



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL

CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

MICHELI BECKER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE E METABÓLICO DO
EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS EM JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Quoy
& Gaimard, 1824).**

LARANJEIRAS DO SUL

2015

MICHELI BECKER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE E METABÓLICO DO
EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS EM JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Quoy
& Gaimard, 1824).**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia de Aquicultura da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Luisa Helena Cazarolli

Laranjeiras do Sul -PR

2015

DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Becker, Micheli

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE E METABÓLICO DO EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS EM JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). / Micheli Becker. -- 2015. 58 f. : il.

Orientador: Luisa Helena Cazarolli.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de , Laranjeiras do Sul, PR, 2015.

1. extrato hidroalcoólico de geoprópolis. 2. efeito imunoestimulante e metabólico . 3. Jundiá . I. Cazarolli, Luisa Helena, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MICHELI BECKER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOESTIMULANTE E METABÓLICO DO
EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS EM JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Quoy
& Gaimard, 1824).**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Luisa Helena Cazarolli

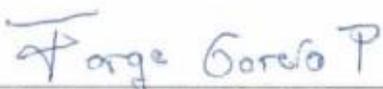
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

11 / 12 / 2015

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a: Luisa Helena Cazarolli – UFFS



Prof. Dr. Jorge Erick Garcia Parra – UFFS



Prof.^a. Dr.^a. Silvia Romão – UFFS

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial a duas pessoas que sempre torceram muito por mim, mas não se encontram mais entre nós, amados Avós.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar aqui.

A toda minha família pelo incentivo, cobrança e carinho.

A minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Luisa Helena Cazarolli. Obrigada pela orientação, apoio, incentivo, dedicação, paciência, amizade, broncas e pela grande confiança.

A professora Silvia Romão pelo acompanhamento e ensinamentos, principalmente na área de hematologia.

Ao professor Thiago Bergler Bittencourt pelo auxílio na extração do própolis e preparação do mesmo.

Ao Técnico Frank Belettini pela ajuda durante o decorrer do experimento e pela amizade.

As acadêmicas Samara, Patrícia, Juliana, Maria Alice pela ajuda durante o decorrer do experimento.

Aos acadêmicos Lucas Fabricio, Richilheu, Lucas, Allison Luiz e Edimar Tenutti, pelo auxílio para a montagem do experimento, coleta e nas dúvidas que apareceram.

A todos os professores que participaram da minha vida acadêmica, muito obrigada pelos ensinamentos, profissionalismo e dedicação.

Aos meus amigos da Universidade, muito obrigada pela troca de conhecimento, pelo auxílio todas as vezes que necessitei.

Agradeço às minhas amigas e amigos pelo apoio e incentivo nesses dias difíceis.

“Ninguém é bom ou excelente apenas sozinho: há sempre um referencial, um suporte, uma estrutura, que incentiva e impulsiona para a realização.”

Guimarães Rosa

RESUMO

A produção de espécies nativas no Brasil vem ganhando importância no cenário da aquicultura e o Jundiá (*Rhamdia quelen*) é considerado uma das espécies de peixes nativos com grande potencial para o cultivo intensivo. No entanto, a intensificação do cultivo comercial para o Jundiá pode oferecer condições propícias à introdução e disseminação de enfermidades com conseqüente prejuízo para o produtor. Com isso, surge a necessidade de alternativas para o controle de enfermidades e a busca de soluções direcionadas à prevenção e/ou à diminuição do risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias nas populações de peixes saudáveis. Diversos compostos derivados de plantas e animais têm sido empregados na prevenção de enfermidades em peixes sendo que uma das alternativas é a suplementação destes compostos nas rações. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial efeito da suplementação de diferentes concentrações do extrato de geoprópolis sobre variáveis hematológicas, imunológicas e metabólicas na fase juvenil do Jundiá (*Rhamdia quelen*). Após aclimação, os animais foram distribuídos em aquários de 56 L em sistema de circulação fechado e divididos em três tratamentos: controle, ração suplementada com extrato de geoprópolis nas concentrações 0,5% e 2% e alimentados por um período de 18 dias. Ao final do período experimental os peixes foram anestesiados para a coleta de sangue para avaliação das variáveis hematológicas, imunes e metabólicas e posteriormente eutanasiados. Os extratos de geoprópolis nas concentrações de 0,5% e 2% influenciaram no metabolismo da glicose e das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) dos animais durante o período de estudo. Além disso, os extratos de geoprópolis promoveram alterações nas variáveis eritrocitárias que diferiram dependendo da concentração utilizada indicando possíveis efeitos tóxicos das concentrações de geoprópolis utilizadas neste estudo e/ou tentativa de adaptação fisiológica frente ao geoprópolis. Por outro lado, os extratos de geoprópolis não apresentaram influência nas células de defesa nem no crescimento dos animais e também não interferiram nos parâmetros de qualidade da água mensurados no período de tempo estudado. Logo, os resultados mostraram que o geoprópolis deve ser melhor estudado em diferentes concentrações e tempos para garantir a segurança e eficácia do extrato de geoprópolis como imunostimulante para jundiá (*R. quelen*).

Palavras-chave: Jundiá. Imunostimulantes. Geoprópolis.

ABSTRACT

The production of native species in Brazil has been gaining importance in aquaculture scenario and Jundiá (*Rhamdia quelen*) is considered one of the native fish species with great potential for intensive cultivation. However, the intensification of intensive cultivation of Jundiá can provide conditions for the introduction and spreading of diseases with consequent financial losses to the producer. Thus, this condition arises the need for alternatives to control the diseases and the search for solutions to prevent and / or reduce the risk of transmission of infectious and parasitic diseases in populations of healthy fishes. Several compounds derived from plants and animals have been used in the prevention of diseases in fish and an alternative is to supplement the diets with these compounds. Taking this into account, the aim of this study was to investigate the potential effect of supplementation of different concentrations of geopropolis extract on hematological, immunological and metabolic variables in juvenile phase of Jundiá (*R. quelen*). After acclimation, animals were distributed into tanks of 56 L of a closed recirculating system divided into three treatments: control diet, diet supplemented with 0.5% and 2% geopropolis extract concentrations and fed over a period of 18 days. At the end of the experiment, the fish were anesthetized for blood collection for the evaluation of hematological, immune and metabolic variables and later euthanized. The 0.5% and 2% geopropolis extracts concentrations influenced the glucose metabolism and the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of the animals during the study period. Furthermore, the geopropolis extracts showed a dose dependent effect on the hematological parameters suggesting a potential toxic effect and/or a physiological adaptation to the geopropolis extract. On the other hand, the extracts supplementation influenced neither the defense cells nor the animals' growth in the period studied. Also, it did not influence the water quality parameters measured during the present study. Based on that, longer studies with different geopropolis concentrations are mandatory in order to verify and guarantee the effectiveness and safety of the geopropolis as an immunostimulant for jundiás juveniles (*R. quelen*).

Keywords: Silver Cat Fish. Immunostimulant. Propolis. *Rhamdia quelen*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamentos e reagentes utilizados para mensuração de parâmetros de qualidade de água. A) Sonda multiparâmetros; B) Oxímetro digital AT 160; C) Kit colorimétrico comercial para análise de amônia Alfakit	30
Figura 2 - Sistema fechado de recirculação, onde ocorreu o experimento.....	34
Figura 3 - Parâmetros de qualidade de água na maturação do biofiltro.	35
Figura 4 – Equação da reta de crescimento de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração durante 18 dias de suplementação (A). Ganho de peso em (%) de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração durante 18 dias de suplementação (B). Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis); Peso Inicial (PI), Peso Final (PF).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis de qualidade de água (média ± desvio padrão) durante os 18 dias de tratamento com extrato de geoprópolis na ração.....	36
Tabela 2 – Dados da bimometria inicial e final do <i>R. quelen</i> submetidos a dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.	37
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos analisados AST e ALT.....	39
Tabela 4 - Concentração de glicose sanguínea de jundiás submetidos à dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.	41
Tabela 5 - Conteúdo de nitrito/nitrato (μM) de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração.	42
Tabela 6 - Variáveis eritrocitárias em <i>R. quelen</i> submetidos à dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.	43

LISTA DE SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

NO: Oxido Nítrico

OD: Oxigênio Dissolvido

VCM: Volume Corpuscular Médio

CHM: Hemoglobina Corpuscular Media

CHCM: Concentração Hemoglobina Corpuscular Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3	OBJETIVO GERAL	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	MONTAGEM DO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO.....	28
4.1.1	Instalações	28
4.1.2	Animais	29
4.1.3	Profilaxia e Aclimação	29
4.1.4	Delineamento experimental	29
4.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS	30
4.3	DIETAS EXPERIMENTAIS	31
4.4	COLETA DE SANGUE E PREPARO DE SORO	31
4.5	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO	32
4.6	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS.....	33
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	MATURAÇÃO DO BIOFILTRO	34
5.2	PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA DURANTE O EXPERIMENTO	36
5.3	CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA	37
5.4	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	39
5.5	PARÂMETRO IMUNE	42
5.6	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	43
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A demanda por proteína animal, em especial por pescados, vem aumentando de forma expressiva no Brasil e no mundo em decorrência do aumento populacional e da busca por alimentos mais saudáveis (FAO, 2010). Diante das limitações de expansão da pesca, a aquicultura torna-se uma alternativa importante para suprir essa demanda e vem aumentando bastante sua participação no total de produção de pescados no mundo. O Brasil apresenta grande potencial produtivo no setor da aquicultura principalmente devido às condições naturais existentes como a abundância de recursos hídricos, o clima predominantemente tropical e a diversidade de espécies com potencial para o cultivo (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011). Em 2011 a aquicultura cresceu 31,2% em relação ao ano anterior, chegando a um total de 628.700 toneladas produzidas, sendo que a maior parte da produção aquícola (86,6%) foi realizada no continente e o restante no litoral Ministério da Pesca e Aquicultura (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011).

A produção de espécies nativas no Brasil vem ganhando importância no cenário da aquicultura uma vez que representa uma alternativa racional, de grande valor econômico e ecológico. Em função disto, o Jundiá (*Rhamdia quelen*) é considerado uma das espécies de peixes nativos com grande potencial para o cultivo intensivo especialmente devido às suas características como resistência ao manejo, crescimento acelerado, inclusive no inverno, eficiência alimentar e, sobretudo, por apresentar uma carne saborosa, sem espinhos intramusculares, além de apresentar boa aceitação pelo mercado consumidor.

No entanto, apesar de ser considerada uma espécie nativa promissora para a piscicultura, a intensificação do cultivo comercial para o Jundiá pode oferecer condições propícias à introdução e disseminação de enfermidades com consequente prejuízo para o produtor. Durante o processo de cultivo, os peixes são constantemente submetidos a diferentes procedimentos de manejo e variações ambientais, que alteram o equilíbrio orgânico e podem levar à alterações em seu metabolismo e consequentemente, comprometem sua imunidade. Sabe-se que alterações no sistema imune de peixes provocadas por agentes externos estão diretamente associadas à significativa redução na sua resistência à doenças.

Com o desenvolvimento dos cultivos intensivos e conseqüente aumento da produção, surge a necessidade de alternativas para o controle de enfermidades, uma vez que o uso dos modelos de intervenção terapêutica atuais na prática da piscicultura muitas vezes apresenta dificuldades na sua execução. Em ambientes aquáticos, o uso de drogas terapêuticas pode ocasionar grande impacto associado a resíduos químicos na água bem como a seleção de organismos resistentes (como bactérias, vírus ou parasitas). Com isso, existe um crescente interesse na busca de soluções direcionadas à prevenção e/ou à redução do risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias nas populações de peixes saudáveis. Neste sentido, diversos compostos derivados de plantas e animais têm sido empregados na prevenção de enfermidades em peixes sendo que uma das alternativas é a suplementação destes compostos nas rações. São várias as fontes fitoterápicas existentes e que merecem ser estudadas devido aos seus efeitos benéficos já conhecidos, e uma delas é a própolis.

A própolis apresenta uma composição química bastante complexa e diversas propriedades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoário, anestésico local, antiinflamatória, imunoestimulante e imunomoduladora têm sido associadas à sua utilização (LUSTOSA et al., 2008). Embora haja evidências dos benefícios do uso da própolis na aquicultura, atualmente existem poucos estudos acerca dos efeitos da própolis em espécies nativas como o Jundiá. Diante disto, as investigações relativas ao efeito de fitoterápicos, em especial os efeitos da própolis como imunoestimulante em juvenis de Jundiá, representa uma alternativa para a substituição do uso de antibióticos e quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas e/ou parasitárias, melhorando a condição de saúde dos peixes e reduzindo os potenciais danos ao meio ambiente e ao consumidor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A piscicultura é uma atividade que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano, sendo uma das atividades que mais tem crescido em todo o mundo. O Brasil se insere no contexto mundial como um país com grande potencial para essa atividade, já que possui um vasto território e suas condições climáticas favorecem a piscicultura além de apresentar grande diversidade de espécies com potencial para cultivo. Seguindo esta tendência, observa-se a intensificação cada vez maior dos sistemas de produção de peixes praticados no Brasil além de uma crescente preocupação com a sustentabilidade destes cultivos bem como da necessidade de avaliação dos riscos a que estão submetidos os organismos cultivados (FAO, 2010; QUEIROZ et al., 2005).

O sistema intensivo é o sistema de cultivo em que os fatores de produção são controlados pelo homem, caracterizando-se por apresentar densidade populacional elevada de peixes por volume d'água, alimentação artificial exclusivamente à base de rações balanceadas, necessidade de alto fluxo de água ou uma recirculação forçada por causa da alta densidade populacional. Ainda, apresenta custo elevado de implantação e manutenção, demandando de mão-de-obra especializada e alto nível de mecanização e tecnologia (MOREIRA, 2001).

Na aquicultura hoje existem diversos tipos de sistemas intensivos de cultivos como por exemplo o uso de viveiros escavados com aeração constante. Um outro exemplo são os sistemas em tanques-rede com o uso de gaiolas, onde os peixes são mantidos em uma alta densidade submersos dentro do braço do rio ou reservatório. Neste sistema, a densidade de estocagem é determinada pela capacidade de suporte do local de implantação que é calculada levando-se em conta a qualidade da água e a força da correnteza, que deve ser capaz de passar pelos tanques-rede e levar todos os efluentes do cultivo, sobras de ração além de oxigenar os tanques-rede. O sistema de produção em tanques *raceways*, também se caracteriza como um sistema intensivo de cultivo, pois *raceways* é o nome dado aos tanques de alto fluxo de água, que podem ser circulares, retangulares ou octogonais, sendo construídos em terrenos com declividade, e com abundância de água fria e de boa qualidade, variando de acordo com as necessidades da espécie cultivada e da fase de cultivo. Este sistema

apresenta maior custo de implantação, e normalmente é empregado para espécies com alto valor agregado como a trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Já o sistema Bioflocos é um sistema intensivo inovador e caracteriza-se pela troca zero de água pois a água do cultivo é utilizada como meio para o desenvolvimento de bactérias heterotróficas. Estas bactérias transformam compostos orgânicos (ricos em carbono) oriundos de produtos adicionados como melaço de cana além de nitrogênio oriundo dos efluentes liberados pelos organismos cultivados em uma massa bacteriana, os flocos bacterianos, que servem como alimento para as espécies cultivadas, essencialmente filtradoras, dispensando a necessidade de ração. Por outro lado, este sistema é altamente dependente de aeração constante para manter o nível de oxigênio para os animais cultivados e as bactérias heterotróficas além de manter os flocos em suspensão permitindo a filtração dos mesmos, caracterizando esse sistema como um sistema de alto risco (AVNIMELECH, 1999; KUBITZA, 2007; KUBITZA, 2009; YIN-HAN; RICHARD, 2008).

Outro sistema intensivo de cultivo é o sistema fechado de recirculação, porém atualmente vem sendo empregado principalmente em nível de pesquisa, devido ao fato da tecnologia disponível no momento não ser facilmente acessível e economicamente viável. O sistema empregado nesse trabalho é um sistema de recirculação descrito por Kubitza (2006), como sistema com uma única linha de tratamento, pois após a água passar pelos tanques de produção ela segue para o tratamento em filtros mecânico e biológico, retornando ao sistema por bombeamento. A única água nova que entra é aquela para repor a que se perde por evaporação. Essas perdas devem ser em torno de 5% do volume total do sistema por dia, variando de 2 a 10%.

Como externalidades negativas do sistema fechado de recirculação temos um grande aporte de efluentes (grandes quantidades de sólidos orgânicos em suspensão, dióxido de carbono, amônia, fosfato e outros compostos) sendo produzidos e liberados diariamente na água do cultivo (BRAZ FILHO, 2014). Durante o cultivo os animais são mantidos em alta densidade de estocagem, somado ao manejo inerente aos sistemas intensivos de produção (manipulação, reprodução artificial, transporte, biometrias, etc.), que causam consequências deletérias ao seu sistema imunológico, tornando o organismo cultivado mais propenso e suscetíveis a patógenos. Surtos epizooticos podem ocorrer caso haja um gatilho, como mudança brusca de temperatura ou diminuição drástica do nível de oxigênio no meio podendo gerar grande mortalidade

e acarretando grandes prejuízos ao produtor (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000; OZÓRIO; AVNIMELECH; CASTAGNOLLI, 2004).

A intervenção terapêutica na prática da piscicultura como forma de tratamento a enfermidades muitas vezes torna-se uma tarefa difícil de ser executada. Na maioria das vezes, as substâncias disponíveis para uso têm efeitos tóxicos, agridem o meio ambiente, além de gerar gastos. Em ambientes aquáticos, o uso de drogas terapêuticas pode ocasionar grande impacto sendo associado à resíduos químicos na água bem como à seleção de microrganismos resistentes (FIGUEIREDO; LOPES; LEAL, 2008).

Com a crescente conscientização da necessidade de adoção de técnicas adequadas para produção de alimento para consumo humano muito se tem falado na adoção das Boas Práticas de Manejo (BPMs) em sistemas de produção aquícola. Dentre as orientações de Boas Práticas, uma delas consiste na redução ou não utilização de quimioterápicos durante o ciclo de produção aumentando o interesse e a necessidade de estudos de novas formas de tratamento ou controle de doenças (BOYDE; QUEIROZ, 2004). A substituição dos tratamentos convencionais disponíveis em favor da utilização de substâncias capazes de modular o sistema imune dos peixes, aumentando sua resistência aos agentes patogênicos através do estímulo de seu sistema imunológico, apresenta-se como uma alternativa segura ao uso dos quimioterápicos em piscicultura interior (MAQSOOD et al., 2011).

O *Rhamdia quelen*, ou Jundiá, é uma espécie que está amplamente distribuída nas Américas e seu cultivo vem aumentando significativamente na região Sul do Brasil por apresentar boas características zootécnicas e boa aceitação no mercado consumidor. Além disso, a espécie apresenta crescimento rápido, tolerância a baixas temperaturas, resistência ao manejo e facilidade de adaptação alimentar (GOMES et. al, 2000; BALDISSEROTTO, 2004; AMARAL-JUNIOR, 2013; PETERSEN, 2013).

A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita, mas segundo Bockmann, Guauzzilli, (apud BALDISSEROTTO et al., 2010 p. 302) o gênero *Rhamdia* é pertencente à Classe *Actinopterygii*, Ordem *Siluriformes*, Família *Heptapteridae*. A Família *Heptapteridae* (hepta, sete + pteros, nadadeira) inclui bagres de pequeno a médio porte, de corpo longo afinado e achatado dorsoventralmente, olhos dorsais, barbilhões bem desenvolvidos um deles ultrapassando a nadadeira dorsal, nadadeiras peitorais largas e pedúnculo caudal comprimido. O nome científico deriva do indígena nhamdia, jamdia, bagre. A cabeça é achatada, os ossos da

superfície superior do crânio são cobertos com pele fina, maxila superior um pouco mais longa que a inferior. O corpo tem coloração cinza esverdeado com uma série de pequenas pintas distribuídas irregularmente (NUNES, 2012).

Adultos de *R. quelen* são onívoros, com uma tendência à piscívoros (GUEDES, 1980; MEURER, ZANIBONI FILHO, 1997). Essa característica contribui para sua adaptação ao alimento artificial, e assim, para sua domesticação. Além disso, os alevinos apresentam resistência à alterações nas condições salinas e de dureza da água bem como modificações de pH no ambiente (MARCHIORO, 1997; LOPES, 1998). Ainda, esta espécie pode ser considerada euritérmica, tolerando amplas faixas de temperatura e apresentando melhor crescimento em temperaturas mais elevadas (CHIPPARI GOMES, 1998).

Devido a essas características, a espécie vem sendo cada vez mais produzida de forma intensiva e muitas vezes sob condições extremamente estressantes que podem causar distúrbios em seu estado fisiológico levando à redução do ganho de peso e crescimento, desempenho na reprodução e resistência a patógenos predispondo à doenças bacterianas e parasitárias oportunistas (URBINATI; CARNEIRO, 2004; BALDISSEROTTO et al., 2010). Diversas espécies de organismos patogênicos, como bactérias e parasitas, já foram identificados como causadores de doenças em Jundiás (BRANDÃO, 1977; SHAMA, 1997). Sendo assim, é de grande importância a adoção de técnicas e métodos que venham a aumentar a resistência do peixe às doenças e sua capacidade de resposta às situações estressantes, através da modulação de seu sistema imune.

Imunoestimulantes são substâncias químicas, sintéticas ou naturais, capazes de aumentar a resistência de um animal à doenças, atuando no sistema imune dos mesmos. Segundo a definição de Anderson (1992) um imunoestimulante pode ser uma substância química, um estressor ou uma ação que aumenta os mecanismos de defesa não específicos, bem como as respostas específicas da imunidade adquirida. Sendo assim, o uso de imunoestimulantes é um meio efetivo de aumentar a imunocompetência e resistência a infecções causadas por vírus, fungos, bactérias e parasitas (SAKAI, 1999; BRICKNELL; DALMO, 2005).

Grande atenção vem sendo dada a essas substâncias e sua utilização na aquicultura (REVERTER et al., 2014). O manejo intenso a que são submetidos os peixes em sistemas intensivos de produção rompe seu equilíbrio homeostático, principalmente seu sistema imune (BARCELLOS; SOUZA; WOEHL, 2000)

aumentando sua susceptibilidade à enfermidades (PAVANELLI et al., 2008). Neste contexto, os imunostimulantes podem ser ferramentas importantes na aquicultura quando utilizados de modo profilático e durante determinadas fases de desenvolvimento dos peixes quando são mais susceptíveis à agentes infecciosos. No entanto, seu uso deve ser realizado com cautela, já que ainda são necessários estudos no que diz respeito ao seu mecanismo de ação, à forma, tempo e concentração administrada, além da necessidade de considerar o estágio de desenvolvimento do animal (BRICKNELL; DALMO, 2005).

São muitas as fontes em potencial para a produção de imunostimulantes a serem estudadas e utilizadas na aquicultura. Sakai (1999) divide os imunostimulantes em grupos dependendo de suas fontes: bacteriano, derivados de algas, nutrientes, aditivos dietéticos, hormônios e citocinas. Ainda, plantas medicinais e/ou produtos derivados de animais podem ser utilizados como imunostimulantes uma vez que já existem relatos de sua utilização como quimioterápicos e aditivos para a alimentação animal (CHANG, 2000). Dentre as diversas opções disponíveis, a própolis merece destaque.

A Própolis é um termo genérico usado para denominar o material resinoso e balsâmico coletado e processado pelas abelhas melíferas a partir de fontes vegetais, aos quais se juntam secreções salivares, cera e ácidos graxos insaturados que modificam quimicamente e potencializam as propriedades terapêuticas das resinas vegetais (BANKOVA, 1998). A composição química da própolis é complexa e variada e está relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas bem como com o período e a técnica de coleta da resina e também com a espécie da abelha (LUSTOSA et al., 2008).

Dentre as diversas espécies de abelhas melíferas existentes nas regiões tropicais e subtropicais no Brasil, as abelhas pertencentes à tribo Meliponini (Família: *Apidae*, Subfamília: *Apinae*) compreendem as abelhas sem ferrão, distribuídas ao longo da costa brasileira, desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul (MICHENER, 2007). Existem duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep. que são conhecidas popularmente como amanaçai, amanaçaia, manaçaia e mandaçaia-grande. A subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep. é encontrada principalmente em regiões mais altas

e frias, se distribuindo a partir do Sul de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (MOURE, 1975).

Nesta espécie de abelha a produção da própolis envolve além das resinas de plantas e secreções das abelhas também a inclusão de cera e terra, razão pela qual se denomina de geoprópolis (NOGUEIRA-NETO, 1997). Bankova et al. (1998) identificou mais de 50 compostos na geoprópolis de abelhas sem ferrão brasileiras, principalmente terpenóides e compostos fenólicos. Até o momento existem poucos estudos na literatura a respeito da atividade biológica da geoprópolis no entanto, a ampla ocorrência de espécies de amanaçaias na região sul do Brasil faz com que a geoprópolis apresente grande potencial para futuros estudos quanto à sua composição e efeitos à saúde humana e animal.

Devido à sua composição bastante diversificada, a própolis apresenta diferentes propriedades biológicas e farmacológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória (BURDOCK, 1998; SFORCIN, 2007; LUSTOSA et al., 2008). Em função disto, vem aumentando o interesse na utilização da própolis como agente imunoestimulante e promotor de crescimento na área zootécnica, em especial, no cultivo comercial de peixes (SFORCIN, 2007; TALAS, GULHAN, 2009; DOTTA et al., 2014; DENG et al., 2011; BAE et al., 2011).

A própolis foi escolhida para este trabalho devido às diversas propriedades biológicas já citadas anteriormente e também devido à ampla distribuição da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, na região centro-oeste do Paraná. Ainda, pelo fácil preparo do extrato alcoólico da própolis, podendo este ser preparado e empregado pelos piscicultores como agente imunoestimulante e preventivo antes de manejos como a biometria ou antes do inverno.

Para garantir o sucesso da produção de organismos aquáticos é essencial que seja garantido aos animais as melhores condições de cultivo possíveis, objetivando o pleno desenvolvimento do animal. De maneira geral, todos os organismos vivos, em especial os peixes, sempre buscam a homeostase corporal, com os sistemas metabólico, hematológico e imune funcionando em harmonia protegendo os peixes de estresses ambientais e injúrias externas e permitindo respostas e crescimento adequados. Neste sentido, estudos sobre a fisiologia, a bioquímica e a homeostase

corporal dos animais em sistemas de cultivo pode contribuir eficazmente para a melhora da qualidade do pescado produzido.

A hematologia estuda as células do sangue bem como as alterações dos padrões e os distúrbios morfológicos das células do sangue. O sangue é um tecido conjuntivo que apresenta grande quantidade de substâncias na matriz intercelular, o plasma, e desempenha a função de distribuir calor, transportar os gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo. A composição, proporção e quantidade dos elementos padrão no sangue estão diretamente relacionados ao estado funcional do peixe. (RANZANI-PAIVA, 2013, TAVARES-DIAS et al., 2009).

As células sanguíneas podem ser divididas em três classes: eritrócitos (hemácias) com pigmentação vermelha e função de transporte de O₂ e CO₂ pelo grupamento heme da proteína hemoglobina; Leucócitos (glóbulos brancos) com função de defesa celular; Trombócitos (plaquetas) que são as células responsáveis pela coagulação sanguínea e também possuem atividade fagocítica (TAVARES-DIAS et al., 2009; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

As células sanguíneas desempenham um papel importante no sistema de defesa, logo os órgãos onde ocorre o processo de formação e desenvolvimento das células sanguíneas (hematopoese) são considerados órgãos do sistema imune. Esses órgãos são baço, rins e em menor extensão áreas peri-portais do fígado, submucosa do intestino e timo (AGIUS; ROBERTS, 2003; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). O baço desempenha funções de formação de células de defesa, filtração de antígenos e de hemácias envelhecidas (hemocaterese). O estroma do baço é dividido basicamente em duas regiões sendo que na primeira se encontram as células linfóides (responsável pela maturação dos linfócitos), e na segunda região ficam concentradas as hemácias e trombócitos (MACIEL, 2016). Além do baço, os rins, órgãos filtradores, também desempenham funções importantes no processo de hematopoese pois estão envolvidos na formação e maturação de hemácias e das células de defesa além de exercer função endócrina e imunológica atuando na produção de anticorpos e catecolaminas (CUNNINGHAM, GUANABARA; 2004).

Nos peixes teleósteos os tecidos envolvidos na hematopoese, baço fígado e rim, apresentam centro melanomacrófagos, que são aglomerados celulares formados por células reticulares e agregados de macrófagos e linfócitos que desempenham função de filtrar agentes patogênicos como bactérias e vírus, captura e apresentação de antígenos, memória imune, fagocitose e hemocaterese (CAMPOS, DEMORAES, DE MORAES; 2008).

Segundo Iwana e Nakanishi (1996), os peixes possuem um sistema imune bastante complexo, composto pelo sistema imune inato, que é próprio do animal, e sistema imune adaptativo ou adquirido, que é formado durante as diferentes exposições à patógenos no decorrer de sua vida.

O sistema imune inato é considerado a primeira barreira de defesa frente aos patógenos (bactérias, vírus, fungos e parasitas) e consiste de barreiras físicas (escamas, muco, brânquias e epiderme) além de células de defesa inespecíficas, os leucócitos (TIZARD, 2008).

Os leucócitos são as células de defesa do organismo, sendo que este grupo é constituído por linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Estas células utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúrias teciduais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008). Os neutrófilos são os leucócitos mais importantes no sangue periférico devido à capacidade fagocítica e apresentam elevada sensibilidade à modificações ambientais. Os monócitos são as maiores células do sangue periférico e quando migram para o foco lesional (tecidos) se diferenciam em macrófagos. Eles atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre fagocitose. Ainda, os eosinófilos são células que intervêm nos processos de inflamação e na defesa celular relacionada à infestação por parasitas. Semelhante aos eosinófilos, os basófilos também se apresentam em pequena quantidade na circulação sanguínea. A função dos basófilos de peixes não está definida e parece estar ligada a processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

A fagocitose representa um importante mecanismo de defesa não específica contra agentes patogênicos que ultrapassam as barreiras superficiais de defesa sendo que os leucócitos são as células promotoras deste mecanismo tanto no sangue quanto nos tecidos. Durante o processo de fagocitose, quando o patógeno é englobado ocorre a formação de vesículas intracelulares chamadas de fagossomos. Estes

fagossomos se unem aos lisossomos intracelulares formando os vacúolos digestivos. Os lisossomos são organelas citoplasmáticas que possuem diversas enzimas hidrolíticas e são responsáveis pela digestão intracelular. Nos vacúolos digestivos o pH é mais baixo o que permite a ativação das enzimas hidrolíticas que vão digerir o antígeno. Dentre as enzimas hidrolíticas encontramos a lisozima que atua quebrando a parede celular de peptidoglicanos das bactérias gram positivas. Além disso, ocorre um aumento na produção de radicais livres como o superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e óxido nítrico (NO). O NO como radical livre reage com o ânion superóxido e forma peroxinitrito um potente oxidante que pode destruir os microrganismos invasores. A produção de NO por macrófagos de peixe é mediada por pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SECOMBES, 2001). Em presença de oxigênio e oxihemoglobina este radical é rapidamente degradado (meia-vida extremamente curta, de 4 a 6 segundos no plasma) produzindo nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) que são utilizados como marcadores para a determinação da produção de NO e da resposta imune (ASL et al., 2008).

O sistema imune adaptativo ou adquirido é formado durante as diferentes exposições à patógenos no decorrer da vida do animal, é específico e possui memória. É baseado no reconhecimento de substâncias orgânicas estranhas ao corpo, os antígenos, que podem ser proteínas, açúcares ou lipídios, normalmente partes da parede celular do patógeno.

As respostas imunes adaptativas são conduzidas principalmente pelas atividades dos linfócitos T e B, pois os mesmos são capazes de realizar o reconhecimento celular, diferenciando os componentes próprios do organismo dos impróprios (FIGUEIREDO et al., 2008). Os linfócitos são as células mais numerosas na circulação sanguínea, sendo responsáveis por duas respostas, a humoral e a celular. A resposta imune celular é realizada principalmente pelos linfócitos T, em especial o linfócito T citotóxico que leva a apoptose células infectadas por vírus ou bactérias. Já a resposta imune humoral é mediada pelos linfócitos B, que são responsáveis pela produção dos anticorpos sanguíneos. Quando estas células são ativadas por antígenos, proliferam e se diferenciam em plasmócitos (células produtoras de anticorpos). No entanto, alguns linfócitos B não se diferenciam em plasmócitos, dando origem às células B da memória imunitária, que reagem rapidamente a uma segunda exposição ao mesmo antígeno (SECOMBES, 1996).

Em relação ao sistema imune adaptativo ou adquirido os peixes teleósteos assim como os mamíferos apresentam resposta imune primária quando são expostos pela primeira vez ao patógeno, que é mais lenta e envolve a formação inicial de anticorpos e células de memória para o antígeno específico, e a resposta imune secundária quando ocorre a segunda exposição ao mesmo patógeno, sendo esta mais rápida devido às células de memória pré-existentes e a formação de anticorpos que irão agir diretamente sobre o patógeno.

A condição metabólica e nutricional é um fator extremamente importante na resistência orgânica e resposta imune nos animais. Em termos de regulação do metabolismo de carboidratos em peixes o conjunto de respostas é bastante variável e influenciado por diversos fatores. A ação de hormônios como a insulina e o glucagon são essenciais para a manutenção da homeostasia corporal (RAW, 2006; LEHNINGER, 2011). Na presença de insulina os tecidos são estimulados a utilizar a glicose como fonte de energia e armazená-la na forma de glicogênio. Na presença de glucagon e/ou dos hormônios contrarregulatórios como cortisol, adrenalina e hormônio do crescimento, o organismo é direcionado à ativação das vias de gliconeogênese e glicogenólise para manutenção das concentrações de glicose sanguínea (LEHNINGER, 2011). Em situações de estresse, quando o peixe é exposto a um agente estressor (químico, físico ou biológico) ocorre a liberação do hormônio cortisol no sangue que estimula os tecidos a liberar maior quantidade de glicose para a corrente sanguínea (hiperglicemia), preparando o animal para uma resposta de defesa (TAVARES-DIAS et al., 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2001; BARCELLOS et al., 2001). Diante disto, as concentrações de glicose plasmática são consideradas bons marcadores metabólicos e têm sido bastante utilizadas como indicador do estado fisiológico e de estresse em peixes teleósteos MCELROY, et al., 2015; MARTINS, et al., 2004). Mommsen et al (1999) afirmam que além de promover hiperglicemia, o cortisol também é responsável por estimular a proteólise em peixes, relacionada ao fornecimento de aminoácidos para a manutenção da gliconeogênese em períodos de estresse.

Em relação ao metabolismo de proteínas e aminoácidos, as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são consideradas as enzimas mais importantes e desempenham papel essencial tanto na degradação quanto na síntese de aminoácidos. A atividade destas enzimas responde às variações nas concentrações sanguíneas dos hormônios metabólicos como insulina, glucagon,

cortisol e adrenalina bem como à disponibilidade de nutrientes e necessidades das células. Estas enzimas apresentam ampla distribuição tecidual e além disso, são muito utilizadas como marcadores de lesão ou toxicidade celular. A ALT é encontrada em maiores concentrações no citosol das células hepáticas e renais enquanto a AST está presente no citosol e mitocôndrias de células hepáticas, nos eritrócitos e células musculares esqueléticas e cardíacas (DÍAZ GONZÁLES, DA SILVA, 2006; LEHNINGER, 2011). Assim como a glicemia, a avaliação da atividade das enzimas AST e ALT vem sendo muito utilizada como marcador metabólico, de estresse e de toxicidade para o acompanhamento da saúde dos peixes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de diferentes concentrações do extrato de geoprópolis sobre parâmetros hematológicos, imunológicos e metabólicos na fase de juvenil do Jundiá (*Rhamdia quelen*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a melhor concentração do extrato de geoprópolis como imunoestimulante para suplementação da ração para Jundiás na fase de juvenil.
- b) Avaliar os efeitos da ração suplementada com geoprópolis sobre parâmetros hematológicos (Determinação do percentual de hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, contagem total do número de trombócitos e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer) de Jundiá.
- c) Estudar o efeito do extrato de geoprópolis sobre o conteúdo de nitrato/nitrito (parâmetro imune) do sangue de Jundiás alimentados com ração suplementada com geoprópolis.
- d) Estudar os efeitos da ração suplementada com geoprópolis sobre parâmetros bioquímicos do sangue (AST, ALT, Glicose) de juvenis de Jundiá.
- e) Avaliar os efeitos da ração suplementada com geoprópolis sobre parâmetros da qualidade de água no sistema de recirculação de água.

4 METODOLOGIA

4.1 MONTAGEM DO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO

A preparação do experimento e a execução do mesmo foram realizadas de 22 de maio a 01 de julho de 2015 totalizando 20 dias de preparação e 19 dias de experimento. Para o desenvolvimento do experimento foi montado um sistema de recirculação no Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Laranjeiras do Sul, PR.

4.1.1 Instalações

Primeiramente foi realizada a montagem do sistema de recirculação em sistema fechado com uma única linha de tratamento de água, composto por seis aquários (caixa pretas de polietileno de dimensões 36,5 x 51 x 16,5 cm (LxCxA) com área de 0,049 m³), contando com fluxo contínuo de água. Cada aquário possuía uma entrada e uma saída individual que descarregava a água em um filtro mecânico, responsável pela retirada de partículas sólidas em suspensão, sendo que partículas entre 100 e 40 micra compõem cerca de 25% dos sólidos totais dos tanques suspensos na coluna d'água (KUBITZA, 2006). O filtro mecânico era composto por uma bacia plástica perfurada, e dentro foi acoplado um filtro para depurador (Scotch Brite (bidin)).

Após passar pelo filtro mecânico, a água com efluentes era destinada a um biofiltro. O biofiltro consistiu de um reservatório de 250 litros, tendo como substrato para a fixação das bactérias nitrificantes (gêneros *Nitrosomonas* - que realizam a oxidação da amônia a nitrito - e *Nitrobacter* - que oxida o nitrito a nitrato) mangueira corrugada picada. No biofiltro foram utilizadas duas bombas de oxigênio para a manutenção das bactérias e o controle da temperatura foi realizado por meio de termostato. Para o recalque e distribuição da água nos aquários foi utilizada uma bomba com vazão de 1200 L/h, e altura máxima de 1,30 m modelo H1200 (Vigo Ar).

O processo de maturação do biofiltro foi acompanhado durante 20 dias a partir da introdução de inóculo (20 L de água e 150 pedras) do biofiltro do sistema de

recirculação da carnicultura já maturado. A seguir, foram adicionados 9 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como substrato para o desenvolvimento das bactérias nitrificantes, esse substrato forneceu NH_4 para o meio, permitindo assim a colonização do substrato pelas bactérias. Os valores de NH_3 foram mensurados através de kit comercial específico (Alfa kit) diariamente. O sistema, aquários e biofiltro, recebeu água salobra (salinidade 2‰), preparada a partir de água doce não clorada e sal não iodado. A temperatura da água foi mantida em 25 °C e monitorada diariamente, por meio de um termômetro de mercúrio. O oxigênio dissolvido na água foi determinado diariamente por meio de um oxímetro AT 160 da alfakitYSI 55, com precisão de 0,01 unidades. O pH e a salinidade foram avaliados diariamente com a sonda multiparâmetros YSI 63. Foram utilizados equipamentos diferentes devido às limitações de cada equipamento, procurando alcançar uma maior acurácia nos valores mensurados dos parâmetros.

4.1.2 Animais

Os juvenis de *R. quelen*, com peso inicial médio de 23,155 g (n=42) foram adquiridos de piscicultura comercial Akna Alevinos do município de Toledo, PR. Os juvenis foram transportados até o Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Laranjeiras do Sul, PR embalados em sacos plásticos com saturação de OD e identificados.

4.1.3 Profilaxia e Aclimação

No laboratório, os animais inicialmente foram submetidos à banho de imersão em solução salina 3% por 10 minutos com objetivo de profilaxia à agentes patogênicos (PAVANELLI et al., 2008). O experimento foi realizado com 2‰ de salinidade como profilaxia contra o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*.

4.1.4 Delineamento experimental

Cada tratamento consistiu de dois aquários sendo que foram distribuídos 7 peixes para cada aquário (densidade de estocagem de 14,28 peixes/m³) se enquadrando em um sistema de cultivo intensivo. Os animais foram mantidos no

sistema para um período de aclimação de dois dias, sem alimentação antes do início do experimento. A temperatura ambiente durante o experimento foi mantida em 26 °C com auxílio de um ar-condicionado.

No início e no final do experimento foi realizada uma biometria total mensurando peso, comprimento total e comprimento padrão. Estes parâmetros foram determinados utilizando uma balança digital e um ictiômetro. Para a determinação do ganho de peso foi empregada a fórmula adaptada de Costa (2014):

Ganho de Peso (GP) (%) = (Somatória do Peso final – Somatória do Peso Inicial) / 100.

Figura 1 - Equipamentos e reagentes utilizados para mensuração de parâmetros de qualidade de água. A) Sonda multiparâmetros; B) Oxímetro digital AT 160; C) Kit colorimétrico comercial para análise de amônia Alfabik



Fonte: A) <http://blog.hidrosuprimentos.com.br/page/77/>; B) <http://www.solostocks.com.br/>; C) Becker, (2015).

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS

Para o desenvolvimento deste projeto foi coletada a geoprópolis produzida por abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* em colméias do tipo IMPA em meliponário de uma unidade familiar de produção situada no Município de Candói, Paraná. Estas colmeias são do tipo vertical, divididas em módulos, sendo o primeiro módulo o ninho, o segundo sobreninho e o terceiro em diante melgueiras, podendo apresentar de 1 a 3 melgueiras, dependendo da espécie. Entre os módulos das colmeias existem divisões especiais para facilitar a passagem das abelhas da postura do ninho para o sobreninho e fundo da melgueiras (CARVALHO, 2012).

A preparação dos extratos de geoprópolis foi realizada no laboratório de Química Orgânica da UFFS, Campus Laranjeiras do Sul. O extrato alcóolico foi obtido a partir de amostras de geoprópolis (137g, divididas em 3 amostras diluídas em 200

mL de etanol 100%) que foram mantidas sob agitação a 150 rpm, a 28 °C por 30 dias na ausência de luz. Após este procedimento, os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório e secos até peso constante. Os extratos secos e pesados foram redissolvidos em solução de etanol 70%, a fim de obter as diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG). Os mesmos foram mantidos sob refrigeração e ao abrigo da luz até o uso.

4.3 DIETAS EXPERIMENTAIS

Foi utilizada ração comercial (Empresa Anhambí Alimentos, localizada em Itapejara do Oeste, PR) com 32% de proteína, extrusada. A alimentação dos animais foi baseada no método da aparente saciedade. Os animais foram alimentados 2 vezes ao dia no mesmo horário (10:00 e 16:00 h).

Os animais foram divididos em três diferentes grupos (n=14 por grupo), mantidos em aquários e submetidos à suplementação dietética com diferentes concentrações de geoprópolis (ração comercial padrão acrescida de geoprópolis por aspersão): grupo I (controle) peixes que receberam ração sem suplementação com extrato de geoprópolis; grupo II (extrato 0,5%) peixes que receberam ração suplementada com 0,5% de extrato de geoprópolis; grupo III (extrato 2%) peixes que receberam ração suplementada com 2% de extrato de geoprópolis. Os grupos experimentais foram alimentados 2 vezes ao dia, durante um período de 18 dias. As concentrações dos extratos de geoprópolis e o tempo de tratamento escolhidos foram baseados em estudos anteriores de suplementação de peixes com própolis (CHU, 2006; ZHANG et al., 2009; AZZA et al., 2009; TALAS, GULHAN, 2009; DENG et al., 2011; DOTTA, 2013).

4.4 COLETA DE SANGUE E PREPARO DE SORO

Ao final das dietas experimentais, os peixes foram anestesiados com óleo de cravo (50 mg/L) e submetidos à duas punções caudais com uso de seringa, uma contendo heparina e outra sem anticoagulante, para obtenção do soro sanguíneo. O sangue coletado com anticoagulante foi separado em alíquotas para as seguintes

análises: contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer e confecção de extensões sanguíneas em duplicata posteriormente coradas com May-Grunwald/Giemsa pelo método de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e utilizadas para contagem diferencial de leucócitos e contagem total do número de trombócitos e leucócitos (DOTTA, 2013). Ainda, uma alíquota foi armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A determinação do conteúdo total de hemoglobina foi realizada através de kit comercial (Bioclin).

A partir dos valores do microhematócrito, da hemoglobina e da contagem de eritrócitos, foram calculados os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM), pela fórmula: ((Número de hemácias do microhematócrito/100) / número de hemácias). Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) calculada pela fórmula: ((concentração de hemoglobina X 10) / número de hemácias) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), calculada pela fórmula: ((Concentração da hemoglobina/ microhematócrito) X 100).

O sangue coletado sem anticoagulante foi armazenado em microtubos e deixado em repouso durante uma hora. O coágulo foi então centrifugado a 300 xg durante 10 minutos. O soro recolhido foi armazenado a -20 °C até a utilização para os ensaios bioquímicos (DOTTA, 2013). Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por aprofundamento do estado anestésico com óleo de cravo conforme as recomendações do Comitê de Ética no Uso dos Animais/ UFFS e CONCEA. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFFS sob o número de protocolo 23205.005163/2014-45.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO

O NO foi quantificado por meio da formação de seus metabólitos: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras do soro (50 μL) foram incubadas com o mesmo volume da solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) em microplaca durante 20 minutos, a 37 °C (MIRANDA et al., 2001; VILLAMIL et al., 2002). A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão

realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) em PBS (pH 7,2) (0-150 μM) e expressos em μM .

4.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

O soro dos juvenis de Jundiá foi utilizado para as dosagens bioquímicas de glicose, aspartatoamino-transferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) utilizando kits comerciais e seguindo as instruções dos fabricantes.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade a 5% de probabilidade. As variáveis que apresentaram normalidade foram Hematócrito, Linfócitos, Trombócitos e CHCM, sendo esse submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA), sendo que as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$). As variáveis que não apresentaram distribuição normal, foram contagem de eritrócitos, Hemoglobina, HCM, VCM, Glicose, AST e ALT, sendo estas submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) seguido do pós teste de Conover, ajustado pelo método de Bonferroni. Para as análises foi usado o Pacote estatístico ExpDes e PMCMR do software R versão 3.2.2. Os valores foram expressos como média \pm DP. (POHLERT, 2014; R CORE TEAM, 2015; FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATURAÇÃO DO BIOFILTRO

Para a montagem do experimento, na primeira etapa foi efetuada a montagem do sistema de circulação e o biofiltro (Figura 2). A figura 3 demonstra as variáveis avaliadas (temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH e conteúdo de NH_3) durante a maturação do biofiltro em um período de 12 dias.

No primeiro dia foi introduzido o inóculo do biofiltro do sistema de recirculação da carnicultura já maturo. Nos dias 4 e 6 foram adicionados 9 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como substrato para o desenvolvimento das bactérias observando-se um aumento no conteúdo de amônia nestes dias. No biofiltro foi utilizada mangueira corrugada picada como substrato ao qual se fixaram bactérias nitrificadoras que podem ser do gênero *Nitrosomonas* (que realizam a oxidação da amônia a nitrito) e do gênero *Nitrobacter* (que oxida o nitrito a nitrato). Estas reações de oxidação realizadas pelas bactérias compreendem o processo de nitrificação, que ocorre durante o percurso da água através do biofiltro (KUBITZA, 2006). Após 24 horas da adição do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocorreu um decréscimo no conteúdo de amônia, demonstrando que as bactérias nitrificantes colonizaram o substrato.

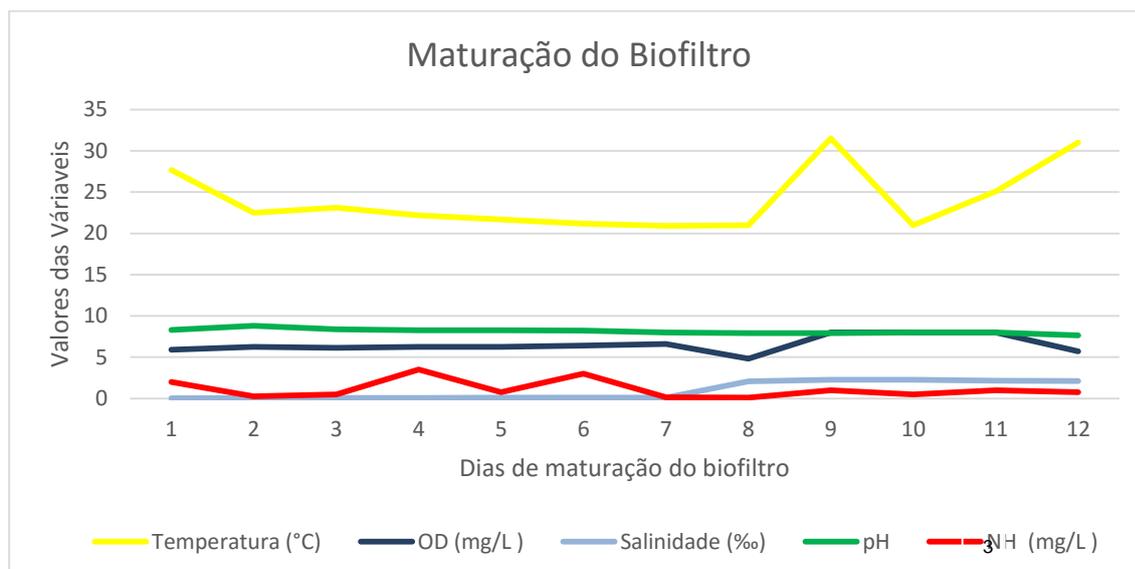
Figura 2 - Sistema fechado de recirculação, onde ocorreu o experimento.



Fonte: Da autora.

No dia 8 foi adicionado sal não iodado (1 kg no total, sendo distribuído 16,67g por caixa) atingindo salinidade de 2 ‰ a partir do dia 9. No Dia 12 foram instalados dois termostatos para manter a temperatura do biofiltro e assim do restante do sistema em torno de 25 °C. A partir do 12º dia, os parâmetros avaliados se mantiveram constantes.

Figura 3 - Parâmetros de qualidade de água na maturação do biofiltro.



A salinidade de 2‰ não influenciou no biofiltro, pois o mesmo já se encontrava maduro quando foi adicionado NaCl. Por outro lado, demonstrou-se eficiente como profilaxia contra o *Ichthyophthirius multifiliis*, pois não ocorreu sua presença no decorrer do experimento. A mangueira corrugada picada se mostrou um eficiente substrato para as bactérias nitrificantes pois o sistema não apresentou problemas de amônia no decorrer do experimento. O período utilizado, superior a uma semana, para a maturação para o biofiltro também se mostrou adequado em função da estabilidade dos parâmetros durante o experimento.

5.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA DURANTE O EXPERIMENTO

Em sistemas de cultivo de peixes e em experimentos, uma prática comumente utilizada é o acompanhamento da qualidade da água dos viveiros, pois a variação em qualquer dos parâmetros físicos e químicos da água pode interferir nos resultados, o que não ocorreu no presente trabalho como demonstrado na tabela 1. Os parâmetros de qualidade de água durante o experimento mantiveram-se dentro da faixa tolerada e próximos aos valores ideais para a espécie *R. quellen* na fase de juvenil segundo valores propostos por Baldisserotto (2013).

Tabela 1 - Variáveis de qualidade de água (média \pm desvio padrão) durante os 18 dias de tratamento com extrato de geoprópolis na ração.

Parâmetros	Tratamentos				BALDISSEROTTO (2013)
	Biofiltro	Controle	T1	T2	
Temperatura (°C)	25,6 \pm 2,17	24,6 \pm 1,73	24,9 \pm 1,66	24,5 \pm 1,81	22 a 26, ideal 25 °C
Oxigênio (mg.L ⁻¹)	7,59 \pm 1,87	7,39 \pm 1,85	7,16 \pm 1,67	7,28 \pm 1,75	Acima de 5 mg.L ⁻¹
Salinidade ‰	2,32 \pm 0,17	2,30 \pm 0,15	2,70 \pm 1,27	2,33 \pm 0,15	Ideal 2‰
pH	7,57 \pm 0,43	7,52 \pm 0,55	7,11 \pm 1,53	7,54 \pm 0,50	Ideal 7,5
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,54 \pm 0,33	0,45 \pm 0,38	0,34 \pm 0,35	0,47 \pm 0,29	Abaixo de 0,5 mg.L ⁻¹

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis).

5.3 CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

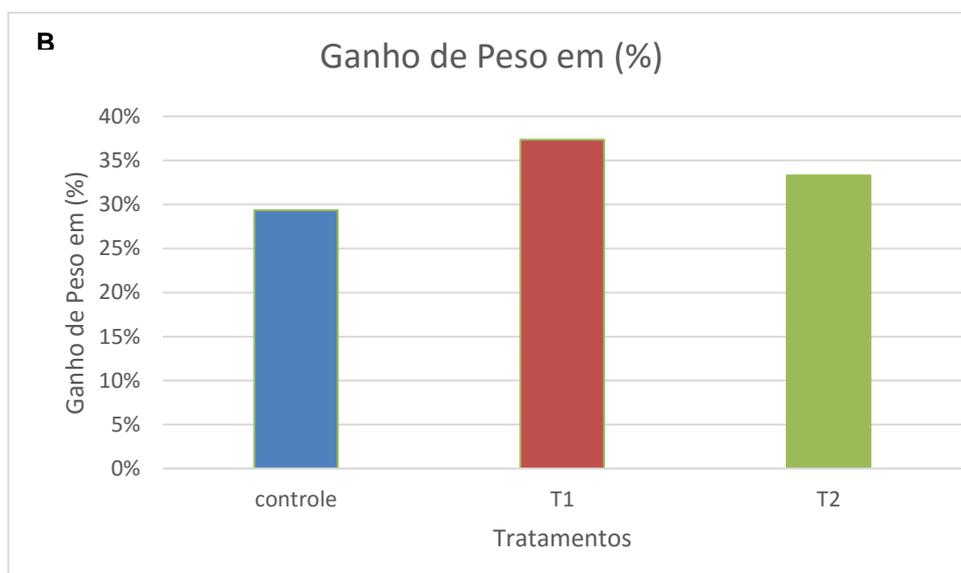
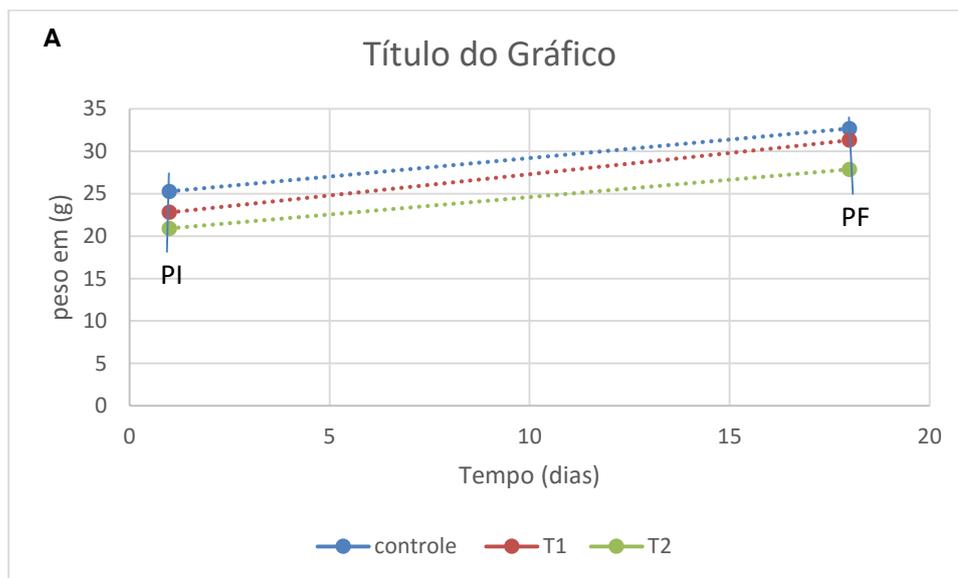
A taxa de sobrevivência ao final dos 18 dias de experimento foi de 97,62%, sendo que foi observada a morte de apenas um animal (do tratamento 2% de geoprópolis) por problemas técnicos no primeiro dia do experimento não tendo sido influenciada pela dieta experimental. Além disso, foram avaliados a taxa de crescimento e o ganho de peso dos animais durante o período experimental e os valores estão apresentados na Tabela 2 e Figura 4. Para efeitos do cálculo do ganho de peso (%) usando a fórmula $GP (\%) = (\text{Somatória do peso Final} - \text{Somatória do peso inicial}) / 100$, os dados da biometria inicial do animal morto no tratamento 2 foram desconsiderados.

Tabela 2 – Dados da bimometria inicial e final do *R. quelen* submetidos a dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.

Parâmetros	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
PI	24,28 ± 8,01	22,69 ± 2,95	20,69 ± 3,85
PF	32,53 ± 6,95	30,25 ± 6,12	27,33 ± 6,78
CTI	13,62 ± 1,43	13,12 ± 0,77	13,08 ± 0,92
CTF	14,85 ± 0,97	15,02 ± 1,00	14,20 ± 1,23
CPI	11,03 ± 1,31	10,66 ± 0,61	10,62 ± 0,82
CPF	12,31 ± 0,99	12,75 ± 0,94	12,05 ± 1,00

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis). Peso Inicial (PI), Peso Final (PF), Comprimento Total Inicial (CTI), Comprimento Total Final (CTF), Comprimento Padrão Inicial (CPI), Comprimento Padrão Final (CPF).

Figura 4 – Equação da reta de crescimento de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração durante 18 dias de suplementação (A). Ganho de peso em (%) de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração durante 18 dias de suplementação (B). Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis); Peso Inicial (PI), Peso Final (PF).



Como pode ser observado na Tabela 2 não houve diferença estatística para os valores de peso inicial entre os grupos controle, T1 e T2. Também não houve diferença estatística para os parâmetros de peso final, CTI, CTF, CPI e CPF entre os grupos controle, T1 e T2 ao longo do período de suplementação. Foi realizado o cálculo do ganho de peso médio (%) para cada grupo (Figura 4) representando 29%, 37% e 33% para o controle, T1 e T2, respectivamente, demonstrando que a suplementação com extrato de geoprópolis não influenciou significativamente o ganho de peso e o crescimento dos animais no período estudado. A suplementação de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com diferentes concentrações de própolis na ração durante 56 dias também não promoveu alterações significativas no crescimento dos animais durante o período estudado (KASHKOOLLI et al., 2011). Por outro lado, a suplementação da ração com extrato etanólico de própolis promoveu aumento significativo do crescimento em tilápias após um período de 42 dias de tratamento (AZZA; ABD-EL-RHMAN, 2009).

5.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Foi realizada a avaliação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Estas enzimas são muito utilizadas como marcadores de lesão ou toxicidade celular. Assim, qualquer lesão (injúria) tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração ou nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos de AST e ALT (ALVES, 2003).

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos analisados AST e ALT.

Parâmetros Bioquímicos	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
AST (UI/L)	1,48 ± 1,23	1,20 ± 1,12*#	2,97 ± 1,84*
ALT (UI/L)	0,06 ± 0,45	-0,88 ± 1,36*#	0,07 ± 1,07*

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis). *Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle. # Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (T1 x T2)

Como pode ser observado na Tabela 3, houve diferenças significativas entre os valores da AST e ALT em relação ao controle e entre os tratamentos no período de tempo estudado. Na concentração de 2% de geoprópolis foi observado um aumento na atividade de ambas as enzimas, podendo indicar um possível efeito tóxico nesta concentração. Por outro lado, na concentração mais baixa de 0,5% houve uma redução nas atividades da AST e ALT. Resultados conflitantes também foram relatados por Talas (2009) que testou três concentrações de própolis (0,01, 0,02 e 0,03 g /L) na água do cultivo da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) durante 96 horas. Neste estudo foi observado uma diminuição na atividade da aspartato aminotransferase (AST) nas concentrações de própolis 0,02 e 0,03 g/L após um período agudo de exposição. Esses dados apontam para uma possível toxicidade da própolis quando usada em concentrações mais elevadas. Por outro lado, Kashkooli et al. (2011) não observou alterações na atividade das aminotransferases em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) suplementadas com extrato de própolis durante um período de 8 semanas, indicando a ausência de toxicidade tecidual para períodos mais prolongados de suplementação. Logo, podemos observar a necessidade de estudos com tempos diferentes, para melhor entendimento do efeito da própolis nos níveis das enzimas AST e ALT no sangue de jundiás.

Os dados basais da atividade das enzimas ALT e AST relatados na literatura para o jundiá apresentam valores bastante variados como os citados nos trabalhos de Borges, (2004), Montanha et al. (2014) e Loro et al. (2015) para ALT, $34,5 \pm 2,2$ (UI/L); $17,11 \pm 5,80$ (UI/ L), e $43,4 \pm 2,91$ (UI/L) respectivamente e para AST $114,1 \pm 7,1$ (UI/L); $26,33 \pm 6,08$ (UI/L); $142,0 \pm 3,46$, (UI/L) respectivamente. Aliados aos resultados deste trabalho, estes dados demonstram que os valores basais de AST e ALT tendem a apresentar grande variabilidade mesmo dentro da mesma espécie. Esta divergência pode ser devido à diferenças na idade, sexo e condição fisiológica dos animais bem como na metodologia utilizada para determinação da atividade enzimática.

Considerando o comportamento metabólico, o conjunto de enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares nos peixes é bastante distinto sendo que as respostas à mudanças na dieta ou no ambiente podem ser extremamente variáveis dentre as inúmeras espécies de peixes (LEHNINGER, 2011; SOUZA, 2012). Dentre os nutrientes utilizados como combustível para a oxidação e geração de energia

celular, a glicose é considerada o mais importante. Neste trabalho a avaliação da glicemia teve por objetivo verificar se a suplementação com extrato de geoprópolis provocaria alguma alteração da fisiologia e do metabolismo normal de carboidratos do animal. Como pode ser observado na tabela 4, houve variação significativa da glicemia durante o período experimental.

Tabela 4 - Concentração de glicose sanguínea de jundiás submetidos à dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.

Parâmetros Bioquímicos	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
Glicose (mg/dL)	52,14 ± 15,56	57,64 ± 22,72*	58,91 ± 15,33*

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis). *Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle.

Os valores de glicemia descritos (Tabela 4) foram similares aos determinados em outros trabalhos para jundiás, em torno de $65,1 \pm 3,6$ e $45,5 \pm 4,17$ mg/dL (BORGES et al., 2004; LORO et al., 2015). Portanto o valor basal encontrado no presente trabalho de $52,14 \pm 15,56$ mg/dL se encontra dentro da faixa de valores basais apresentados pela literatura.

A suplementação com diferentes concentrações de extrato de própolis em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não alterou os valores de glicose sanguínea de forma significativa após um longo período de exposição (KASHKOOLLI et al., 2011). Por outro lado, Talas (2009) encontrou um aumento nos níveis de glicose na truta arco-íris (*O. mykiss*) após tratamento com as concentrações de própolis na água de 0,02 e 0,03 (g/L) durante 96 h de experimento. A presença de alteração da glicemia dos juvenis de jundiá neste trabalho está correlacionada com as alterações das variáveis eritrocitárias, que serão apresentados e discutidos na Tabela 7, uma vez que geralmente as alterações imunes em animais estressados ou doentes estão relacionadas com hiperglicemia. Esta hiperglicemia pode ser uma resposta ao aumento da liberação de cortisol, que prepara o organismo para uma resposta de defesa contra situações de estresse ou de combate à patógenos (TAVARES-DIAS et al., 2001; URBINATI, CARNEIRO, 2001; BARCELLOS et al., 2001).

5.5 PARÂMETRO IMUNE

No presente trabalho os valores do conteúdo de nitrito/nitrato para os jundiás suplementados com geoprópolis foram de $113,13 \pm 49,87$; $127,57 \pm 53,59$ e $144,73 \pm 85,10$, para o grupo controle, tratamento 1 e tratamento 2, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre eles (Tabela 5). Assim, os resultados indicam que o extrato de geoprópolis não influenciou a produção de óxido nítrico e de espécies derivadas de nitrogênio, fator importante na resposta imune.

Tabela 5 - Conteúdo de nitrito/nitrato (μM) de jundiás suplementados com diferentes concentrações de extrato de geoprópolis na ração.

Parâmetro Imunológico	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
Nitrito (μM)	$113,13 \pm 49,87$	$127,57 \pm 53,59$	$144,73 \pm 85,10$

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis).

Para peixes teleósteos, os valores de conteúdo de nitrito/nitrato são bastante variáveis dependendo da espécie de peixe considerada (STAFFORD et al., 2002). Segundo Acosta (2005) os valores de nitrito apresentado por juvenis de *Carassius auratus* (*goldfish*) variaram de $5 \mu\text{M}$ (valores basais) a $35 \mu\text{M}$ (valores de animais vacinados para a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) demonstrando a capacidade de resposta do sistema imune frente à patógenos.

5.6 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O sangue é um tecido fluido composto de um plasma líquido e componentes celulares sendo responsável pela distribuição de calor, transporte de gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção (RANZANI-PAIVA, 2013). A presença, quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico (vascular) refletem o estado fisiológico do organismo, apresentando ampla variação em função de fatores externos e internos (SERANI et al 2011). Assim, as variáveis hematológicas representam uma importante ferramenta para o monitoramento da sanidade dos peixes e das boas condições ambientais (BARCELOS, 2009). Além disso, podem ser utilizadas como indicadores do sucesso de tratamentos profiláticos ou terapêuticos de lotes de peixes, auxiliando na melhoria das condições de cultivo destes organismos (DOTTA, 2013).

No presente trabalho, os valores basais apresentados na Tabela 6 estão de acordo com o relatado na literatura para a espécie *Rhamdia quelen* (BORGES et al., 2004; TAVARES-DIAS et al., 2001; RANZANI-PAIVA, 2013) e para outros peixes de água doce como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (DOTTA, 2013; LEDIC-NETO et al., 2014).

Tabela 6 - Variáveis eritrocitárias em *R. quelen* submetidos à dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.

Variáveis eritrocitárias	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
Eritrócito ($10^6/\mu\text{L}$)	3,33 \pm 1,03	2,03 \pm 0,38 [#]	4,57 \pm 1,24 [#]
Hemoglobina (g/dL)	6,19 \pm 0,54	13,24 \pm 1,30 ^{*#}	4,63 \pm 0,30 ^{*#}
Hematócrito (%)	22,4 \pm 4,35	20,9 \pm 3,76	25 \pm 1,83
HCM (pg hemoglobina/hemácia)	41,57 \pm 38,82	666,49 \pm 63,36 ^{*#}	148,96 \pm 7,83 ^{*#}
CHCM (g/dL)	29,24 \pm 5,6	63,11 \pm 11,52 ^{*#}	19,03 \pm 0,61 ^{*#}
VCM (fL)	141,98 \pm 110,60	990,05 \pm 161,31 ^{*#}	785,70 \pm 41,49 ^{*#}

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2), com 2% de geoprópolis). *Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle. #Indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre T1 e T2.

A partir da tabela 6 é possível observar que o extrato de geoprópolis não influenciou o número de eritrócitos e o hematócrito no período de tempo estudado quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a concentração de hemoglobina apresentou aumento significativo no tratamento 1 e uma redução significativa no tratamento 2 comparadas ao grupo controle. Ainda, as concentrações de hemoglobina foram significativamente diferentes entre os dois tratamentos. Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, que contêm o pigmento hemoglobina, que tem por função o transporte de oxigênio e gás carbônico (RANZANI-PAIVA, SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS, 2009). Qualquer deficiência no número de eritrócitos ou na concentração de hemoglobina poder refletir em uma falta de O₂ nos tecidos e prejudicar o funcionamento adequado das células (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

A manutenção do número de eritrócitos e o aumento do VCM nos dois tratamentos pode estar relacionado a um possível efeito tóxico do extrato de geoprópolis, uma vez que representa um aumento do volume das hemácias, podendo indicar um estado de anemia macrocítica. Na tentativa de amenizar o estado anêmico, foi observado um aumento significativo da concentração de hemoglobina, HCM e CHCM nos peixes que receberam o tratamento 1. No tratamento 2, o quadro de possível anemia é agravado pela redução da concentração de hemoglobina. Este quadro poderia comprometer a capacidade de transporte de oxigênio e a função metabólica dos tecidos. Os dados dos índices hematimétricos corroboram a hipótese de uma tentativa de compensação dos parâmetros hematológicos no tratamento 1 (0,5% de extrato de geoprópolis) enquanto a concentração de 2% de geoprópolis parece apresentar efeitos mais danosos ao sistema hematológico dos peixes.

Os resultados de suplementação com própolis sobre parâmetros hematológicos apresentam grande variabilidade em diferentes estudos. Estudos em tilápia (*Oreochromis niloticus*) suplementada com extratos de própolis a 2% demonstraram não haver alterações significativas entre os grupos controle e suplementado, respectivamente, no conteúdo de eritrócitos (aos 15 dias - $1,59 \pm 0,1$ e $1,58 \pm 0,1$; aos 21 dias - $3,9 \pm 0,2$ e $3,43 \pm 0,1$) e hematócrito (aos 15 dias - $31,2 \pm 0,4$ e $29,0 \pm 0,5$; aos 21 dias - $34,9 \pm 0,7$ e $36,7 \pm 0,3$) após 15 e 21 dias de tratamento (LEDIC-NETO et al., 2014). Esses valores demonstram que a concentração de 2 % da própolis aparentemente não causou efeito tóxico para a tilápia durante os períodos estudados, no entanto, o período de tempo de suplementação parece ter influenciado

positivamente os dados hematológicos. Por outro lado, Dotta (2013) observou um aumento no número total de eritrócitos de tilápia para o grupo tratado com extrato de própolis 0,5% sem alteração do hematócrito em qualquer dos grupos avaliados (0,5, 1 e 2%) após 21 dias de suplementação com extrato de própolis na ração. Esses dados sugerem um possível efeito no sistema hematológico da própolis para a tilápia, pois o aumento dos eritrócitos pode estar relacionado com uma maior quantidade de oxigênio transportada. Além das variáveis eritrocitárias, o monitoramento do sistema imune representa um fator importante nas avaliações das condições de saúde dos peixes sendo que a resposta imunológica pode sofrer efeitos inibitórios de estresse agudo ou crônico, causando significativa redução na resistência dos animais à doenças (AZZA, 2009; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Neste sentido, no presente trabalho foram avaliados os efeitos dos extratos de geoprópolis sobre a contagem de células de defesa gerais e diferencial de linfócitos e trombócitos.

Os linfócitos e trombócitos fazem parte dos componentes celulares do sangue que atuam de forma específica. Os trombócitos são células responsáveis pela coagulação sanguínea, além de participarem de processos inflamatórios e desempenharem funções fagocíticas (RUIZ et al., 2003; SHIGDAR; HARFORDB; WAR, 2009). De acordo com Clauss et al. (2008), a trombocitopenia pode ter efeitos devastadores nos peixes não apenas por estas células serem responsáveis pela coagulação sanguínea, mas também por controlar a perda de fluido da superfície de ferimentos em peixes.

Outro tipo celular importante do sistema imune são os linfócitos, células predominantes em várias famílias de peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os linfócitos atuam como células imunocompetentes (RUIZ et al., 2003) e na defesa contra infecções por protozoários, helmintos (YAMAMOTO et al., 2001) e outros patógenos (RUIZ et al., 2003) participando também do processo inflamatório (SHIGDAR; HARFORDB; WAR, 2009). Na Tabela 7 são apresentados os valores das células sanguíneas de defesa orgânica.

Tabela 7- Células sanguíneas de defesa orgânica em *R. quelen* submetidos a dieta com diferentes concentrações de geoprópolis.

Células sanguíneas de defesa orgânica	Tratamentos		
	Controle	T1	T2
(%)Células de Defesa	11,8 ± 2,7	10,4 ± 3,0	11,4 ± 4,0
(%) Linfócitos	55,9 ± 7,25	47,86 ± 6,08	39,7 ± 22,2
(%)Trombócitos	28,7 ± 8,7	25,75 ± 6,74	24,4 ± 6,2

Controle (testemunha); T1 (Tratamento 1, com 0,5% de geoprópolis), T2 (Tratamento 2, com 2% de geoprópolis).

No presente estudo, não houve diferenças significativas entre o número de linfócitos, trombócitos e células de defesa entre os tratamentos com geoprópolis (Tabela 7). O que demonstra que as concentrações da própolis no período de tempo estudado não apresentaram efeito imunoestimulante na espécie *R. quelen*.

Os linfócitos e trombócitos foram os tipos celulares mais abundantes encontrados em todos os tratamentos o que está de acordo com o relatado por Tavares-Dias e Moraes (2004). A faixa de valores proposta para a espécie *R. quelen* por Tavares-Dias (2002) apresenta valores de $78,42 \pm 8,23$ para trombócitos e $11,61 \pm 6,57$ de linfócitos. Os valores do presente trabalho se encontram fora dessa faixa $53,9 \pm 13,9$ (%) de linfócitos e $33,4 \pm 14,7$ (%) de trombócitos demonstrando a grande variabilidade dos dados dentro da mesma espécie. Nesta mesma linha, outros trabalhos da literatura relatam valores divergentes para *R. quelen* como Borges et al. (2004) encontrou valor de $50,1 \pm 2,6$ (%) para linfócitos e Sutile et al. (2014) e Kreutz et al. (2011), respectivamente encontraram valores de linfócitos de $13,7 \pm 2,1$ (%) e $3,64 \pm 0,25$ (%). Essa variação pode se dar em função do sexo, peso, comprimento e o estado nutricional do peixe ou ainda devido à técnica de contagem utilizada (RANZANI-PAIVA, 2013). Já os trombócitos apresentaram valor de $33,4 \pm 14,7$ (%) no presente trabalho próximo ao encontrado por Sutile et al., (2014) e Borges et al., (2004) respectivamente de $21,3 \pm 3,0$ (%) e $28,9 \pm 5,5$ (%) para trombócitos.

Em estudos realizados por Ledic-Neto (2014) e Dotta (2013) a suplementação de extrato de própolis em diferentes concentrações em tilápia por 15 dias não promoveu alterações no número total de leucócitos, linfócitos e trombócitos. No entanto, após 21 dias de suplementação observou-se um aumento significativo dessas variáveis quando comparado ao grupo de 15 dias de suplementação. No presente trabalho durante o período de 18 dias de suplementação para a espécie *R.*

quelen também não foram encontrados alterações no número total de leucócitos, linfócitos e trombócitos. Baseado nos resultados deste trabalho e nos dados da literatura, mais estudos devem ser realizados utilizando a geoprópolis por períodos de tempo mais prolongados para avaliar com maior clareza e exatidão o efeito da geoprópolis como imunoestimulante e verificar sua toxicidade.

Partindo da definição de Anderson (1992) de imunoestimulante como sendo uma substância química, um estressor ou uma ação que aumenta os mecanismos de defesa não específicos, bem como as respostas específicas podemos sugerir que no presente trabalho o extrato de geoprópolis atuou como um agente estressor, evidenciando possíveis efeitos tóxicos das concentrações utilizadas. Além disso, no período estudado e através dos marcadores utilizados não foi possível verificar uma ação imunomoduladora, que aumente os mecanismos de defesa não específicos bem como as respostas específicas.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados das análises hematológicas, imunológicas e bioquímicas foi possível concluir que os extratos de geoprópolis nas concentrações 0,5% e 2% influenciaram o metabolismo de glicose e a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) dos animais no período de tempo estudado. Além disso, os extratos de geoprópolis promoveram alterações nas variáveis eritrocitárias que diferiram dependendo da concentração utilizada indicando possíveis efeitos tóxicos das concentrações de geoprópolis utilizadas neste estudo e/ou tentativa de adaptação fisiológica frente ao geoprópolis. Por outro lado, os extratos de geoprópolis não apresentaram influência nas células de defesa nem no crescimento dos animais e também não interferiram nos parâmetros de qualidade da água mensurados no período de tempo estudado. Assim, os resultados mostraram que o geoprópolis deve ser melhor estudado em diferentes concentrações e tempos para assegurar a segurança e real eficácia dos extratos de geoprópolis como imunoestimulante em juvenis de jundiá *R. quelen*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, F., et al. Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Fish Shellfish Immunol**, v.18, n.1, p.31-38, jan. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464804000361>. Acesso em: 13 dez. 2015.
- AGIUS, C. **Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish**. Immunology. London: Academic Press, 1985, p.85-105.
- AGIUS, C. The melano-macrophage centers in fish: a review. In: Manning, M.J.; TATENER, M.F. (Eds) **Fish Immunology**. London: Academic Press, 1985, p.85-105.
- ANDERSON, D.P. Immunoestimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to Aquaculture. **Annual Review of Diseases**, Oxford, v.2, p.281-307, 1992. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0959803092900678>. Acesso em: 10 dez. 2015.
- AMARAL-JUNIOR, H.; GARCIA, S. (Org.) **O jundiá *Rhamdia quelen*: relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil**. Camboriú, SC: Gráfica Delta, 2013. 106p.
- ALVES, S. R. C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço. Joinville, SC**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/85697>. Acesso em: 25 jan. 2016.
- ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F.; Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.
- AVNIMELECH, Y. Carbon:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v.176, n.3-4, p. 227-235; jun.1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484869900085X>. Acesso em: 22 nov. 2015.
- AZZA, M. M.; RHMAN, A. E. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish e Shellfish Immunology**. v.27, n.1, p.454-459, set. 2009. Disponível em: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050-4648\(09\)00212-5](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050-4648(09)00212-5). Acesso em: 10 dez. 2015.
- 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. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10499-011-9482-4>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BALDISSEROTTO, B. Biologia da espécie. In: BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p. 67-72.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R.; BARCELLOS, L. G. Jundiá (*Rhamdia sp.*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2.ed. rev. ampl. – Santa Maria: Ed. UFSM, 2010. p. 317-321.

BALDISSEROTTO, B. Crescimento. In: BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2013. p. 152-321

BANKOVA, V., et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, p.361–367, 1998. Disponível em: http://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1998/03/Apidologie_0044-8435_1998_29_4_ART0006/Apidologie_0044-8435_1998_29_4_ART0006.html. Acesso em: 30 out. 2016.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000. Disponível em: http://www.academia.edu/13713028/Propolis_recent_advances_in_chemistry_and_plant_origin. Acesso em: 02 dez. 2015.

BARCELLOS, L. J.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 26, n.1, p.99-111, 2000. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/barcellos_26_1.pdf. Acesso em: 20 nov. 2015.

BARCELLOS, L.J. G. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v.32, p.121±123, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229616663_Plasma_levels_of_cortisol_and_glucose_in_response_to_capture_and_tank_transference_in_Rhamdia_quelen_Quoy_Gaimard_a_South_American_Catfish. Acesso em: 20 out. 2015.

BRAZ FILHO, M. S. P. et al. Aquaponia - alternativa para sustentabilidade na aquicultura. **Vitória. Zootec.**, Vitória, v.1, p.1-6, 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1030363/1/Carneiro.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BOYDE, C. E.; QUEIROZ, J. F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. 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: Ed. TecArt, 2004. p. 25-44.

BRANDÃO, D. A. **Trematódeos digenéticos de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) (jundiá) no estuário do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil**. 1977. 32 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1977.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish e Shellfish Immunology**, v.19, n.5, p. 457-472, nov. 2005. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464805000501>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BORGES, A., et al. Hematologic and serum biochemical values for jundia´ (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 30, n.1 p. 21–25, abr. 2004. Disponível em:<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-004-5000-1>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**. v.36, p.347-363, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691597001452>. Acesso em: 20 nov. 2015.

CAMPOS, CRISTIANE M.; DE MORAES, JULIETA R. E.; DE MORAES FLÁVIO R. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO, RIM E BAÇO DE *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* E *Pseudoplatystoma fasciatum* PARASITADOS POR MYXOSPORÍDIOS, CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, n. 4, p.200-205. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v17n4/06.pdf>. Acesso em: 23 01 1016.

CHANG, J. Medicinal herbs: drugs or dietary supplements? **Biochem. Pharmacol.** v.59, n.3 p.211-219. Fev. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295299002439>. Acesso em: 09 out. 2015.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorder of fish. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 11, n.3, p. 445-462, sep. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094919408000212>. Acesso em: 20 out. 2015.

COSTA, A.A.P. **Densidade de estocagem sobre o desempenho e estresse de juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília- 2014. Acesso em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/16673>. Acesso em: 12 dez. 2015.

CHU, W. H. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish e Shellfish Immunology**. v.2, n.1 p.113–117, jun. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464805001798>. Acesso em: 12 dez. 2015.

CUNNINGHAM, J.G.; GUANABARA, K. Filtração glomerular. In: CUNNINGHAM, J.G.; GUANABARA, K. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

DENG, J.; AN, 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 Physiol Biochem**. v.37, n.4, p. 959–967, dez. 2011. Disponível em:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-011-9493-0>. Acesso em: 10 out. 2015.

DÍAZ GONZÁLES, F. H; DA SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre. Editora da UFRGS, 2006, 364p.

DOTTA, G. **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e Aloe barbadensis, suplementados na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2013. 124 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

DOTTA, G., A. et al. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. **Fish e Shellfish Immunology**. v.39, n.2, p. 280–284, ago. 2014. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464814001697>. Acesso em: 12 nov. 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The state of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, 2010, p. 218.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013.

FIGUEIREDO, H. C. P., LOPES, C. O., LEAL, C. A. G. Imunidade de animais aquáticos. **Revista Panorama da Aquicultura**, n.106, p.14-19, mar./abr., 2008. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/106/Sanidade106.asp>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, p. 08-14, jul. 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001300002. Acesso em: 02 out. 2015.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. BIOLOGIA DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.1 p. 179-185, jan./mar. 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782000000100029&script=sci_arttext. Acesso em: 10 dez 2015.

GOLDENFARB P. B., BOWYER F. P., HALL E., BROSIUS E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 35-9, 1971. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5556212>. Acesso em: 10 dez. 2015.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L, WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v. 126, p. 131-138, out.1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105>. Acesso em: 11 dez. 2015.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (*Pisces, Pimelodidae*)**. 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em

Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980. Disponível em: http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/teses/Tese%20Leonardo%20Cericato.pdf. Acesso em: 20 nov. 2015.

KASHKOOLLI, O. B. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.74, p. 315–318, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131000299X>. Acesso em: 22 nov. 2015.

KREUTZ, L.C, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short-term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish e Shellfish Immunology**, v.30, p. 51-57, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464810002998>. Acesso em: 23 nov. 2015.

KUBITZA, Fernando. Sistemas de Recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Revista Panorama da aquicultura**, v. 16, n.95, p.15-20, maio/jun., 2006. Disponível em: http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan95_Kubitza.pdf. Acesso em: 12 dez, 2015.

KUBITZA, F. Tanques-rede em açudes particulares: oportunidade e atenções especiais. **Panorama da aquicultura**, v.17, n. 101, p.15-21, maio/junho, 2007. Disponível em: <http://projetopacu.com.br/public/paginas/209-panorama-aquicultura-tanques-rede-em-acudes-particulares-oportunidade-e-atencoes-especiais.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2016.

KUBITZA, F. Produção de tilápias em tanques de terra estratégias avançadas no manejo. **Panorama da aquicultura**, n.115, set./out., 2009. Disponível em: http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/paginas/09_validate/?Edicao=115. Acesso em: 03 jan. 2016.

KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 124, p. 10-19, mar./abr., 2011. Disponível em: http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan124_Kub_status_atual-tilapicultura_brasil.pdf. Acesso em 23 nov. 2015.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.C.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 5. ed. São Paulo, Ed. Artmed, 2011. 1274 p.

LEDIC-NETO, J. Haematology and melanomacrophage centers of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis. **Acta Scientiarum, biological sciences**. Maringá, v. 36, n. 3, p. 263-269, July-Sept., 2014. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/22024>. Acesso em: 10 nov. 2015.

LOPES, J. M. **Influência do pH da água na sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824, PISCES, PIMELODIDAE) em duas épocas de desovas**. 1998. 60 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1998. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000081&pid=S0103-8478200000010002900012&lng=pt. Acesso em: 10 out. 2015

LORO, V.L. et al. Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Neotropical Ichthyology**, v.13, n.1, p. 229-236, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000100229. Acesso em: 07 nov. 2015.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.447-454, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300020. Acesso em 25 nov. 2015.

MACIEL, P. O. et al. Anatomia e histologia funcional do rim e baço de alevinos de pirarucu (*Arapaima gigas*). In: congresso da sociedade brasileira de aquicultura e biologia aquática, 5., 2012, Palmas. **Anais...** Palmas: AQUABIO, 2012. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/931825>. Acesso em: 07 jan. 2016.

MARTINS, M.L., et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, p.71-80, 2004. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/mauricio30_1.pdf. Acesso em: 14 nov. 2015.

MARCHIORO, M.I. **Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo**. 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/ultimas-noticias/885-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011>> Acesso em: 18/04/2015.

MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 12., 1997, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBI, 1997. 420 p. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000112&pid=S1519-6984200600030002400023&lng=pt. Acesso em: 20 no. 2015.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. p. 20-40.

MIRANDA, K. M., ESPEY, M. G., WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric oxide: biology and Chemistry**, v. 5, n.1, p. 62–71, fev. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860300903197>. Acesso em: 10 nov. 2015.

MONTANHA, A.C., et al. Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.3, p.697-704, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352014000300697&script=sci_arttext. Acesso em: 22 nov. 2015.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da Aquicultura**. Canoas: Ed. ULBRA, 2001. 200p.

MOURE, J. S. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritos por Lepeletier em 1836 (HYMENOPTERA, APIDAE). **Revista Brasileira de Biologia**. v.35, p. 615-23, 1975. Disponível em: <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34605>. Acesso em: 10 jul. 2015.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fish**, v.9, n.3, p.211-268, set. 1999. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008924418720>. Acesso em: 03 fev. 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445 p. Disponível em: http://eco.ib.usp.br/beelab/pdfs/livro_pnn.pdf. Acesso em 22 no. 2015.

NUNES, F. C. **Estudo taxonômico das espécies de peixes de água doce da Bacia do Rio Pojuca, Bahia, Brasil**. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Bahia, Salvador, 2012. Disponível em: <http://www.youblisher.com/p/1120556-ESTUDO-TAXONOMICO-DAS-ESPECIES-DE-PEIXES-DE-AGUA-DOCE-DA-BACIA-DO-RIO-POJUCA-BAHIA-BRASIL/>. Acesso em: 10 jan. 2016.

OZÓRIO, R. O. A.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.7-24.

PAVANELLI, G. C.; ERIAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doença de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3ª ed. Maringá: EDUEM, 2008.

PETERSEN, R. L. Melhoramento genético de *Rhamdia quelen*: situação atual e perspectivas futuras, In: AMARAL-JUNIOR, H.; GARCIA, S. (Org.) **O jundiá *Rhamdia quelen*: relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil**. Camboriú, SC: Gráfica Delta, 2013. 106p.

POHLERT, T. **The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)**. R package, <URL: <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>>. 2014.

QUEIROZ, J. F.; et al. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture, Baton Rouge**, v. 36, p. 45-50, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000095&pid=S1519-6984200900020002600023&lng=pt. Acesso em: 20 jul. 2015.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. (2015).

RAW, I. Mecanismo de ação da insulina. **Revista de Medicina**, v.85, n-4, p.124-129, out.-dez., 2006. Disponível em: http://medicina.fm.usp.br/gdc/docs/revistadc_96_p.124-129%20854.pdf. Acesso em: 10 fev. 2016.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Métodos para análises hematológicas em peixes**. Maringá: Eduem, 2013. 140p.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiro. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T; TAKEOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120.

REVERTER, M., et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v.433 p.50–61, set. 2014. disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614002798> Acesso em: 20 jan. 2016.

ROBERTS, R.J. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease: in: RIBELIN, W.E.; MIGAKI, G. (Ed) **The Pathology of fishes**. Madison: University of Wisconsin Press, 1975. P. 339-428.

RUIZ, I.; FERNÁNDEZ, A.B.; BLAS, I. El sistema inmune de los teleosteos (III): respuesta inmune específica. **Revista Acuática**, v. 18, p. 33-38, 2003. Disponível em: http://www.revistaacuatic.com/aquatic/pdf/18_6.pdf. Acesso em: 20 jan. 2016.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**. v.172, p. 63-92, 1999. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/els/00448486/1999/00000172/00000001/art00436>. Acesso em: 04 jan. 2016.

SECOMBES, C.J. **The fish immune system: the nonspecific immune system-cellular defense**. London: Academic Press, 1996.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113, p.1–14, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107002474>. Acesso em: 15 nov. 2015.

STAFFORD, J.L., et al. A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. **Dev Comp Immunol** v.27, n.8, p.685-98, set. 2003. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X03000417>. Acesso em: 27 nov. 2015.

SHAMA, S. **Identificação de bactérias patogênicas em cultivo semi-intensivo de Jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodidae**. Santa Maria – RS, 1997. 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia,, Universidade Federal de Santa Maria, 1997. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000097&pid=S0103-8478200000010002900028&lng=en. Acesso em 12 dez 2015.

SERANI, R. et al. Relationship between water toxicity and hematological changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.15, n.2, p.47-53, 2011. Disponível em:
<http://siaiap32.univali.br/seer/index.php/bjast/article/viewFile/2129/2134>. Acesso em: 03 out. 2015.

SECOMBES, C.J., et al. Cytokines and innate immunity of fish. **Dev Comp Immunol**. v. 25; n-8-9, p.713-23; out. 2001. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X01000325>. Acesso em: 14 nov. 2015.

SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; WAR, A. C. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n.5, p.731–736, mai. 2009. Disponível em:
[tp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464809000886](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464809000886). Acesso em: 02 out. 2015.

SOUZA, V.N.; MARTINS, M.L.; DE MORAES, F.R.; KRONKA, S.N. Metodologia de infecção experimental e grau de susceptibilidade do híbrido “tambacu” e *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski (*Osteichthyes*, *Anostomidae*) a quatro inóculos de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (*Protozoa*, *Ciliophora*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n.3, p. 803-811, set. 2012. Disponível em:
[tp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752001000300016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752001000300016). Acesso em: 21 out. 2015.

SUTILE, F. J., et al. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.157, n.3-4, p.142– 148, fev. 2014. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242713003152>. Acesso em 14 out. 2015.

TALAS, Z .S. GULHAN, M. F. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, n-7, p.1994–1998, out. 2009. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651309000888>. Acesso em: 22 out. 2015.

TAVARES-DIAS, M.; capítulo 2: Hematologia: Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. **Tópicos especiais em saúde e produção animal**,. v. 1, p.43-80, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: 2004, p.09-56.

TAVARES-DIAS, M. Physiology responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, São

Paulo, v. 27, n.1, p.43-48, 2001. Disponível em:
ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/arq_27_art_07.pdf. Acesso em: 13 nov. 2015.

TAVARES-DIAS, M., et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.693-698, ago. 2002. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782002000400024&script=sci_arttext. Acesso em: 12 nov. 2015.

TIZAR, L. R. **Imunologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.

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

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of matrixã, *Bricon cephalus* (Teleost: Characidae) to transport stress under influence benzocaine. **Journal Aquaculture Tropical**, v.16, n.1, p.75-85, 2001.

VILLAMIL, L., TAFALLA, C., FIGUERAS, A., NOVOA, B. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.1318–1323, nov. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130128/>. Acesso em: 27 nov. 2015.

YAMAMOTO, K.; et al. Induction of specific cytotoxic T cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.599-603, 2001. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327471>. Acesso em: 14 nov. 2015.

YIN-HAN, W.; RICHARD T. Raceway design and simulation system (RDSS): An event-based program to simulate the day-to-day operations of multiple-tank raceways. **Aquacultural Engineering**, v.39, n.2-3, p.59–71, nov. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486090800040X>. Acesso em: 21 nov. 2015.