramente casualizado (n=10). Ao final do período experimental peixes alimentados com 1,5% de EEP apresentaram maior ($P < 0,05$) ganho de peso e taxa de crescimento específico, menor ($P < 0,05$), conversão alimentar, maior ($P < 0,05$) espessura da camada muscular do intestino. A adição de EEP na dieta também conferiu maior ($p < 0,05$) atividade respiratória dos leucócitos *Burst*, assim como maiores teores de umidade e lipídio corporal quando comparado ao tratamento controle. O uso de EEP na alimentação de pacus foi eficaz como promotor de crescimento e imunostimulante.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; própolis; imunoestimulante; nutrição.

ABSTRACT

Muzzolon, Angelita. Propolis extract effects of on pacu (*Piaractus mesopotamicus*) performance, hematology, immune system and intestinal morphology. 2018. N° 91. Dissertation (Master's in Animal Science) – Graduate Program in Animal Science, Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Intensive aquaculture systems increase susceptibility to disease, due to stress conditions, negatively influencing fish immune systems. Therefore, there is a need to adopt good cultivation practices, reducing chemotherapeutic applications and favoring the use of immunostimulating substances, such as propolis. The aim of the present study was to determine the effect of diets supplemented with ethanolic propolis extracts (EPE) on pacu performance, hematological, immunological, morphological and body composition. Pacu juveniles with mean weight of 200.8 ± 44.6 g were randomly distributed in four boxes (250 L, ten fish per box) and fed for 60 days with a diet containing EPE (0.0, 1.5, 3.0, 4.5%) in a completely randomized design ($n = 10$). At the end of the experimental period, fish fed 1.5% EPE presented higher ($P < 0.05$) weight gain and specific growth rate, lower ($P < 0.05$) feed conversion and higher ($P < 0.05$) thickness of the intestinal muscle layer. The addition of dietary EPE also conferred higher ($p < 0.05$) Burst leukocyte respiratory activity, as well as higher moisture and body lipid levels when compared to the control treatment. The use of EPE in pacu feeding was effective as a growth promoter and immunostimulant.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; propolis; immunostimulant; nutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição corporal, índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (K) de pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo concentrações crescentes de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias..... 32

Tabela 2 – Concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), número de eritrócitos (Rbc), lisosima (Liz) e *burst* de pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com diferentes níveis EEP na dieta..... 32

Tabela 3 - Altura das vilosidades intestinais de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo concentrações crescentes de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ilustração representativa do pacu (*P. mesopotamicus*)..... 16
- Figura 2** - Ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), consumo alimentar (CA) e índice de conversão alimentar (ICA) de juvenis de pacu, (*P. mesopotamicus*), alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias. Para cada parâmetro, letras diferentes acima de cada coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 31
- Figura 3**– Atividade respiratória dos leucócitos *Burst* de juvenis de pacu, (*P. mesopotamicus*), alimentados com dieta contendo concentrações crescentes EEP. Letras diferentes acima de cada coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 33
- Figura 4** – Espessura da camada muscular intestinal de pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com dieta contendo níveis crescentes EEP. Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 34

ANEXOS

Anexo A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA).....	49
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Aspectos biológicos do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	15
2.2 Aspectos gerais do sistema imune e hematologia de peixes	16
2.2.1 Sistema imune	16
2.2.2 Conceitos gerais de hematologia em peixes	19
2.3 Própolis na alimentação de peixes	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Arranjo experimental	23
3.2 Obtenção da própolis bruta e preparo do extrato etanólico de própolis (EEP)....	24
3.3 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico	25
3.4 Análises da composição química	25
3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos	26
3.5.1 Estimativa da concentração de hemoglobina	26
3.5.2 Valor do hematócrito	26
3.5.3 Contagem total de eritrócitos.....	26
3.6 Avaliação de parâmetros imunológicos.....	27
3.6.1 Atividade respiratória dos leucócitos	27
3.6.2 Concentração de Lisozima sérica.....	27
3.7. Morfologia intestinal	28
3.8. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Desempenho zootécnico	29
4.2 – Composição química, índice hepatossomático e fator de condição	30
4.3 Parâmetros hematológicos e imunológicos.....	30
4.4 Parâmetros histológicos	31
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A.....	49

1. INTRODUÇÃO

Atualmente sistemas intensivos de produção aquícola vêm sendo adotados para alcançar alta produtividade e elevada lucratividade, dispendo de pequenos espaços de cultivo. Contudo, Barcellos (2000) destaca que a adoção de tais sistemas torna os animais mais susceptíveis às doenças, em consequência das condições de estresse ocasionadas pela baixa qualidade da água, alta densidade populacional além do manejo (biometrias, seleção, reprodução e transporte) envolvido, os quais influenciam negativamente o sistema imune dos peixes (VAZZANA et al., 2002). Assim, é elevada a probabilidade da ocorrência de surtos epizooticos, tornando-se a principal preocupação em sistemas intensivos de produção (KIRON, 2012; RINGO et al., 2012).

Adicionalmente, tendo em vista que o principal destino do pescado produzido pela aquicultura é para o consumo humano, faz-se necessário a redução do uso de quimioterápicos na produção, evitando-se assim o risco de resíduos no produto. Neste sentido, é amplamente recomendado a adoção das Boas Práticas de cultivo (BOYD et al., 2005; KUMARI; SAHOO, 2006), bem como o uso de substâncias alternativas com capacidade imunoestimulantes, as quais conferem aos peixes maior resistência a infecções e melhora nas respostas do sistema imune, de forma ambientalmente correta (SAKAI, 1999). Imunoestimulantes são compostos sintéticos, químicos ou biológicos com poder de melhorar a resistência a doenças por meio do estímulo do sistema imune inespecífico e específico (ANDERSON, 1992).

A própolis, é um aglomerado elaborada por abelhas *Apis mellifera*, é constituída de material resinoso e balsâmico (PEREIRA et al., 2002) e apresenta potencial como imunoestimulante. Sua composição química é complexa e diversificada, e intimamente relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas e com o tempo de coleta da resina (BANKOVA, 2005). Apresenta elevado potencial biológico, com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anti-inflamatórias (LUSTOSA et al., 2008). Além disso, foram observados efeitos imunoestimulantes desta substância, como a ativação de macrófagos (ORSOLIC; BASIC, 2003), geração de radicais livres e secreção de diferentes substâncias como enzimas e citocinas (FISCHER et al. 2008).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), é uma espécie rústica, de hábito alimentar onívoro, originária da Bacia do Prata, encontrada nos rios Uruguai,

Paraná, Paraguai e seus tributários (GODOY, 1975; SAINT-PAUL, 1986). Suas características zootécnicas, tais como boa taxa de crescimento, e carne saborosa, o colocam em posição de destaque entre as espécies nativas de interesse para aquicultura. Neste sentido, esta espécie vem sendo cada vez mais cultivada em sistemas intensivos, muitas vezes sob condições extremamente estressantes que podem causar distúrbios fisiológicos, tornando-o mais suscetível à doenças oportunistas (URBINATI & CARNEIRO, 2004).

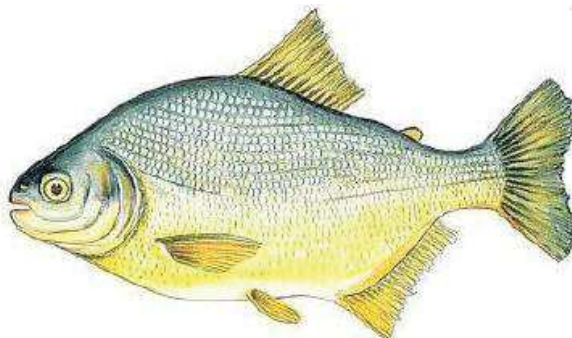
Desta forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito de dietas contendo diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis sobre o desempenho, variáveis hematológicas, imunológicas, morfológicas e composição corporal de juvenis de pacu.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos biológicos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), (Figura 1) pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinae (MACHADO-ALLISON, 1982). Originário da Bacia do Prata, que abrange territórios da Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil é encontrado nos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e seus tributários (SAINT-PAUL, 1986). Conhecido por outras denominações como pacu-caranha, caranha, pacu-guaçu (URBINATI & GONÇALVES, 2005) é umas das espécies mais estudadas na região neotropical, apresentando alto valor econômico. Por apresentar ampla distribuição geográfica, os peixes que vivem em rios localizados em regiões de clima subtropical apresentam tolerância á temperaturas mais baixas.

Figura 1 – Ilustração representativa do pacu (*P. mesopotamicus*)



Fonte: IBAMA/PNDPA (<http://www.ibama.gov.br/pescaadora/pacus>)

Apresenta habito alimentar onívoro-frugívoro, alimenta-se basicamente de folhas e frutos. A espécie apresenta características que o tornam altamente desejáveis para piscicultura, tais como, adaptação aos sistemas de cultivo, elevado ganho de peso, carne branca considerada de ótima qualidade para consumo humano (JOMORI, et al. 2003), rusticidade e facilidade de consumo às dietas comerciais (NUNES et al., 2013).

Devido ao fato de apresentar tais características, o cultivo da espécie em sistemas intensivos vem se intensificando, o qual predispõe o animal a condições de estresse, tornando-os mais suscetíveis a doenças. Gerando assim a necessidade de adoção de técnicas e métodos que eleve a resistência dos peixes e a capacidade de reagir frente as situações de estresse a que são expostos, por meio da modulação do sistema imune (GATESOUBE, 1999). Neste sentido plantas medicinais, leveduras com capacidade de estimular as respostas imunes, representam uma alternativa para prevenção de doenças através da ativação dos mecanismos de defesa específicos dos peixes.

2.2 Aspectos gerais do sistema imune e hematologia de peixes

2.2.1 Sistema imune

O sistema imunológico dos peixes é similar ao dos mamíferos, apresenta dois mecanismos de defesa: i) a resposta inata ou não específica, a qual consiste na primeira barreira de defesa contra microrganismos e corpos estranhos em geral, ou seja, impedem o acesso ao hospedeiro, impossibilitando sua entrada e até mesmo expulsando patógenos, e ii) resposta imune específica é caracterizada pela especificidade e memória imunológica, instigada por antígenos presentes em microrganismos invasores, os quais ativam o sistema imune para produção de linfócitos T e anticorpos (URBINATI & CARNEIRO, 2004) sendo que, o número de linfócitos circulantes responsáveis pela produção de anticorpos, é considerado indicativo da saúde dos peixes.

O sistema imunológico inato dos peixes é um mecanismo de defesa fundamental, dividido em três barreiras físicas tegumento (muco e pele), celulares (células fagocíticas) células citotóxicas não específicas e células epiteliais) e humorais que incluem o sistema complemento, sistema de enzimas

antimicrobianas e mediadores não específicos, como o interferon e as interleucinas (MAGNADOTTIR, 2006).

O tegumento dos peixes é constituído por muco e pele considerados como uma barreira externa com células especializadas secretoras de compostos bactericidas, as quais têm a função de impedir a invasão de microrganismos, pois possuem compostos antimicrobianos que incluem lectinas, complemento, lisozima e peptídeos bactericidas. Na maioria das vezes a barreira física é suficiente para impedir os agentes invasores, contudo caso ocorra invasão dos tecidos e circulação, este será reconhecido pelos componentes celulares e humorais do sistema imune (ELLIS, 2001).

A imunidade celular é formada por diversas células de defesa como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e células citotóxicas, que agem na eliminação dos patógenos estas células de defesa nos peixes são produzidas nos tecidos linfóides como rim, baço, timo (EVANS, 1997). Os trombócitos dos peixes são células de defesa orgânica do sangue, com a função de hemostasia e fagocitose por meio de fosfatase ácida, além de apresentarem habilidade de migração para focos inflamatórios (TAVARES DIAS et al, 1999; RANZANI – PAIVA et al., 2013).

Os monócitos apresentam atividade fagocítica e citotóxica não específica, são considerados como células em movimento no sangue e durante o processo inflamatório migram para o tecido onde se diferenciam em macrófagos (WITTEN et al., 1998; CUESTA et al., 1999). Os neutrófilos são células polimorfonucleares presentes no sangue, tecidos linfóides, os quais são responsáveis pela defesa do organismo contra infecções através de fagocitose e produzindo ânion superóxidos (PLYZYCZ et al, 1989; RANZANI- PAIVA, 2013).

Os eosinófilos agem nos processos inflamatórios e na defesa celular por meio da degranulação de grânulos citotóxicos e proteína catiônicas, e estão distribuídos pelo tecido conjuntivo, principalmente brânquias, trato gastrointestinal e na corrente sanguínea quando há infestação parasitária (URBINATI et al., 2014).

Os fagócitos (monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) exercem importante função de modulação do sistema imune inato devido a fagocitose e eliminação dos patógenos (URBINATI et al., 2014). Durante o processo de fagocitose, há um consumo superior de oxigênio molecular, mecanismo

denominado como *burst* oxidativo, que por meio da ação enzima superóxido dismutase (SOD) resulta em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos, transformando-se em hipoclorito levando a produção de cloraminas. Todos os radicais livres produzidos são agentes oxidantes que contribuem ativamente para destruição dos agentes patogênicos (VERLHAC, et al., 1998). As células citotóxicas causam lise de células estranhas ou infectadas por vírus, sem que expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica, contudo não proporcionam memória imunológica (GREENLEE et al., 1991).

O sistema inato humoral atua por meio de componentes solúveis nos líquidos corpóreos como muco, epiderme e soro. O mecanismo para impedir a invasão dos patógenos é a produção de compostos antibacterianos, fagocitose, citocinas, proteína de fase aguda de inflamação, ação do sistema complemento. E os componentes humorais inibidores de crescimento bacteriano são transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C, peptídeos antibacterianos e as proteínas do sistema complemento, ativados pela via alternativa e das lectinas (ELLIS, 1999).

A lisozima é uma enzima bactericida com atividade lítica contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, parasitas e vírus, está presente no muco, tecidos linfoides, plasma e outros fluídos no corpo onde existam leucócitos (PALAKSHA et al., 2008). O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis e de membrana as quais atuam nos processos biológicos de fagocitose, quimiotaxia de leucócitos, além de ser considerado um dos principais mediadores no processo inflamatório (ROED et al., 1992). A ativação do sistema complemento ocorre através das vias clássicas atuando por complexo antígeno-anticorpo e agregados de imunoglobulinas, enquanto a via alternativa, é ativada por moléculas da superfície de microrganismos e por complexo antígeno- anticorpo. Nos peixes a via alternativa é considerada a mais importante devido a sua alta eficiência nos mecanismos de defesa inata (HOLLAND & LAMBRIS, 2002).

Os imunoestimulantes proporcionam maior resistência aos animais frente as doenças infecciosas, não pela melhora do sistema imune específica, mas atuando nos mecanismos de defesa não específico. Entretanto, não há componentes de memória e a resposta possivelmente será de curta duração. A

utilização dos imunostimulantes é uma forma de aumentar a imunocompetência e a resistência dos peixes frente as doenças (SAKAI, 1999). A imunomodulação pode ser empregada mediante a otimização ou por meio de supressão de elementos do sistema imunológico (KIRKLEY, 1999).

2.2.2 Conceitos gerais de hematologia em peixes

A avaliação dos parâmetros hematológicos em peixes é de grande importância em sistemas de cultivo, uma vez que podem ser utilizados como indicadores do seu estado fisiológico, assim como no controle de patologias e estresse decorrentes do manejo. O sangue é um tecido líquido, móvel e está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos. Esse tecido tem como função, transporte de gases respiratórios, nutrientes, produtos do metabolismo celular além de atuar na defesa do organismo (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os peixes não possuem medula óssea e linfonodos, assim os tecidos linfóide e mielóide estão normalmente ligados no mesmo órgão, a região cefálica do rim (ROCHA et al., 2001) e promove a interação imunoendócrina.

O sangue dos teleósteos é constituído de um meio líquido, o plasma, onde ficam em suspensão os elementos figurados pertencente a três classes de glóbulos: glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos) e os trombócitos (RANZANI-PAIVA, et al., 2013). Os eritrócitos são as células mais abundantes, são ovais, tem núcleo central semelhante ao formato da célula, com cromatina compactada e sem nucléolos (TOCIDLOWSKI et al., 1997). A principal função dos eritrócitos é transportar oxigênio e parte de gás carbônico do sangue, através da hemoglobina. Portanto qualquer deficiência ou alteração no número de eritrócitos pode causar deficiência de oxigênio nos tecidos. O hematócrito corresponde ao percentual de eritrócitos em relação ao volume total de sangue (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os glóbulos brancos ou leucócitos são células de defesa e representam os componentes do sistema imune em peixes (TORT et al, 1998). Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes na maioria das espécies de peixes teleósteos, podem apresentar formato circular, com núcleo ocupando quase toda célula, com inúmeras projeções citoplasmáticas. São células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e formação da resposta imune, produzido nos

tecidos linfóides. Os monócitos são células grandes, circulares e possuem a capacidade de migração dos vasos sanguíneos para o tecido, sendo estes considerados os principais fagócitos dos peixes. (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os neutrófilos são as principais células responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas, realizando fagocitose. Apresentam formato circular, podendo apresentar diferentes projeções citoplasmáticas, e formato irregular com núcleo podendo apresentar diversas formas dependendo do estágio de maturação da célula (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os eosinófilos são células com núcleo arredondado, ampla variação no formato da célula, sua função ainda é incerta nos peixes, embora há evidências de sua colaboração em processos de defesa contra patógenos (MARTINS, et al., 2004).

Os trombócitos na maioria das espécies de peixes, apresentam formato elíptico com núcleo acompanhando o formato da célula. São células de defesa orgânica envolvidas principalmente no processo de coagulação sanguínea, mas também com a fagocitose e remoção de fragmentos celulares (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Neste intuito, tem-se buscado substâncias com capacidade de auxiliar o sistema imunológico no controle de microrganismos patogênicos (LABRO, 2000). Entre as substâncias com capacidade imunoestimulantes, os derivados de plantas, como a própolis aparece com grande potencial para uso na nutrição de peixes como ferramenta para manter o bem-estar dos animais e garantir sua sanidade por meio do estímulo de seu sistema imunológico e melhorar seu desempenho.

2.3 *Própolis na alimentação de peixes*

Mais de vinte mil espécies de abelhas são conhecidas, entretanto apenas 2% destas são produtora de mel e própolis, sendo as do gênero *Apis* as mais conhecidas e largamente estudadas. Espécimes de *Apis mellifera* são conhecidas como abelhas melíferas e produzem própolis a partir de exsudados de plantas captadas de botões florais e gemas apicais de várias fontes vegetais (GHISALBERTI, 1979). A própolis é um material resinoso, caracterizada por apresentar coloração variada (verde, vermelha, marrom claro e escuro), recolhido pelas abelhas de diversas plantas e homogeneizada com cera secretada pelas abelhas, apresenta várias funções nas colmeias tais como

construção, manutenção e proteção. A composição da própolis é bastante diversificada, devido a origem geográfica e das plantas visitadas pelas abelhas (DENG, et al. 2011). A palavra “própolis” é de origem grega: *pro-* em defesa de, em prol de; e *polis* – cidade. Assim, própolis quer dizer em defesa da cidade, ou seja, da colmeia (GROOT, 2013).

A própolis normalmente é composta de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% cera, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% de compostos orgânicos diversos (TALAS & GULHAN, 2009). Apresenta uma variedade de compostos químicos, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas), esteróides, aminoácidos e compostos inorgânicos (BANKOVA, et al. 2000). A maioria destes são compostos lipofílicos, ou seja, são fáceis de extrair com etanol, resultando no extrato etanólico de própolis (EEP) (NAKAJIMA, et al. 2007). Os compostos principais responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis são os flavonóides, os quais são compostos fenólicos oriundo de plantas, os quais atuam em diferentes etapas fisiológicas (BARBOSA et al., 2009). Os flavonóides são divididos em diferentes classes, dependendo exclusivamente das suas características químicas e biossintéticas: flavonas, flavanol, flavonona, isoflanona (OLDONI et al., 2011).

A característica da flora local de cada região de coleta, define a composição química da própolis, integrando os compostos voláteis. Em ambientes distintos, as abelhas coletam própolis de diferentes fontes, selecionando as plantas representantes da flora local. A própolis apresenta metabólitos secundários da planta, incluindo compostos voláteis, mas são elaborados a partir de diferentes plantas e não são semelhantes em todo mundo (BANKOVA et al., 2014). No Brasil há uma grande diversificação em relação ao teor de flavonóides presentes na própolis brasileira (PEREIRA, et al., 2003) Segundo Banskota et al. (1998) a própolis brasileira apresenta baixa concentração de flavonóides e ácidos fenólicos, e altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e terpenóides específicos.

A própolis é um composto utilizado na medicina popular a muito tempo atrás e tem deslumbrado os pesquisadores nos últimos 40 anos devido as propriedades biológicas, farmacológicas, como imunomoduladoras, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (BANKOVA, et al. 2000). A forma mais promissora para controlar doenças nos sistemas de cultivo é por meio do

fortalecimento do sistema imune dos peixes com a administração profilática de imunostimulantes naturais (DUGENCI et al., 2003). Neste sentido, os efeitos da própolis têm sido estudados para diversas espécies entre elas, os peixes.

Em estudos realizados com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Yonar et al. (2011), verificaram a capacidade do extrato alcoólico de própolis em restaurar o sistema imunológico dos peixes induzidos a imunossupressão pela oxitetraciclina, sendo que os peixes alimentados com ração acrescida de 50 mg de própolis kg⁻¹ extrato de própolis demonstraram aumento significativo da atividade do sistema imune inespecífico e também redução na concentração de enzimas relacionadas a processos oxidativos. Kashkooli et al (2011) avaliaram os efeitos da administração a longo prazo de extrato de própolis em dietas suplementadas, e concluíram que a própolis é uma substância não tóxica para truta e sua administração a longo prazo não apresenta efeito colaterais. O extrato etanólico de própolis na dieta também se mostrou eficiente como promotor de crescimento, agente hepatoprotetor e imunostimulante (DENG, et al 2011).

Foram analisados os efeitos da suplementação de própolis (10 g kg⁻¹ e 30 g kg⁻¹) e vitamina E (60 mg kg⁻¹) em dietas para a truta arco-íris submetidas a duas taxas de fluxo diferentes (0,9 L min⁻¹ com 4,5 mg L⁻¹ de O₂ e 2,1L min⁻¹ com 7,6 mg L⁻¹ de O₂). Conclui-se que a suplementação de vitamina E e própolis, reduziu os efeitos negativos do estresse, e que a suplementação de 30 g de própolis kg⁻¹ na dieta foi mais eficiente no desempenho (KELESTEMUR et al., 2012).

Bae et al. (2012) sugeriram diferentes níveis de suplementação do extrato etanólico de própolis bruta na dieta de juvenis de enguia (*Anguilla japonica*). Os resultados demonstraram que os níveis ótimos de suplementação dietética de própolis para crescimento e eficiência alimentar foi de 0,25-0,5% e como imunostimulantes de 0,5 – 1%.

Meurer et al. (2009) avaliaram o extrato de própolis marrom (BPE) como promotor de crescimento para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Observaram que os níveis de inclusão de 1,83 a 2,74 g proporcionaram maior crescimento, evidenciando assim o potencial do extrato de própolis. Para a mesma espécie foram avaliados os efeitos do antagonismo da *Aeromonas hydrophila* pelo extrato de própolis e própolis bruta. Os autores verificaram que dietas acrescidas com extrato de própolis foi mais eficiente que a própolis bruta,

para crescimento, imunidade e resistência dos animais frente *A. hydrophila* (AZZA & ABD-EL RHMAN, 2009).

Yonar et al. (2011) avaliaram os efeitos antioxidantes do extrato etanólico de própolis contra efeitos tóxicos do cromo VI em carpas (*Cyprinus carpio*). Os autores verificaram que a administração da própolis alivia o estresse oxidativo induzido pelo cromo. Cuesta et al. (2005) constataram os efeitos da administração intraperitoneal e dietética da própolis para a dourada (*Sparus aurata*). Os autores verificaram que a própolis tem efeito imunoestimulante limitados embora a administração intraperitoneal foi mais eficiente do que a via dietética.

Com otário chinês (*Myxocyprinus asiaticus*), foram avaliados a resposta imune não específica dos peixes alimentados com dieta contendo própolis e extrato de *Herba epimedii* (3:1) e a resistência a *A. hydrophila*. Os resultados apontaram aumento na produção de radicais oxidativos, atividade de lisozima nos peixes alimentados com o nível de 0,5% e a combinação do extrato de própolis e *H. epimedii* proporcionaram redução na taxa de mortalidade, aumento da resposta imune e a resistência a doença do otário chinês contra *A. hydrophila* (ZHANG et al., 2009).

Com a necessidade de adoção de técnicas corretas para produção de alimentos destinados ao consumo humano, tem-se buscado boas práticas de manejo nos sistemas de cultivo, e uma dessas práticas é a redução dos antimicrobianos durante o cultivo, favorecendo o uso de substâncias com capacidade de modular o sistema imune, aumentando sua resistência frente aos agentes patogênicos, tornando-se assim uma solução segura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Arranjo experimental

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná do *Campus* Dois Vizinhos (protocolo nº 2013-007).

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino e Pesquisa em Piscicultura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos – PR. Espécimes de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) provenientes de piscicultura comercial, foram transportados e mantidos nas instalações, onde o

estudo foi desenvolvido. Os peixes foram sedados em solução de benzocaína (1:10.000), pesados (peso inicial $200,83 \pm 44,59$ g) e separados em grupos de 10 exemplares distribuídos, em um delineamento inteiramente casualizado, em quatro caixas circulares de polietileno de 250L, sendo cada caixa correspondente a uma unidade experimental (tratamento) e cada peixe uma repetição (n=10). As caixas estavam conectadas a um sistema fechado de recirculação de água, com filtragem mecânica e biológica, providos de aeração forçada e temperatura controlada por meio de aquecedores. Durante 60 dias as dietas experimentais foram fornecidas aos peixes duas vezes ao dia (08h00m e 17h00m) até aparente saciedade e a quantidade distribuída para cada caixa registrada.

Os tratamentos alimentares corresponderam a uma ração comercial extrusada (36% PB) suplementada com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis - EEP (0,0; 1,5; 3,0 e 4,5%). Para tanto, a ração foi borrifada com EEP nas concentrações correspondentes a cada tratamento e o controle (0,0% EEP) apenas com álcool 80%. Em seguida, foram levadas a estufa com ventilação forçada de ar por 10 minutos a 45°C, para secagem e incorporação do EEP. Por fim, as dietas foram embaladas em recipientes plásticos hermeticamente fechados e armazenadas (-20°C) até sua utilização.

3.2 Obtenção da própolis bruta e preparo do extrato etanólico de própolis (EEP)

A própolis foi produzida no apiário da UTFPR, *Campus* de Dois Vizinhos-PR. Foram utilizadas cinco colônias de abelhas (*Apis mellifera*) africanizadas, as quais foram alojadas em colmeias padrão Langstroth, com coletores de própolis (CP), manejadas apenas para a produção de própolis, com rainhas irmãs e de mesma idade. A própolis bruta foi limpa retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas. Em seguida, foi triturada, homogeneizada, pesada e armazenada a -18°C para posterior obtenção do extrato etanólico.

Para o preparo do extrato etanólico de própolis (EEP), 100g de própolis obtidos conforme descrito acima foi transferido para frasco de vidro contendo 700mL de etanol a 80%. A extração foi realizada a 70°C, em banho maria por 45 minutos sob agitação constante, em seguida, filtrado e transferido para um frasco de vidro com tampa de rosca seguindo a metodologia preconizada por OLDONI et al. (2015).

3.3 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico

Ao final do experimento (60 dias), os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, em seguida todos foram sedados (solução de benzocaína 1: 10.000), pesados e medidos. O desempenho dos juvenis de pacu alimentados com as dietas contendo diferentes concentrações de EEP foi avaliado considerando-se os seguintes parâmetros NRC (2011):

- Ganho de peso (g):

$$GP = Pf - Pi$$

- Consumo de ração (CR);
- Índice de conversão alimentar:

$$ICA = \frac{CR}{GP}$$

- Taxa de crescimento específico:

$$TCE = \frac{100x(Pf - Pi)}{t}$$

Onde: Pf = peso final (g); Pi = peso inicial (g); t = período experimental (dias).

- Índice hepatossomático:

$$IHS = \left(\frac{\text{peso fígado}}{\text{peso corporal}} \right) x 100$$

- Fator de Condição (K):

$$FC = 100x \frac{GP}{(\text{Comprimento total})^2}$$

3.4 Análises da composição química

Ao final do experimento, foram amostrados quatro peixes por caixa/tratamento para determinação da composição corporal do peixe inteiro (AOAC, 1999). Os peixes foram sacrificados/eutanasiados por superdosagem de anestésico seguido por secção medular moídos inteiros e homogeneizados, os quatro animais constituíram uma amostra para determinação dos teores de umidade, pela secagem a 105°C em

estufa com ventilação forçada até peso constante, de proteína bruta ($N \times 6,25$) pelo método de Kjeldahl, de extrato etéreo, pelo método de Soxhlet, e de matéria mineral, em forno mufla a 550°C por 6 horas.

3.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

O perfil hematológico dos dez animais foi realizado por meio da punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas de 3mL previamente umedecidas com heparina.

3.5.1 Estimativa da concentração de hemoglobina

Para realização desta análise, adotou-se o método da cianometahemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973) 0,02mL (20 μ L) de sangue foram diluídos em 5mL do reagente de cor da hemoglobina, após 10 minutos a amostra foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante recolhido para leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540nm e os resultados expressos em $\text{g}^{-1}100\text{mL}$.

3.5.2 Valor do hematócrito

Amostras sanguíneas homogêneas foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000g em centrífuga de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como $\text{Vol. eritrócitos} / 100\text{cm}^3$.

3.5.3 Contagem total de eritrócitos

Para a contagem de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02mL de sangue para 4,0mL do diluente formol citrato. Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em $\text{Num}_{\text{eritrócitos/leucócitos}}/\text{mm}^3$.

3.6 Avaliação de parâmetros imunológicos

A avaliação dos parâmetros imunológicos dos peixes foi realizada por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas e agulhas descartáveis sem anticoagulantes, e separados em dois tubos tipo “eppendorf”. Amostra de sangue sem anticoagulante permaneceram em temperatura ambiente por duas horas para posterior centrifugação (600 x g por 10 minutos) onde foi obtido o soro.

3.6.1 Atividade respiratória dos leucócitos

Para dosagem do precipitado 0,1mL do sangue total foi adicionado a 0,1mL de *nitroblue tetrazolium* (NBT, Sigma, St Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Após incubação, 50µL da suspensão homogeneizada foram colocados em um tubo de vidro com 1,0mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000g por 5 minutos. Em seguida foi realizado a leitura em absorbância, da solução em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

3.6.2 Concentração de Lisozima sérica

Antes de determinar a concentração de lisozima das amostras de soro dos peixes, foi realizada a curva padrão de calibração pela quantificação das diferenças de densidades ópticas iniciais e finais (Δ DO) de diferentes concentrações de lisozima padrão (Sigma L 6876). Para determinar a curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de lisozima padrão 10, 20, 30, 40, 50 60, 70, 80 µL para diferentes concentrações de tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄; 0,05M; pH 7,4) 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120µL respectivamente 200µL, em suspensão de 200µL de *Micrococcus lysodeikticus* (37,5mg bactéria diluída em 50mL de tampão fosfato de sódio), mensurados em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm.

A partir da curva determinada, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta e as respectivas Δ DO. Para tal, as amostras de soro foram adicionadas em uma cubeta de 1,0mL onde foi pipetado 100µL de soro ao qual se adicionou 100µL de tampão fosfato de sódio e em seguida incubada a 26°C por dois minutos. Após esse período, foi adicionado mais 200µL da suspensão de *M. lysodeikticus* totalizando um volume

final de 400 μ L. A redução da densidade óptica (Δ DO) em 450nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26°C. Os resultados expressos em μ g mL⁻¹ de soro.

3.7. *Morfologia intestinal*

Para avaliação histológica das estruturas, foi tomada a porção inicial do intestino, três centímetros a partir do piloro. Depois de retirada do fragmento do intestino, procedeu-se um corte longitudinal da porção amostrada e as extremidades foram presas em uma base de cartolina retangular de modo a manter as vilosidades expostas em seguida lavadas cuidadosamente com solução salina 0,6% para limpeza e retirada das fezes presentes. Após lavagem, cada fragmento foi fixado individualmente em solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas e, após, conservados em álcool 70%, até o momento do procedimento histológico. Após a fixação do material, procedeu-se a desidratação do tecido em série alcoólica crescente, posteriormente incluídos e blocados em parafinas.

Para a realização dos cortes histológicos foi utilizado o micrótomo e realizado cortes de 5 μ m de espessura, fixados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (HE); foram confeccionadas duas lâminas por peixe. A medida da altura das vilosidades foi baseada na distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e, a espessura da camada muscular foi mensurada totalmente. As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz, com o auxílio do *software* (ZEN, ZEN 2012 Blue Edition, Carl Zeiss Microscopy®). A mensuração das vilosidades intestinais e espessura da camada muscular foram posteriormente fotografadas no aumento 10 e 40x, respectivamente.

3.8. *Análise estatística*

A avaliação dos efeitos das concentrações de extrato etanólico de própolis na dieta sobre os parâmetros de desempenho, composição corporal e imunológicos de juvenis de pacu foi realizada por meio de análise de variância de um fator (one-way ANOVA). Quando identificadas diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Adicionalmente, os dados de ganho em peso e taxa de crescimento específico foram submetidos a análise de regressão. Previamente às análises

estatísticas, foi realizada a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados pela aplicação do teste Shapiro – Wilk.

4. RESULTADOS

4.1 Desempenho zootécnico

Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos sobre o ganho de peso, taxa de crescimento específico, consumo de ração e índice de conversão alimentar (figura 2). Os peixes alimentados com dieta contendo 1,5% de EEP apresentaram maior ganho de peso e taxa de crescimento específico quando comparado com o controle e aos demais níveis testados. O índice de conversão alimentar foi menor no nível de inclusão 1,5% de EEP, porém este não diferiu do nível 4,5% e controle, apenas o nível de 3,0% apresentou maior taxa de conversão.

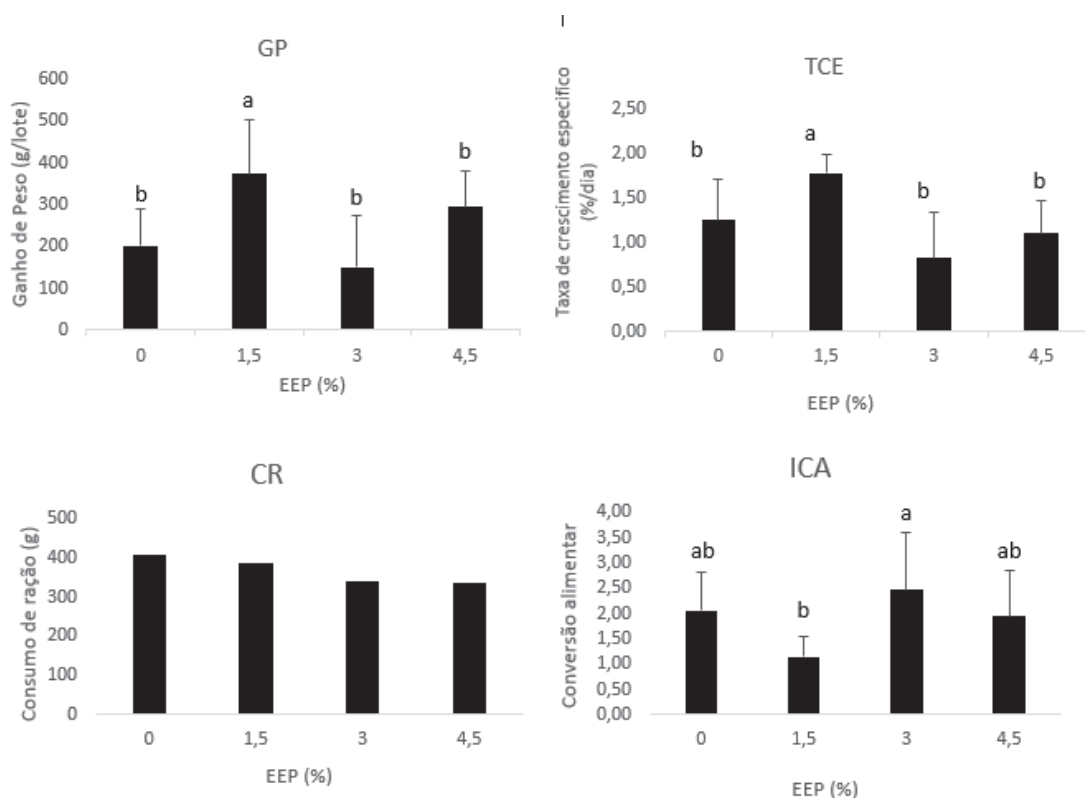


Figura 2 - Desempenho zootécnico de juvenis de pacu, (*P. mesopotamicus*), alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias. Para cada parâmetro, letras diferentes acima de cada coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.2 – Composição química, índice hepatossomático e fator de condição

As diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis na dieta não influenciaram ($P>0,05$) os teores de proteína, cinzas, índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (K) dos peixes ao final dos 60 dias do período de alimentação (Tabela 1). Porém os teores de umidade e lipídio foram afetados ($P<0,05$), sendo observado maior teor de umidade e menor de lipídio corporais nos juvenis de pacu alimentados com a dieta controle, isenta de EEP.

Tabela 1- Composição corporal, índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (K) de pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo concentrações crescentes de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias.

Parâmetro	Diets experimentais				P- valor
	Extrato Etanólico de Própolis (%)				
	0,0	1,5	3,0	4,5	
Matéria Seca(%)	29,47±2,72 ^b	31,60± 1,27 ^{ab}	33,16 ±1,94 ^a	33,16 ±1,16 ^a	0,0002
Lipídio (%)	8,68 ±1,81 ^b	10,61 ±1,39 ^a	11,72 ±1,37 ^a	10,99 ±1,70 ^a	0,0010
Proteína (%)	14,20 ±1,09	14,46 ±0,61	13,80±1,06	14,41±1,06	0,8769
Cinzas (%)	11,02±3,02	9,61±2,14	10,14±2,16	11,22±2,68	0,4093
IHS (%)	1,50±0,69	1,86±0,66	1,55±0,52	1,73±0,75	0,8112
K	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,003	0,02±0,01	0,6086

Médias (\pm DP) na mesma linha com letras diferentes sobrescritos são estatisticamente diferentes ($P< 0,05$) pelo teste de tukey.

4.3 Parâmetros hematológicos e imunológicos

Os resultados apresentam-se sumarizados na tabela 2. Não foi observada diferença significativa ($P> 0,05$) os parâmetros hematológicos e a concentração de lizosima sérica dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 2 – Parâmetros hematológicos e Imunológicos de pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com diferentes níveis EEP na dieta

Parâmetro	Diets experimentais				P- valor
	Extrato Etanoico de Própolis (%)				
	0,0	1,5	3,0	4,5	
Hb(g dL ⁻¹)	3,3 ±0,6	4,1 ±1,1	3,9 ±0,8	4,1 ±1,4	0,3861
Htc (%)	28 ±3,8	25,3 ±3,3	30,5 ±5,5	26,7 ±5,5	0,1924
Rbc (µL x 10 ⁶)	189,8 ±24,9	194,6 ±42,4	220,1 ±37,1	194,7 ±60,7	0,4452
Liz (µg mL ⁻¹)	2,8 ±3,1	5,1 ±1,1	3,2 ±1,4	2,8 ±1,0	0,0655

Observou-se aumento ($P < 0,05$) nos valores de densidade óptica da atividade respiratória dos leucócitos *Burst*, na qual todas as dietas suplementadas com EEP apresentaram valores superiores ao controle (Figura 3).

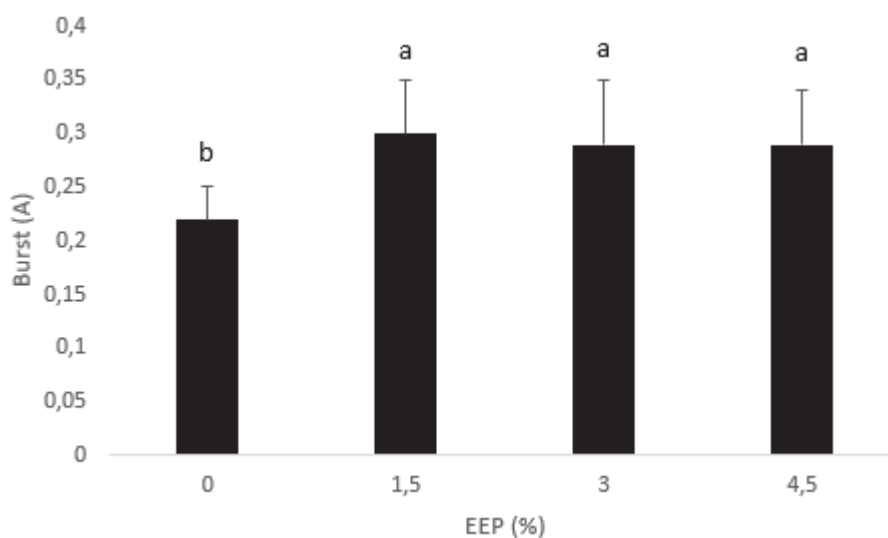


Figura 3– *Burst oxidativo* de juvenis de pacu, (*P. mesopotamicus*), alimentados com dieta contendo concentrações crescentes EEP. Letras diferentes acima de cada coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste de tukey.

4.4 Parâmetros histológicos

A análise histomorfométrica não demonstrou efeito ($P > 0,05$) dos diferentes tratamentos alimentares sobre as vilosidades intestinais dos juvenis de pacu (Figura 3).

Tabela 3 - Altura das vilosidades intestinais de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo concentrações crescentes de extrato etanólico de própolis (EEP), ao final de 60 dias

TRATAMENTOS	ALTURA VILOSIDADE (μm)
0,0 %	651,326 \pm 137,8
1,5 %	695,936 \pm 176,1
3,0 %	653,871 \pm 1,7
4,5 %	673,444 \pm 119,9
<i>P</i> -valor	0,4037

Entretanto, foi observada diferença significativa na espessura da camada muscular do intestino dos peixes, em que o nível de inclusão de 1,5% EEP resultou em maior espessura da camada quando comparada com o controle e demais tratamentos (Figura 4).

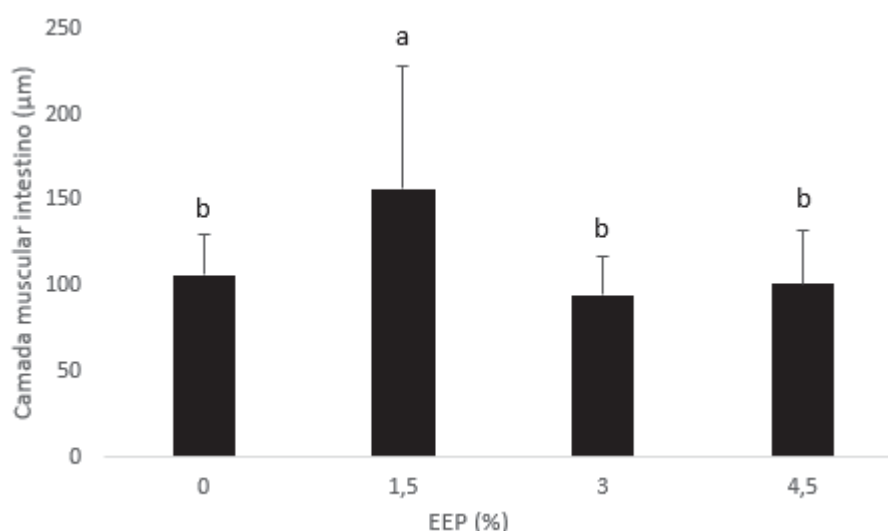


Figura 4 – Espessura da camada muscular intestinal de pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com dieta contendo níveis crescentes EEP. Diferentes letras acima de cada coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste de tukey.

5. DISCUSSÃO

A redução ou a não utilização de antimicrobianos em sistemas de cultivo intensivos de produção de peixes é importante, pois o uso indiscriminado pode gerar o surgimento de microorganismos resistentes aos medicamentos e deixar resíduos de antibióticos nos peixes e no meio ambiente (ESIÖBU et al., 2002; BELEM-COSTA & CYRINO, 2006). No presente estudo, a suplementação

dietética de 1,5 % EEP melhorou significativamente o desempenho dos juvenis de pacu. De forma semelhante, a administração de própolis na ração de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e *Myxocyprinus asiaticus*, demonstraram resultados benéficos quanto ao ganho de peso e melhora da conversão alimentar (AZZA & ABD-EL RHMAN, 2009; MEURER et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

A atividade antimicrobiana dos componentes da própolis, podem ocasionar benefício à saúde intestinal dos animais, promovendo maior digestão e absorção de nutrientes, conseqüentemente melhorando o desempenho zootécnico (DENG et al., 2011). Neste contexto, Abbass et al. (2012) ao avaliarem o efeito da adição de própolis na dieta de tilápias do Nilo, verificaram que a suplementação de 2,5% de própolis na dieta melhorou significativamente os índices de crescimento e eficiência alimentar dos peixes. Segvic bubic et al. (2013) também verificaram que a adição na dieta de 2,5 g kg⁻¹ de própolis bruta estimulou a taxa de crescimento específico, eficiência de conversão alimentar de juvenis do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*).

Segundo Pereira-da-Silva & Pezzato (2000) independente dos órgãos sensoriais envolvidos na alimentação, o paladar é apontado como o encarregado pela seleção final, determinando o consumo ou a negação de um alimento, ou até mesmo limitando a quantidade a ser ingerida. Devido a presença de compostos tais como resina, balsamo, cera, óleo essencial, pólen (SOLTANI, et al., 2017), a própolis pode diminuir ou alterar a palatabilidade do alimento, podendo influenciar no consumo, sendo necessário seu uso com parcimônia.

Neste sentido Ito et al. (2009), verificaram que a inclusão de 0,4% de própolis na dieta de leitões desmanados, promoveu uma diminuição do consumo em relação ao grupo controle, sugerindo efeito da própolis no consumo de ração pelos animais. Em frangos de corte, também foi observado uma redução no consumo diário de ração as dietas que foram acrescidas com própolis tanto na forma bruta como extrato (DUARTE et al., 2014; EYNG et al., 2014; DANESHMAND et al., 2015).

As dietas acrescidas do EEP resultaram em aumento significativo na deposição de gordura e teor de matéria seca dos peixes. Segundo Bicudo et al. (2012) o acúmulo de gordura corporal na fase de crescimento (350- 400 g) para juvenis de pacu pode ser vantajoso, devido ao fato que ocorre um maior manejo dos animais nesta fase, como transferência para outros tanques com uma

redução da taxa de estocagem, mudança de ração da fase anterior, além da redução da taxa de arraçoamento devido ao período de inverno. Deste modo tais manejos acarretam um quadro de estresse, no qual esse reserva de gordura pode ser disposta na forma de energia para regularizar o equilíbrio osmótico e retorno a homeostase.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bae et al., (2012) em juvenis de enguia japonesa (*Anguilla japonica*), em que os valores para lipídios aumentaram após a suplementação de própolis (0,25 e 0,5%) na dieta. Porém resultados divergentes foram verificados por Uczay et al. (2014) com juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*) no qual o percentual de gordura corporal foi reduzido com a adição de própolis. A própolis tem capacidade de modificar a composição corporal dos peixes, porém não se sabe o componente ativo envolvido neste efeito benéfico, sendo necessários mais estudos para sua identificação (BAE et al., 2012).

Não houve efeito no fator de condição e índice hepatossomático (IHS) nos peixes tratados com extrato etanólico de própolis. O IHS é influenciado por vários fatores como ciclo reprodutivo, sexo dos animais, alimentação e infecções responsáveis por eventuais mudanças (TAVARES-DIAS et al. 2000). Por meio deste índice é possível adquirir informações do estado de higidez, o qual é influenciado pelas variações da quantidade de gordura e glicogênio armazenados no fígado (OLIVEIRA et al., 1997). Demonstrando desta forma que os peixes estavam em boas condições nutricionais, durante o período experimental.

Uma maneira de monitorar a condição sanitária dos peixes é por meio de exames hematológicos, tendo em vista que em peixes a presença, quantidade e proporção das distintas células no sangue refletem o estado fisiológico do animal em determinada fase da vida (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004). Os resultados do número de eritrócitos, hematócrito foram semelhantes aos descritos por Tavares –Dias et al. (1999) como dentro do padrão normal para a espécie. Segundo os mesmos autores em sistemas de cultivo pode ocorrer uma variação nos valores de hemoglobina para espécie, podendo encontrar valores na faixa de 4,9 – 12,1g dL⁻¹ sendo considerados adequados para a pacu. Estes resultados demonstram que os peixes mantiveram normalmente a eritropoese, processo essencial para os animais.

A lisozima é considerada uma enzima hidrolítica que danifica a parede celular bacteriana, atacando peptidoglicanos interferindo assim o desenvolvimento bacteriano, favorecendo o processo de fagocitose e melhorando desta forma o sistema imunológico dos animais (BAE et al., 2012). Neste estudo, a suplementação com EEP não demonstrou efeito sobre a atividade da lisozima. Corroborando com o presente resultado Bae et al. (2012) não observaram aumento da atividade da lisozima com a inclusão de 1% de própolis na dieta para enguia japonesa, porém, os autores ressaltam que a inclusão acima de 1% de EEP ocasionou redução da atividade da lisozima. Para juvenis de tilápia alimentados com dietas suplementadas com extrato de própolis e *Aloe barbadensis* (1:1) em concentrações de 0,5, 1 e 2% não foi observado efeito na atividade da lisozima (DOTTA et al., 2014). Diferindo dos resultados obtidos Gunathilaka et al. (2015), verificaram maior atividade da lisozima sérica para o linguado (*Paralichthys olivaceus*) alimentados com 1% de própolis em pó e 0,5% na forma líquida. Azza & El- Rhman (2009), avaliaram a resistência da tilápia do Nilo frente a *A. hydrophila* utilizando EEP bruto como imunoestimulante, neste estudo o extrato etanólico de própolis aumentou significativamente a atividade da lisozima no soro.

Neste contexto a composição química da própolis pode ser bem variada, dependendo das características fitogeográficas de onde foram coletadas, do tipo de pólen que as abelhas selecionam de diferentes plantas em habitats distintos (POPOVA et al., 2010). Estas características tornam difícil a padronização da própolis em diferentes solventes (água, metanol e etanol), na qual são extraídos compostos distintos. Segundo Soltani et al. (2017) em decorrência deste fato, associado a dose adotada, espécie e fase de desenvolvimento pode ocorrer alteração na atividade da lisozima.

A inclusão dos diferentes níveis do extrato etanólico de própolis proporcionaram efeito na “explosão respiratória dos leucócitos” (*Burst*) para o pacu. Durante o processo de fagocitose, há um consumo superior de oxigênio molecular, mecanismo denominado como *burst* oxidativo, que por meio da ação de enzimas, transforma-se em hipoclorito levando a produção de cloraminas. Todos os radicais livres produzidos são agentes oxidantes que contribuem ativamente para destruição dos agentes patogênicos (VERLHAC, et al., 1998). Este mecanismo pode ser influenciado por compostos bioativos, presentes na

própolis como o ácido fenólico, cafeico, ferulico e cumárico, os quais foram identificados como os principais componentes da própolis brasileira, indicando que este material é uma fonte potencial de compostos bioativos (OLDONI et al., 2015; CALEGARI et al., 2017).

Neste contexto concordando com o presente resultado, Gunathilaka et al. (2015), observaram que a dieta suplementada com 1% de própolis, apresentou atividade da mieloperoxidase significativamente maior para o linguado. Yonar et al. (2011) investigaram os efeitos da própolis sobre o estresse oxidativo e imunossupressão induzida por oxitetraciclina (OTC) em truta arco-íris e verificaram que após a administração de própolis houve maior atividade respiratória dos leucócitos.

Quanto as características morfológicas intestinais, os peixes apresentam vilosidades que podem ser circulares, longitudinais, reticulares, entre outras formas (WILSON e CASTRO, 2010). O epitélio da mucosa é constituído por uma camada de células colunares com borda em escova, estas por sua vez aumentam a superfície de absorção intestinal e produzem várias enzimas, como fosfatase alcalina, maltase, sacarose e dipeptidases (RUST, 2002).

Não houve efeito significativo do extrato etanólico de própolis na altura das vilosidades, apesar de não ter sido realizado a análise de microscopia eletrônica de varredura, supõe-se que houve uma melhora da integridade das microvilosidades, devido ao fato da própolis apresentar efeito antibacteriano, levando em consideração diversos trabalhos que descrevem essa atividade biológica da própolis (GRANJE & DAVEY., 1990; MARCUCCI, 1995; MOHAMMADZADEH et al., 2007; SEVEN & SEVEM, 2008; SOLTANI et al., 2017) desta forma pode ter ocasionado uma mudança no perfil da microbiota do trato gastrointestinal.

Neste contexto Dimitroglou et al. (2010) em estudo com dourada (*Sparus aurata*) alimentados com mananoligossacarídeos (MOS), também não observaram nenhuma alteração da altura das vilosidades intestinais, no entanto, ao realizar análise de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, verificaram aumento na densidade e comprimento das microvilosidades, evidenciando, assim, quanto mais estruturas presentes maior o potencial para captura de nutrientes. Estas afirmações também estão de acordo com Salze et

al. (2008), os quais relataram aumento no comprimento das microvilosidades de larva de bijupirá (*Rachycentron canadum*) alimentados com 0,2% de MOS.

Foi verificado efeito do extrato etanólico de própolis sobre a espessura da camada muscular do intestino dos pacus. A espessura da camada muscular no intestino distal, está associada com a viscosidade e condução do bolo fecal (GOLÇALVES et al., 2012). A camada muscular do intestino é dividida em duas camadas, uma circular interna e outra longitudinal externa, as quais conduzem e misturam a digesta ao longo do intestino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Neste sentido Rodrigues et al. (2012) verificaram também maior espessamento da camada muscular do intestino em jundiás alimentados com uma dieta fibrosa, demonstrando assim uma possível adaptação da camada muscular para impulsionar a digesta.

6.CONCLUSÃO

A suplementação de extrato etanólico de própolis na dieta de pacu apresentou eficácia, sendo que, sua utilização de forma estratégica com nível de inclusão de 1,5% na dieta por 60 dias pode trazer benefícios aos animais. Porém, mais informações e estudos referentes ao uso do extrato de própolis como imunoestimulante na dieta devem ser conduzidos com a espécie em questão, testando diferentes doses, em distintas fases de desenvolvimento e outras formas de administração da própolis.

REFERÊNCIAS

- ABBASS, A. A.; EL-ASELY, M. A.; KANDIEL, M. M. M. Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of (*Oreochromis niloticus*). **Turkish Jornal of Fisheries and Aquatic Sciences**. V. 12, p. 851-859, 2012.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p. 281-307, 1992.
- AOAC. Association of Oficial Analitycal Chemists (1999) Oficial methods of analysis of association of official analytical chemists. 16 ed. Washington D. C. 1141p.
- AZZA, M. M.; ABD-EL-RHMAN. Antagonismo of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. V. 27, p. 454 – 459, 2009.
- BAE, J. Y.; PARK, G. H.; LEE, J. Y.; OKORIE, O. E.; BAI, S. C. Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel, (*Anguilla japonica*), **Aquaculture International**, v. 20, p. 513–523, 2012
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origen. **Apidologie Springer**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V. Recent trends and importante developments in propolis research. **ECAM**; v.2, n. 1, pg. 29-32, 2005.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 4, n. 28, p. 2-8, 2014.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, J.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.
- BARBOSA, H. M.; ZUFFI, B. F.; MARUXO, B. H.; JORGE, R. L. L. Therapeutic properties of propolis for treatment of skin lesions. **Acta Scientiae**, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- BARCELLOS, L.J.G; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n.1, p. 99-111, 2000.
- BELEM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* Isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p. 281-284, 2006.

BICUDO, A.J.A.; SADO, Y. R.; CYRINO, J. E. P. Growth performance and body composition of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. **Aquaculture Nutrition**, n. 40, p. 486-495, 2009.

BICUDO, A. J. A.; SADO, Y. R.; CYRINO, P. E. J. Growth, body composition and hematology of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed increasing levels of Ractopmine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p. 1335 – 1342, 2012.

BICUDO, A. J. A.; ABIMORAD, G. E.; CARNEIRO, J. D. Exigências Nutricionais e Alimentação do Pacu. In: FRACALLOSSI, M. D.; CYRINO, P. E. J. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012, p. 217-229.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of fish Biology**, v. 5, p. 771-781, 1973.

BOYD, C. E.; McNEVIN, A. A.; CLAY, J.; JOHNSON, H. N. Certification issues for some common aquaculture species. **Reviews in Fisheries Science**, v. 13, p. 231- 279, 2005.

BRICKNELL, I. & DALMO, A. R. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v.19, p. 457-472, 2005.

CALEGARI, A. M.; PRASNIEWKI, A.; SILVA, C.; SADO, Y. R.; MAIA, C. M. F.; TONIEL, S. M. L.; OLDONI, C. L. T. Propolis from southwest of Paraná produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2017.

CAO, X. J.; WANG, W. M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Journal of Veterinary Medicine Anatomy Histology Embryology**, v. 38, p. 254- 261, 2009.

CHO, S.H. Effects of putative growth or health-enhancing dietary additives on juvenile olive flounder, (*Paralichthys olivaceus*), Performance. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 42, n. 1, 2011.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Bioquímica de pescado e invertebrados. Centro de Estudios em ciência y tecnologia de alimentos. Universidade de Santiago de Chile, p. 309, 2002.

CREPALDI, D. V.; FARIA, C.M.; TEIXEIRA, A.de E.; RIBEIRO, P. L.; COSTA, P. A. A; MELO, C. D.; CINTRA, R. P.A.; PRADO, A. S.; COSTA, A. A. F.; DRUMOND, L. M.; LOPES, E. V.; MORAES, E. V. A situação da aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Rev. Brasileira, reprodução animal**, v.30, n. 3, p. 81-85, 2007.

CUESTA, A.; ESTEBAN, A. M.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 161-171, 1999.

CUESTA, A.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v.18, p.71-80, 2005.

CYRINO, J. E. P.; CONTE, L. Tilapicultura em gaiolas: produção e economia. In: **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. (Org). Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.151-171, 2006

DANESHMAND, A.; SADEGHI, G.; KARIMI, A.; VAZIRY, A.; IBRAHIM, S. A. Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with the probiotic on growth performance, immune response and serum metabolites in male broiler chickens. **Livestock Science**, v.178, p.195-201, 2015.

DENG, J.; NA, Q.; BI, B.; WANG, Q.; KONG, L.; TAO, L.; ZHANG, X. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 37, p. 959-967, 2011.

DIETERICH, G. T.; POTRICH, R. F.; LORENZ, K. E.; SIGNOR, A. A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, R. W. Parâmetros zootécnicos de juvenis de pacu alimentados a diferentes frequências de arraçamento em tanque rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 48, n.8, p. 1043 – 1048, 2013.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, L. D.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, D. J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 300, p. 182-188, 2010.

DOTTA, G.; ANDRADE, A. I. J.; GONÇALVES, T. L. E.; BRUM, A.; MATTOS, J. J.; MARASCHIN, M.; MARTINS, L. M. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, p. 280-284, 2014.

DUARTE, C. R. A.; EYNG, C.; MURAKAMI, A. E.; SANTOS, T. C. Intestinal morphology and activity of digestive enzymes in broilers fed crude propolis. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 105-114, 2014.

DÜGENCI, S. K.; ARDA, N.; CANDAN, A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacol**, 88:99– 106, 2003.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p. 291-308, 1999

ELLIS, E. A. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

ESIOBU N, ARMENTA L, IKE J. Antibiotic resistance in soil and water environments. **International Journal of Environmental Health**, n.12, p. 133–144, 2002.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v.11, n. 6, p. 1115-1147, 1997.

EYNG, C.; MURAKAMI, A. E.; DUARTE, C. R. A.; SANTOS, T. C. Effect of dietary supplementation with on ethanolic extract of propolis on broiler intestinal morphology and digestive enzyme activity. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n.2, p.393-401, 2014;

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2013. **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2016. **The state of world fisheries and aquaculture, contributing to food security and nutrition for all**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>

FISCHER, G.; HUBNER, O. S.; VARGAS, D. G.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147-165, 1999.

GHISALBERTI, L. E.; Propolis: A review, **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GOLDEFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-39, 1971.

GODOY, M.P. Peixes do Brasil, Subordem Characoidei: Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Ed. Franciscana, v. 2, 847p. 1975.

GOLÇALVES, U. L.; RODRIGUES, O. P. A.; MORO, V. G.; CARGNIN-FERREIRA, E.; CYRINO, P. E. J. Morfologia e Fisiologia do Sistema digestório de peixes. In: FRACALLOSSI, M. D.; CYRINO, P. E. J. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012, p. 9-36.

GRANGE, M. J.; DAVEY, W. R. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

GREENLE, R. A.; BROWN, A. R.; RISTON, S. S. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill yac-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms. **Developmental and comparative Immunology**, v. 15, p. 153-164, 1991.

GROOT, C.A. Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. **American Contact Dermatitis Society**. v. 24, n. 6, p. 263-282, 2013.

GUNATHILAKA, E. B. L. G.; HUR, K. Y.; LIM, S.; LEE, K. Effects of dietary supplementation of two types of propolis on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fisheries and Aquatic Sciences**. V. 18, p. 367 – 372, 2015.

HOLLAND, M. C. H. and LAMBRIS, D. J. The complement system in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 12, p. 399-420, 2002.

ITO, E. H.; SILVA, N. V. P.; ORSI, R. O. Uso da própolis em ração de leitões desmamados. **PUBVET**, v. 3, n. 4, Artigo 498, 2009.

IVANOVSKA, D. N.; DIMOV, S.V.; BANKOVA, S. S. Popov Immunomodulatory action of Propolis. IV. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo, **Journal of Ethnopharmacol**. V. 47, p. 145 – 147, 1995.

JERÔNIMO, G. T. PÁDUA, S. B.; BAMPI, D. GONÇALVES, E. L. T.; GARCIA, P.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p.1000 – 1006, 2014.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 222, p. 277-287, 2003.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Histologia básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

KASHKOOLI, O.B.; DORCHEH, E. E.; SAMIE, A. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, 315–318, 2011.

KELESTEMUR, G.; SEVEN, I. Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under different flow rate. **Aquaculture Research**, 1–12, 2012.

KIRKLEY, S.A. Proposed mechanisms of transfusion induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, 173, p.111– 133, 2012.

KLEIN, J. Immunology Book reviews. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, p. 566-568, 1999.

KUMARI, J.; SAHOO, P. K. Dietary β -1, 3-glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian cat fish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 29, p. 95-101, 2006.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.615-650, 2000.

LUSTOSA, R. S.; GALINDO, B. A.; NUNES, C. C. L.; RANDAU, P. K.; NETO ROLIM, J. P.; Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18, n. 3, pg. 447-454, 2008.

MACHADO-ALLISON, A. Estudio sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio comparado de los juvenis de las cachamas de Venezuela (Géneros *Colossoma* y *Piaractus*). **Acta Biologica Venezuelica**, v. 11, p. 1-101, 1982.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** v. 26, p. 83–99, 1995.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (Overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p. 137-151, 2006.

MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. Haematological alterations of *Leporinus microcephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 640-645, 2004.

MEURER, F.; COSTA, M. M.; BARROS, D. A. D.; OLIVEIRA, S. T. L.; PAIXÃO, P. S. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*,) fingerlings. **Aquaculture Res**, v. 40, p. 603-608, 2009.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAH, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, N. S. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food chemistry**, v. 103, p. 1097-1103, 2007.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents caffeoylquinic acid derivatives exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences**, v. 80, p. 370-377, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirement of fish and shrimp. Washington: National Academic Press, 2011.

NUNES, C. D. S.; MORAES, G.; FABRIZZI, F.; HACKBARTH, A.; ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. Growth and hematology of pacu subjected to sustained swimming and fed different protein levels. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** V. 48, p. 645-650, 2013.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. C. R.; D'ARCEA, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKIC, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, 77, 208–213, 2011.

OLDONI, C. L. T.; OLIVEIRA, C. S.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, A. M.; SADO, Y. R.; MAIA, C. M. F.; ALENCAR, M. S.; LIMA, A. V. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054-2062, 2015.

OLIVEIRA, L. W.; MOURA W. L.; MATUSHIMA, E. R.; EGAMI, M. I. Detecção citoquímica da mieloperoxidase em eosinófilos e mononucleares azurófilos do sangue de *Caiman crocodilus* yacare (Daudin, 1802) Reptilia, Crocodilia). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA PROGRESSO DA CIÊNCIA, v. 49, p. 878, 1997.

OLSSON, J.; QUEVEDO, M.; COLSON, C.; SVANBACK, R. Gut length plasticity in perch: into the bowels of resource polymorphisms. **Biological Journal of the Linnean Society**. v.90, p. 517-523, 2007.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

PALAKSHA, K. J.; SHIN, G.; KIM, Y.; JUNG, T. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p. 479-488, 2008.

PAULSEN, S.M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 14, p. 39- 54, 2003.

PEREIRA-DA-SILVA, M. E.; PEZZATO, E. L.; Respostas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29 (5): p.1273 – 1280, 2000.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** 25: 321-326, 2002.

PEREIRA, F. D. M.; LOPES, M. T. D. R.; CAMARGO, R. C. R. D. E.; VILELA, S. L. DE O. **Produção de mel**. Embrapa Meio-Norte – Sistema de Produção, v.3, 2003.

PLYTYCZ, B.; FLORY, M. G.; GALVAN, I.; BAYNE, J. C. Leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 13, p. 217-224, 1989.

POPOVA, M.; CHEN, N. C.; CHEN, P.; HUANG, C.; BANKOVA, V. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 186-191, 2010.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, A.F.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.77-83, 1999.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, E.A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.S.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Editora Varela, 2004. cap. 4, p. 89-120, 2004.

RANZANI-PAIVA, T. J. M.; PÁDUA, B. S.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, I. M. Métodos para análise hematológica em peixes: Editora UEM, p. 13-135, 2013.

RIGHI, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008.

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; VECINO, J. L. G.; WADSWORTH, S.; SONG, S. K. Use of immunostimulants and nucleotids in aquaculture: a review. **Journal Marine Science Research Development**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2012.

ROCHA, M. R.; LEME-DOS SANTOS, S. H.; VICENTINE, A. C.; CRUZ, C. Structural and ultrastructural characteristics of interrenal gland and chromaffin cell of Matrinxã, *Brycon cephalus* Gunther 1869 (Teleostei - Characidae). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 30, p. 351-355, 2001.

RODRIGUES, A. P. O.; GOMINHO-ROSA, M. D. C.; CARGNIN-FERREIRA, E.; de FRANCISCO, A.; FRACALLOSSI, M. D. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition** v. 18: p.65-72, 2012.

ROED, H. K.; FJALESTAD, K.; LARSEN, J. H.; MIDTHJEL, L. Genetic in haemolytic activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Fish Biology**, v.40, p.739-750, 1992.

RUST, M. B. Nutritional physiology. In: HALVER, J. E. & HARDY, R. **Fish Nutrition**, p. 367-505, 2002.

SADO, Y. R.; BICUDO, A. J. A; CYRINO, P. E. J. Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL – α – tocopheryl acetate). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V. 85, p. 385 – 393, 2013.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SALZE, G.; MCLEAN, E.; SCHWARZ, H. M.; CRAIG, R. S. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, v. 274, p. 148-152, 2008.

SAINT-PAUL, U. Potencial for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v.54, p.205-240, 1986.

SEGVIC – BUBIC, T.; BOBAN, J.; GRUBISIC, L.; TRUMBIC, Z.; RADMAN, M.; PERCIC, M.; COZ- RAKOVAC, R. Effects of propolis enriched diet on growth performance and plasma biochemical parameters of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under acute low temperature stress. **Aquaculture Nutrition**. p.877- 885, 2013.

SEVEN, T. P.; SEVEN, I.; Effect of dietary Turkish propolis as alternative to antibiotic on performance and digestibility in broilers exposed to heat stress. **Journal of Applied Animal Research**, v. 34, p. 193-196, 2008.

SOLEM, S. T.; STENVIK J. Antibody repertoire development in teleosts – a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua*, L. **Developmental Comparative Immunology** v. 30, p.57-76, 2006.

SOLTANI, K. E.; CEREZUELA, R.; CHAREF, N.; MEZAACHE- AICHOUR, S.; ESTEBAN, A. M.; ZERROUG, M. M. Algerian propolis extracts: chemical composition, bactericidal activity and *in vitro* effects on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, 62, p. 57-67, 2017.

TALAS, S. Z.; GULHAN, F. M.; Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1994-1998, 2009.

TAVARES – DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, v.14, p. 254 – 263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; ACHALCH, D.; MARTINS, L. M.; SILVA, D. E.; MORAES, R. F.; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Hobmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 21, p. 337-342, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, L. M.; MORAES, R. F. Relação hepatossômica e esplenossômica em peixes teleosteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 17, n.1, p. 273-281, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of Brazilian Teleosts. VII Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.29, p.109-115, 2003.

TOCIDLOWSKI, M. E.; LEWBART, G. A.; TOSKOPF, M. K. Hematological study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 26, n. 3, 119-125, 1997.

TORT, L.; PADROS, F.; ROTLANT, J.; CRESPO, S. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.37-47, 1998.

URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALLOSSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt. cap. 6, p. 171-193, 2004.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**: Editora ufsm, p. 225-255, 2005.

URBINATI, C. E.; ZANUZZO, S. F. BILLER-TAKAHASHI, D. J. Estresse e Sistema Imune em peixes. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, P. E.J.; URBINATI, C. E. **Biologia e Fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: Fundação de apoio à pesquisa, ensino e extensão (FUNEP), 2014, P. 87-105.

UCZAY, J.; PIANESSO, D.; ADORIAN, J. T.; MOMBACH, I. P.; COLDEBELLA, J.I.; LAZZARI, R. Própolis em dietas para Jundiá (Teleostei, pimelolidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.6, p.1912 – 1918, 2014.

VALLEJOS-VIDAL, E.; REYES-LÓPES, F.; TELES, M.; MACKENZIE, S. The response of fish to immunostimulant. **Fish & Shellfish Immunology**, v.56, p. 34-69, 2016.

VAZZANA, M; CAMMARATA, M.; COOPER, E. L.; PARRINELLO, N. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. **Aquaculture**, v. 210, p. 231-243, 2002.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J. SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.

WELLS, R. M. G.; ASHBY, M. D.; DUNCAN, S. J. McDONALD, J. A. Comparative study of the erythrocytes and haemoglobins in nototheniid fishes from Antarctica. **Journal of Fish Biology**. V. 17, p. 517 – 527, 1980.

WILSON, J. M., CASTRO, L. F. C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish physiology: the multifunctional gut of fish*. Academic Press, p. 1-55, 2010.

WITTEN, E. P.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L.; Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 310-319, 1998.

YONAR, M. E.; YONAR, S. M.; COBRAN, M. Z. EROGIU, M. Antioxidant effect of propolis against exposure to chromium in *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology**, 2011.

YONAR, M. E.; MIS, S.; YONAR, S. S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish & Shellfish Immunology**, 31, 318-325, 2011.

YONAR, E. M.; YONAR, M. S.; URAL, S. M.; SILICI, S.; DUSUKCAN, M. Protective role of propolis in chlorpyrifos – induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2703-2708, 2012.

ZHANG, G. S.; YU, D.; YUAN, H. Propolis and *Herba epimedii* extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, (*Myxocyprinus asiaticus*) **Fish Shellfish Immunology** v. 26, p. 467–472, 2009.

ANEXO A



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
 Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	Própolis na nutrição e alimentação do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)
Área Temática:	Piscicultura
Pesquisador / Professor:	Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado Francielli Baioco Sales
Instituição:	UTFPR/Dois Vizinhos
Versão:	002 - após apresentação de resolução de pendências

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2013-007
Título: Própolis na nutrição e alimentação do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	
Pesquisador/Professor: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado Francielli Baioco Sales	
Área temática: Piscicultura	
Instituição: UTFPR/Dois Vizinhos	
Financiamento: CNPq	
Apresentação do Projeto: O projeto apresenta a proposta de incluir a própolis, um dos produtos da atividade de apicultura e utilizada historicamente devido a suas diversas atividades biológicas, na dieta de peixes <i>Piaractus mesopotamicus</i> , popularmente conhecido no Brasil como pacu. A proposta visa avaliar estes animais quanto aos aspectos imunológicos, de desempenho e incluindo a morfometria intestinal.	
Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação dietética de diferentes níveis do extrato etanólico de própolis (EEP) sobre desempenho, sistema imune e morfologia intestinal do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> .	
Avaliação dos Riscos e Benefícios: - <i>Riscos:</i> O etanol utilizado para a diluição da própolis pode ser tóxico para os peixes. Porém, neste projeto, o extrato	



será incluído na ração e esta ração será, posteriormente, seca em estufa com ventilação de ar a 40°C por 24 horas, este procedimento seria suficiente para volatilização do álcool.

- *Benefícios*: A utilização de um produto natural diminui os riscos de contaminação ambiental, e a modulação do sistema imunológico destes animais justificam a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:

- O projeto está adequado ao que se propõe, qual seja, diminuir o estresse dos animais, buscar alternativas para modular o sistema imunológico e/ou reduzir perdas econômicas, utilizando produtos naturais.

- A utilização de Eugenol diluída em água na dosagem 75 mg/L e 100 mg/L é aceita, respectivamente, para sedação e eutanásia de peixes. O uso de anestésicos por imersão em peixes é considerada análoga à anestesia inalatória em outros animais, sendo a metodologia aceita para estes fins pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, de acordo com a Resolução 714, de 20 de junho de 2002.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Há uma incoerência sobre o pesquisador responsável, uma vez que todos os memorandos e declarações estão preenchidos e assinados pelo professor Dr. Ricardo Yuji Sado, enquanto o formulário não o contempla como responsável ou participante, mas ainda assim, está assinado por ele como coordenador/orientador.

- Apesar da afirmativa de que este projeto tem financiamento pelo CNPq, o pesquisador não apresentou documentos que comprovem, ou a anuência da DIRPPG.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- As pendências têm relação com a documentação: preenchimento correto do formulário e apresentação de anuência da DIRPPG ou aprovação em órgão de fomento.

- O pesquisador deve definir quem realmente será o responsável pelo projeto, ficando atento para o item 4 do formulário unificado: "Pesquisadores (quando se tratar de projeto de pós-graduação o responsável será o orientador)"

- Apresentar o registro do projeto na DIRPPG ou o protocolo de aprovação do CNPq.

Situação do Parecer:

APROVADO.

Considerações Finais a Critério da CEUA:

Considerando que as observações apresentadas no escopo deste documento foram corrigidas/adequadas, somos favoráveis a aprovação do presente projeto.

O presente projeto, seguiu nesta data para adequação pelo pesquisador responsável e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela CEUA.

Dois Vizinhos, 11 de fevereiro de 2014.

Assinado por:
Patricia Franchi de Freitas