

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em fêmeas suínas:
impacto sobre marcadores metabólicos e desempenho reprodutivo**

Claudio Junior Machado Posser

Pelotas, 2016

Claudio Junior Machado Posser

**Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em fêmeas suínas:
impacto sobre marcadores metabólicos e desempenho reprodutivo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Thomaz Lucia Junior

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P856s Posser, Cláudio Junior Machado
Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados
ômega-3 em fêmeas suínas: impacto sobre marcadores
metabólicos e desempenho reprodutivo / Cláudio Junior
Machado Posser. – 32f. – Dissertação (Mestrado).
Programa de Pós-Graduação em Veterinária.
Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de
Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientador Thomaz Lucia
Junior.

.Veterinária. 2.DHA. 3.Marcadores metabólicos.
4.Parâmetros zootécnicos. 5.Fêmeas suínas. I.Lucia
Junior, Thomaz. III.Título.

CDD : 636.4

Claudio Junior Machado Posser

Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em fêmeas suínas:
impacto sobre marcadores metabólicos e desempenho reprodutivo

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela University of Minnesota (EUA).

Dr. Rafael da Rosa Ulguin
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Carlos Deschamps
Doutor em Medicina Veterinária pela University of Illinois (EUA).

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida que tenho.

Aos meus pais, José Claudio Posser, Maria Aparecida Posser, pelo exemplo de vida e apoio incondicional a todas minhas decisões.

Ao meu orientador Dr. Thomaz Lucia Junior, pela confiança depositada, pelo apoio incondicional para realização deste trabalho e também pela oportunidade de podermos trabalhar juntos durante este período.

Aos Drs. Bernardo Gasperin e Ivan Bianchi pela contribuição para formação do meu conhecimento técnico durante este período de mestrado e pelo apoio durante a realização do trabalho de campo.

A toda equipe de funcionários da Copercampos que abriram as portas para realização de parte deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de alguma forma para alcançar este objetivo o meu muito obrigado!

Resumo

POSSER, Claudio Junior Machado. **Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em fêmeas suínas: impacto sobre marcadores metabólicos e desempenho reprodutivo**. 2016. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) contendo ômega-3, especialmente o ácido docosahexaenoico (DHA), na dieta de fêmeas suínas pode ser uma alternativa para melhorar o seu desempenho reprodutivo. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos e os níveis séricos de marcadores metabólicos em fêmeas suínas suplementadas com ômega-3. Neste estudo, 463 fêmeas suínas foram suplementadas na dieta com uma fonte de DHA extraído de microalgas, a partir de 85 dias de gestação e durante a lactação e o intervalo desmame-estro (IDE). Os níveis de inclusão de DHA foram: 0,0 (controle); 3,5; 7,0; 14,0; e 28,0 g/d. Foram realizadas três coletas de sangue, no início do tratamento (durante a gestação), dez dias após o parto (durante a lactação) e um dia antes do desmame, para avaliação dos níveis séricos de indicadores metabólicos: triglicerídeos; colesterol; fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-1); e ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os tratamentos não apresentaram efeitos sobre a taxa de natimortalidade, o tamanho total da leitegada e a duração do IDE no parto no qual houve suplementação ($P > 0,05$), nem sobre o total de leitões nascidos e a taxa de natimortalidade no parto subsequente ($P > 0,05$). Durante a gestação, os níveis séricos de colesterol e IGF-1 foram inferiores ($P < 0,05$) e os níveis de NEFA foram mais elevados durante a gestação ($P < 0,05$) do que durante a lactação e o IDE. Ainda, durante a gestação, os níveis séricos de triglicerídeos foram reduzidos ($P < 0,05$) apenas em fêmeas suplementadas com 14 e 28 g de ômega-3. A suplementação de fêmeas suínas com esta fonte de ômega-3 não trouxe benefício para os parâmetros reprodutivos avaliados, possivelmente em função do ótimo desempenho observado durante o período do experimento.

Palavras-Chave: DHA; marcadores metabólicos; parâmetros zootécnicos; fêmeas suínas

Abstract

POSSER, Claudio Junior Machado. **Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids in swine females: impact on metabolic markers and reproductive performance.** 2016. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Supplementation of diets of swine females with polyunsaturated fatty acids (PUFA) containing omega-3, especially the docosahexaenoic acid (DHA) may be an alternative to improve their reproductive performance. The objective of this study was to evaluate reproductive performance and serum levels of metabolic marker in swine females supplemented with omega-3. In this study, 463 swine females were supplemented in the diet with a source of DHA extracted from microalgae, from the 85th day of gestation and during both the lactation and the weaning-to-estrus interval (WEI). The DHA was included in the diet at: 3.5; 7.0; 14.0; and 28.0 g/d. Blood samples were collected at the beginning of the supplementation (during gestation), ten days after farrowing (during lactation) and one day prior to weaning, for determination of serum levels of metabolic markers: triglycerides; cholesterol; insulin-like growth factor type I (IGF-I); and non-esterified fatty acids (NEFA). No effect of the treatments was observed on the stillborn rate, total litter size and WEI at the parity in which supplementation occurred ($P > 0.05$), and also no effect occurred on total litter size and stillborn rate at the subsequent parity ($P > 0.05$). During the gestation, serum levels of cholesterol and IGF-I were lower ($P < 0.05$) and NEFA serum levels were greater than during lactation and the WEI ($P < 0.05$). Also during gestation, serum triglyceride levels were reduced ($P < 0.05$) only for females supplemented with 14.0 and 28.0 g of omega-3. The supplementation with DHA did not benefit the evaluated reproductive parameters of swine females, possibly due to the excellent performance observed during the experimental period.

Keywords: DHA; metabolic markers; reproductive performance; swine females

Lista de Figuras

Figura 1	Níveis séricos de colesterol durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)	19
Figura 2	Níveis séricos de IGF-1 durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)	20
Figura 3	Níveis séricos de ácido graxos não esterificados durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)	20
Figura 4	Níveis séricos de triglicerídeos durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA).....	21

Lista de Tabelas

Tabela 1	Natimortalidade e intervalo desmame-estro no parto no qual ocorreu suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA).....	17
Tabela 2	Natimortalidade e intervalo desmame-estro de acordo com a ordem de parto na qual ocorreu suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA).....	18
Tabela 3	Total de nascidos e natimortalidade no parto subsequente à suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA).....	18
Tabela 4	Total de nascidos e natimortalidade no parto subsequente à suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA), em função da ordem de parto.....	19

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
ALA	α -linolênico
ARA	Ácido Araquidônico
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
IDIA	Intervalo desmame-inseminação artificial
IGF-1	Somatomedina
Kcal	kilo calorias
LIN	Ácido Linoleico
N-3	Ômega-3
N-6	Ômega-6
NEFA	Ácidos graxos livres
PB	Proteína bruta
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
Ton	Tonelada
UFPEl	Universidade Federal de Pelotas
UPL	Unidade produtora de leitões

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Metodologia.....	14
3 Resultados.....	17
4 Discussão.....	22
5 Considerações Finais.....	25
Referências.....	26
Anexos.....	31

1 Introdução

A suinocultura é responsável pela proteína animal mais consumida pelos seres humanos no mundo. Atualmente, o Brasil conta com um rebanho de 35,2 milhões de animais, sendo o quarto maior produtor e o quarto maior exportador de carne suína, responsável por 3,1% da carne suína produzida no mundo, gerando 3.472 mil T de carne (ABPA, 2015).

Em um sistema industrial de suinocultura, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva, definida pelo número de leitões desmamados por fêmea por ano (DIAL *et al.*, 1992). Com a evolução dos sistemas de produção, faz-se necessária a análise detalhada dos dados zootécnicos e econômicos e, acima de tudo, uma visão global de todo o processo produtivo. Neste cenário, os programas de melhoramento genético buscam a obtenção de animais com gordura reduzida, melhor conversão alimentar, produzindo um animal para abate com menor custo de produção e maior rendimento de carcaça.

A obtenção de eficiência reprodutiva envolve, necessariamente, a manutenção de matrizes eficientes, de alta prolificidade e capacidade de desmamar leitões com alta viabilidade. A eficiência reprodutiva de uma fêmea suína depende vários fatores, como: a fertilidade da fêmea; o protocolo de inseminação artificial; a sobrevivência embrionária; o desenvolvimento fetal; e a viabilidade dos leitões (WHITTEMORE, 1998). A progressiva seleção genética para maior prolificidade resultou em aumento no tamanho da leitegada, mas também na maior incidência de natimortalidade e mortalidade pré-desmame, devido à baixa viabilidade dos leitões (QUINIOU *et al.*, 2002). As perdas com a ocorrência de leitões natimortos representam 3-7% do total de leitões nascidos, enquanto a mortalidade pré-desmame contribui com mais 7-10% (AGRINESS, 2014). A ocorrência de falhas reprodutivas contribui com a maior frequência entre as causas de descartes de fêmeas suínas (LUCIA *et al.*, 2000; ULGUIM *et al.*, 2014), resultando em taxas anuais de reposição em torno de 45% (D'ALLAIRE & DROLET, 2006).

A suplementação de fêmeas com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), em diferentes fases da vida reprodutiva, vem sendo utilizada como uma alternativa para incrementar o seu desempenho reprodutivo (revisado por ROSSI *et al.*, 2011). Os PUFA são classificados com base na posição da primeira dupla ligação, em relação à extremidade metil terminal. Os PUFA da série n-6 (ômega-6) e n-3 (ômega-3) têm como precursores os ácidos linoleico (C18:2n-6, LIN) e α -linolênico (C18:3n-3, ALA), respectivamente, os quais são ácidos graxos essenciais, que devem ser obtidos a partir da dieta (KURLAK & STEPHENSON, 1999). Estes podem ser convertidos em mais ácidos graxos de cadeia longa, através de dessaturação e alongamento, o que é realizado por enzimas específicas (SPRECHER, 2000). Fisiologicamente, os PUFA de cadeia longa mais importantes são o ácido araquidônico que é um ácido poli-insaturado que contém 20 carbonos com quatro ligações duplas, sendo que está na posição do sexto carbono, a partir da extremidade metil da molécula (C20:4n-6, ARA), assim classificando os demais como o ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA) e o ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA) (KURLAK & STEPHENSON, 1999).

Além da fonte de energia, os PUFA de cadeia longa possuem importante função estrutural, como parte da dupla camada de fosfolipídios nas membranas celulares, que afetam a fluidez da membrana e, por sua vez, o mecanismo de transdução de sinal intracelular (KURLAK & STEPHENSON, 1999; STILLWELL & WASSALL, 2003). Os PUFA de cadeia longa também têm efeito na imunidade através do seu papel na síntese dos eicosanoides, os quais são mensageiros químicos sintetizados a partir de PUFA, particularmente o ARA, mas também o EPA (CALDER, 2001). Os eicosanoides podem exercer efeitos antiinflamatórios, sendo que o efeito global é dependente das concentrações e do equilíbrio entre os ácidos graxos precursores.

Porém, os efeitos da suplementação de PUFA do tipo ômega-3 na dieta de fêmeas podem ser considerados contraditórios, em especial porque seus mecanismos de ação ainda não foram completamente esclarecidos. Palmer *et al.* (1970) descreveram um acréscimo no tamanho total da leitegada após suplementação de fêmeas suínas com farinha de peixe. Posteriormente, foi relatado que o crescimento e o desenvolvimento dos fetos podem ser influenciados positivamente pela suplementação das fêmeas com PUFA durante a gestação e lactação (INNIS, 1991). No entanto, a suplementação de leitões e matrizes com óleo

de peixe durante o início da gestação apresentou efeitos inconsistentes sobre a sobrevivência fetal (PEREZ RIGAU *et al.*, 1995). Por outro lado, estudos recentes associaram a suplementação com PUFA n-3 com benefícios para o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas (SMITS *et al.*, 2011; TANGHE & DE SMET, 2013).

Os efeitos dos PUFA sobre a função reprodutiva poderiam ocorrer através de diversos mecanismos. Os PUFA podem ser incorporados nas membranas de oócitos, alterando a produção de eicosanoides, e modulando a expressão de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas, no metabolismo de hormônios esteroides e na modulação do estresse oxidativo (JUMP, 2002; 2008; CAUGHEY *et al.*, 2005; WATHES *et al.*, 2007). Portanto, como a suplementação da dieta materna com PUFA n-3 pode reduzir a secreção de prostaglandinas pelo endométrio, prolongando a vida útil do corpo lúteo e a sobrevivência do embrião (LEROY *et al.*, 2008).

A suplementação de PUFA na dieta foi capaz de aumentar os seus níveis tissulares em ovócitos de camundongos (WAKEFIELD *et al.*, 2008) e em embriões de fêmeas suínas pré-púberes (BRAZLE *et al.*, 2009). Em ovelhas e vacas, o efeito benéfico de dietas contendo PUFA foi associado à competência ovocitária e a aumento nos níveis de progesterona, prostaglandinas e estradiol (ZACHUT *et al.*, 2008; SMITS *et al.*, 2011; GULLIVER *et al.*, 2012), mostrando melhoria na habilidade de retomada de meiose, fertilização, desenvolvimento até a fase de blastocisto e posterior eclosão. A suplementação com PUFA n-3 proveniente de óleo de peixe foi associada à melhoria da imunidade e no desenvolvimento do cérebro de leitões recém-nascidos (LESKANICH&NOBLE, 1999), fato que corrobora o efeito anti-apoptótico em neurônios descrito por Florent *et al.* (2006). Em vacas suplementadas com EPA e DHA, foi observado aumento no tamanho folicular (PETIT *et al.*, 2002). Como o desenvolvimento dos folículos ovarianos que começa durante a lactação (SOEDE *et al.*, 2011), o consumo de PUFA n-3 no final da gestação, durante a lactação e até o desmame, poderá se refletir em aumento no número total de leitões nascidos na gestação subsequente (SMITS *et al.*, 2011), ainda que esta hipótese não tenha sido confirmada em um estudo anterior (ROOKE *et al.*, 2001). No entanto, ainda que existam recomendações quanto aos requerimentos para o ácido linoleico, um dos PUFA n-6 (ômega-6), mas não existem recomendações quanto aos PUFA n-3 (ômega-3) para fêmeas suínas (NRC, 2012). Portanto, ainda existe a necessidade

de investigações mais detalhadas sobre os efeitos da suplementação com PUFA n-3 na dieta de fêmeas suínas sobre o seu desempenho reprodutivo.

A suplementação em dietas pode ser feita com EPA e DHA de diversas fontes, tais como óleos de origem vegetal, extraídos de plantas como girassol e linhaça, ou animal, extraídos da gordura de suínos (VICENTE *et al.*, 2013) e de alguns peixes e algas (revisado por ROSSI *et al.*, 2011; RYCKEBOSCH *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2013). Apesar dos óleos de peixes extraídos da pesca serem as fontes mais comuns de EPA e DHA, seu uso pode ser questionado devido à baixa disponibilidade e inconsistências no perfil nutricional, e as questões relacionadas à sustentabilidade e a riscos de contaminação, além de preços cada vez mais elevados. Assim, fontes alternativas de ômega-3, que sejam mais baratas e que apresentem maior conteúdo de EPA e DHA vêm sendo estudadas. O uso de algas como fontes de ômega-3 é considerado uma alternativa de produção sustentável livre de contaminação, pois as algas são cultivadas em ambiente fechado e estéril, apresentando estabilidade dos níveis nutricionais, além de possuírem perfil de aminoácidos superior ao apresentado pelos óleos vegetais. A partir de uma única inoculação em meios de cultura, as microalgas heterotróficas da espécie *Schizochytrium sp.* podem se reproduzir após a transferência para fermentadores, intensificando a sua própria produção e acumulando taxas mais elevadas de ácidos graxos (RATLEDGE *et al.*, 2004).

Os objetivos deste estudo foram identificar os efeitos da suplementação da dieta de matrizes suínas com diferentes níveis de ômega-3 extraído de microalgas heterotróficas, durante a gestação, a lactação e o intervalo desmame estro, sobre o efeito no desempenho reprodutivo, tanto no parto do ciclo reprodutivo durante a suplementação, como no subsequente. Além disso, objetivou-se identificar possíveis alterações em marcadores metabólicos como triglicérides, ácidos graxos não esterificados (AGNE), colesterol e somatomedina (IGF-1).

2 Metodologia

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA-UFPel, registro nº9648).

O experimento foi desenvolvido em uma granja comercial (unidade produtora de leitões), com inventário aproximado de 3.400 matrizes, localizada no oeste de Santa Catarina no município de Campos Novos (latitude 27°22'35.00"s, longitude 51°02'37.95"o), no período entre maio e agosto de 2014. Foram utilizadas 720 fêmeas suínas cruzadas (F1), da linhagem Camborough® (Agroceres-PIC®).

As fêmeas foram selecionadas para participar do estudo, de acordo com a disponibilidade dos grupos semanais da granja, incluindo matrizes que estavam em torno de 85 dias de gestação, entre o segundo e o sétimo parto. Em média, 120 fêmeas gestantes estavam disponíveis em cada semana. Algumas categorias de fêmeas não foram consideradas para o estudo, tais como: fêmeas com problemas locomotores, fêmeas destinadas ao descarte, e fêmeas usadas como "amas de leite".

As fêmeas foram suplementadas com PUFA extraído de microalgas heterotróficas derivadas da *Schizochytrium sp.* (RATLEDGE *et al.*, 2004), com apresentação de cor amarelada, contendo 120g de DHA por kg. Dentro do período estabelecido para a suplementação (seis semanas), considerando o fato de algumas fêmeas foram descartadas, por diversas razões não relacionadas ao estudo, um total de 463 foram incluídas no experimento. As fêmeas foram identificadas individualmente através de fichas, conforme a quantidade de suplemento fornecido, sendo distribuídas aleatoriamente em cinco tratamentos: controle (sem fornecimento); 3,5; 7,0; 14; e 28 g/d. O suplemento foi fornecido diariamente, junto com a ração, no turno da manhã, durante os últimos 30 dias de gestação, a lactação (21,9 ± 0,9 dias) e o intervalo desmame-estro (IDE), totalizando aproximadamente 60 dias de tratamento.

Na gestação, a granja possuía celas de aço individuais com piso vazado de concreto. As fêmeas eram alimentadas em comedouros automáticos do tipo *Dropp*, em canaletas nas quais também era fornecida água. A dieta fornecida durante a

gestação consistia de: 14,44% de proteína bruta (PB); 3.099,5713 KCAL/kg de energia; e 3,21% de gordura.

Ao final da gestação, 2-3 dias antes da data prevista do parto as fêmeas eram transferidas para as salas de maternidade, contendo celas individuais. Após o parto, o fornecimento de ração era fracionado em quatro períodos: no início e no final da manhã; e no início e no final da tarde. A partir do quarto dia após o parto, a ração foi fornecida *ad libitum*. O fornecimento de água era feito através de bebedouro do tipo chupeta. A dieta fornecida durante a lactação e IDE consistia de: 20,08% de PB; 3.336,7158 KCAL/kg de energia; e 4,8% de gordura.

No período do desmame as fêmeas eram transferidas para celas individuais, nas quais permaneciam até serem detectadas em estro. O manejo de detecção do estro era feito diariamente, no turno da manhã, através do reflexo de tolerância ao homem, na presença de um macho posicionado à frente das fêmeas. As fêmeas detectadas em estro eram inseminadas artificialmente no turno da manhã, seguindo o protocolo conduzido na rotina da granja. Na inseminação artificial, era utilizado o protocolo de 24 h; em média eram feitas 2,4 inseminações por fêmea, pela via infracervical, com 3×10^9 espermatozoides viáveis por dose de 80 mL. Durante o IDE, era realizado *flushing* juntamente com a suplementação.

Amostras de sangue foram colhidas, através de punção da veia jugular com tubos tipo *vacutainer*, de nove fêmeas de cada tratamento, escolhidas ao acaso, totalizando 45 fêmeas. Estas amostras foram colhidas em três momentos diferentes: no 85º da gestação; antes do início da suplementação; no décimo dia de lactação; e no dia anterior ao desmame. O sangue foi centrifugado a 7000 G durante 5 min. Posteriormente, o soro foi colocado em criotubos, para armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C.

As amostras de soro foram utilizadas para dosagem de marcadores metabólicos. Os níveis de triglicérides (catálogo nº 87.1/250: Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) e colesterol (catálogo nº 11539: BioSystems, Curitiba, PR) foram quantificados através de ensaio enzimático convencional. Os níveis de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) foram determinados através de quimiolumin escência (Siemens Immulite IGF-1 L2KGF2: Siemens Health care Diagnósticos Ltda, São Paulo, SP). Os níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFA) foram quantificados por espectrofotometria. Estas análises foram realizadas em laboratório comercial, seguindo as instruções do fabricante de cada ensaio.

Durante o parto no qual ocorreu a suplementação, foram registrados o número total de leitões nascidos, nascidos vivos e natimortos, bem como o IDE subsequente. Posteriormente, no parto seguinte, também foram registrados o número total de leitões nascidos, nascidos vivos e natimortos. Estes dados de desempenho zootécnico do parto seguinte foram extraídos através do programa PigChamp® (2015).

O número de leitões natimortos registrados em ambos os partos foi dividido pelo total de leitões nascidos no mesmo parto, para a obtenção da porcentagem de leitões natimortos em cada parto (ajustado para o tamanho total da leitegada). Em função de não ter apresentado normalidade (de acordo com o teste de Shapiro-Wilk), a porcentagem de natimortalidade por parto e o intervalo desmame-estro foram comparados entre os tratamentos e entre as ordens de parto através da análise de variância de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos. O número total de leitões nascidos, em ambos os partos, foi comparado entre os tratamentos por análise de variância, com comparação entre médias pelo teste de Tukey. Os níveis dos marcadores metabólicos (colesterol, IGF-1, triglicerídeos e NEFA) foram comparados entre os tratamentos e os momentos distintos de coleta de amostras também por análise de variância, com comparação entre médias pelo teste de Tukey. Para estas comparações, os níveis de colesterol foram submetidos a transformação para a escala logarítmica, em função de não ter apresentado normalidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistix® (2013).

3 Resultados

Considerando todas as fêmeas avaliadas, o IDE após o parto no qual ocorreu a suplementação foi igual a $3,5 \pm 0,8$ dias. A suplementação com diferentes níveis de DHA afetou o IDE (Tabela 1), sendo que o grupo suplementado com 7,0g de DHA apresentou IDE mais longo do que o observado no grupo controle ($P < 0,05$). O número de leitões natimortos por parto foi de $0,7 \pm 1,0$, correspondendo em média a 4,5% do total de leitões nascidos. Não houve efeito da suplementação com DHA sobre a porcentagem de natimortalidade por parto ($P > 0,05$).

Tabela 1: Natimortalidade e intervalo desmame-estro no parto no qual ocorreu suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

DHA (g)	Leitões natimortos (%)	n	Intervalo desmame-estro (d)	N
0	$3,2 \pm 0,6$	121	$3,3 \pm 0,1^b$	89
3,5	$5,0 \pm 0,6$	123	$3,6 \pm 0,1^{ab}$	106
7	$4,7 \pm 0,6$	114	$3,7 \pm 0,1^a$	88
14	$5,2 \pm 0,6$	123	$3,4 \pm 0,1^{ab}$	95
28	$4,3 \pm 0,6$	115	$3,5 \pm 0,1^{ab}$	85

^{a,b}Médias \pm EPM com expoentes diferentes na coluna ($P < 0,05$)

Matrizes com 2 partos e com 4 partos apresentaram IDE menor em comparação às fêmeas com 5-7 partos ($P < 0,05$), não havendo diferença entre as demais ordens de parto (Tabela 2). Fêmeas com 4 partos apresentaram menor natimortalidade do que as fêmeas com 5-7 partos ($P < 0,05$).

No parto subsequente à suplementação com DHA, o número total de leitões nascidos foi de $14,4 \pm 3,5$, enquanto o número de leitões natimortos foi igual a $0,8 \pm 1,2$, o que correspondeu a 5,4% do total de leitões nascidos. Não houve efeito da suplementação ($P > 0,05$) sobre o número total de leitões nascidos e a frequência de natimortalidade no parto subsequente (Tabela 3).

Tabela 2: Natimortalidade e intervalo desmame-estro de acordo com a ordem de parto na qual ocorreu suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

Partos	Natimortalidade/parto		Intervalo desmame-estro	
	n	(%)	n	Dias
2	149	4,5 ± 0,5 ^{ab}	128	3,6 ± 0,1 ^{ab}
3	128	2,8 ± 0,6 ^a	107	3,6 ± 0,1 ^{ab}
4	104	4,5 ± 0,7 ^{ab}	79	3,4 ± 0,1 ^{ab}
5	94	4,2 ± 0,7 ^a	71	3,3 ± 0,1 ^b
6-7	121	6,7 ± 0,6 ^b	78	3,7 ± 0,1 ^a

^{a,b}Médias ± EPM com expoentes diferentes na coluna (P<0,05)

Tabela 3: Total de nascidos e natimortalidade no parto subsequente à suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

DHA (g)	n	Total de leitões nascidos	Natimortalidade/parto
0	88	14,7 ± 0,4	5,0 ± 0,7
3,5	106	14,6 ± 0,3	4,6 ± 0,6
7	88	14,2 ± 0,4	5,5 ± 0,7
14	96	14,9 ± 0,3	6,5 ± 0,7
28	85	14,8 ± 0,4	4,6 ± 0,7

^{a,b}Médias ± EPM com expoentes diferentes na coluna (P<0,05)

No parto subsequente à suplementação, fêmeas com 5-6 partos apresentaram menor tamanho total da leitegada e maior frequência de natimortalidade (P<0,05) em comparação com fêmeas com 2-3partos (Tabela 4).

Tabela 4: Total de nascidos e natimortalidadeno parto subsequente à suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA), em função da ordem de parto

Partos	Natimortalidade/parto		Intervalo desmame-estro	
	n	(%)	n	Dias
3	128	15,0 ± 0,3 ^a	128	4,3 ± 0,6 ^a
4	106	15,0 ± 0,3 ^a	106	4,8 ± 0,6 ^a
5	79	14,8 ± 0,4 ^{ab}	79	4,9 ± 0,7 ^{ab}
6-7	150	13,8 ± 0,3 ^b	149	7,0 ± 0,5 ^b

^{a,b}Médias ± EPM com expoentes diferentes na coluna (P<0,05)

Os níveis séricos de colesterol (Figura 1) e IGF-1 (Figura 2) não foram influenciados pelos tratamentos (P>0,05), mas foram inferiores durante à gestação em comparação com os períodos de lactação e desmame (P>0,05). Não foi observado efeito dos tratamentos (P>0,05) sobre os níveis de ácido graxos não esterificados (Figura 3), que foram mais elevados durante à gestação em comparação com os demais períodos (P<0,05).

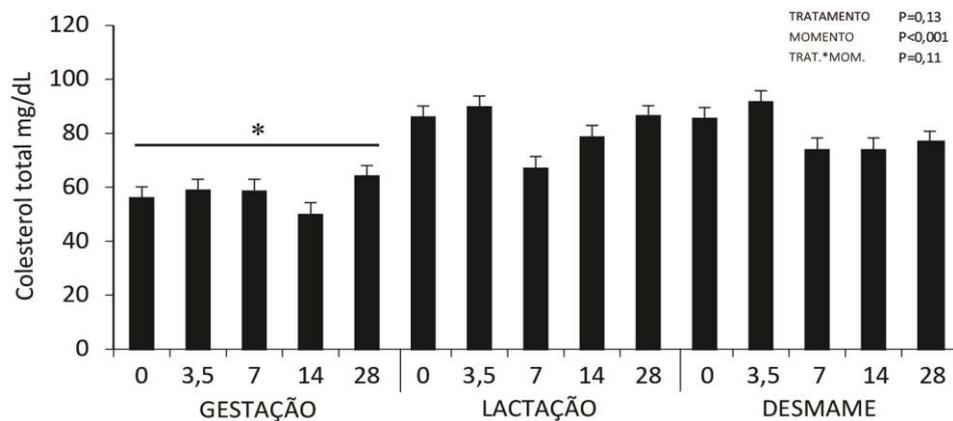


Figura 1: Níveis séricos de colesterol durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

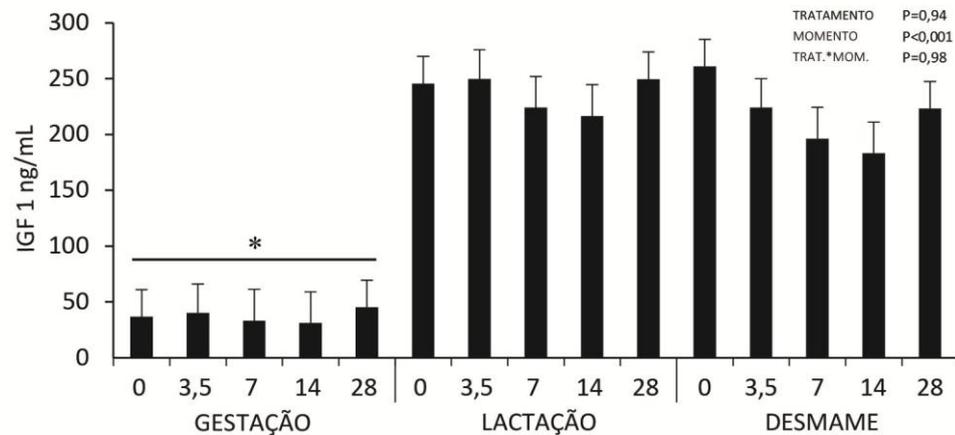


Figura 2: Níveis séricos de IGF-1 durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

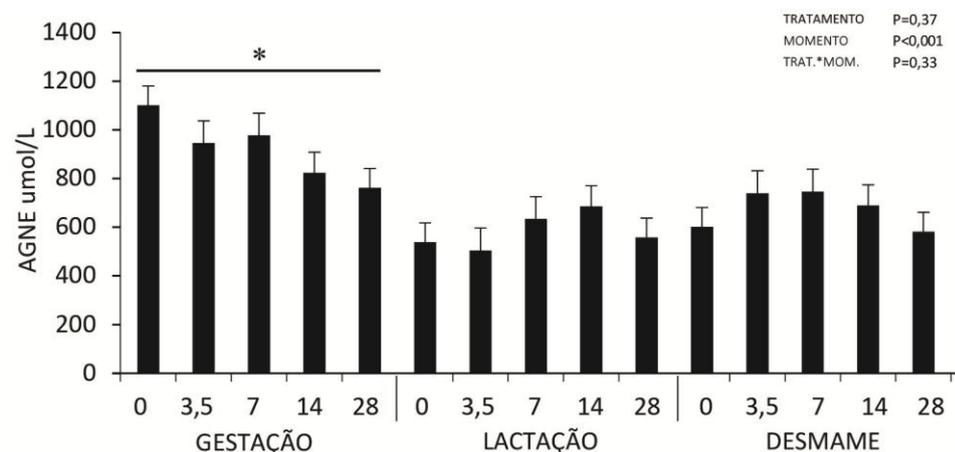


Figura 3: Níveis séricos de ácido graxos não esterificados durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

Foi observada uma interação entre os efeitos dos níveis de DHA e o momento da coleta de sangue sobre os níveis séricos de triglicerídeos (Figura 4). Fêmeas suplementadas com 14 e 28 g de DHA apresentaram níveis séricos de triglicerídeos inferiores aos demais tratamentos durante a gestação ($P < 0,05$), mas os tratamentos não diferenciaram nos demais períodos de suplementação ($P > 0,05$).

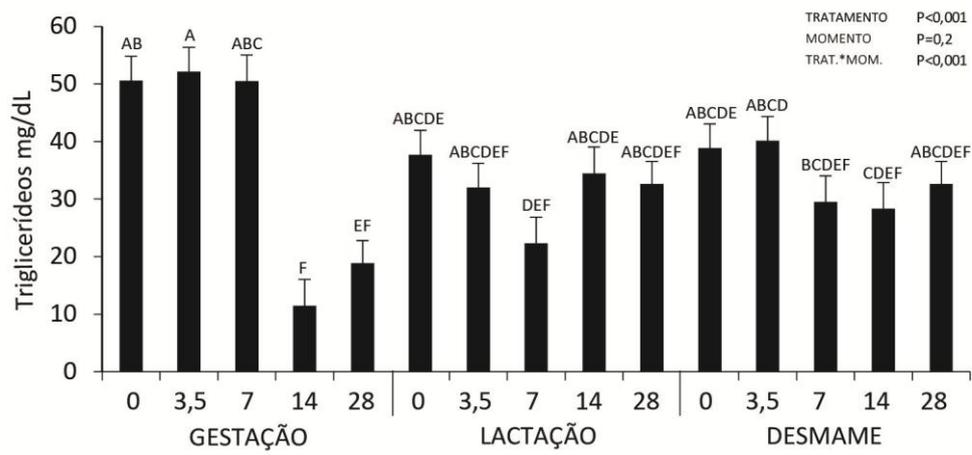


Figura 4: Níveis séricos de triglicerídeos durante os três períodos de suplementação com ácido docosahexaenoico (DHA)

4 Discussão

O presente estudo foi o primeiro a testar o fornecimento de PUFA extraído de microalgas heterotróficas na dieta de fêmeas suínas, embora outras fontes de ácidos graxos, como os óleos de peixes, de girassol e linhaça, tenham sido testadas anteriormente (ROSSI *et al.*, 2011; RYCKEBOSCH *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2013; VICENTE *et al.*, 2013). Nas ordens de parto na qual ocorreu a suplementação, não houve benefício para o IDE com nenhuma das doses testadas. A granja onde o experimento foi conduzido apresentou um desempenho reprodutivo que pode ser considerado excelente (AGRINESS, 2014), com um reduzido IDE. Assim, melhorias nesse índice podem ser pouco viáveis, considerando o limite fisiológico de variação nesse intervalo. No entanto, em faixas de IDE mais prolongado, suplementação da dieta de matrizes suínas com ômega-3 extraído de óleo de peixe, por oito dias no período pré-parto e durante a lactação também não resultaram em redução no IDE (SMITS *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2014). Portanto, efeitos benéficos da suplementação de dietas com ômega-3 sobre o IDE parecem ser questionáveis.

Neste experimento avaliamos a influência do DHA nos índices de natimortalidade no parto suplementado e subsequente, baseado neste efeito dos PUFA, acreditava-se que poderia reduzir os índices de natimortalidade, no qual não encontramos este efeito sobre os tratamentos. Segundo Leskanich & Noble (1999), os PUFA n-3 derivados de óleos de peixe são relacionados com melhoria na imunidade e no desenvolvimento do cérebro de leitões recém-nascidos. Já Tanghe *et al.* (2014a) concluíram que os PUFA não têm influência sobre os parâmetros imunológicos dos leitões pós-desmame nas concentrações de PUFA n-3 utilizada em seu estudo. Este efeito corrobora com os achados de (FLORENTE *et al.*, 2006) que relatou um efeito anti-apoptótico nos neurônios dos leitões. A suplementação de dietas com óleo de peixe a 2% foi associada com aumento na taxa de natimortalidade (TANGHE *et al.*, 2014b), porém este estudo foi realizado em duas granjas diferentes, o que pode incluir outros fatores de com potencial influência na resposta, como as características de manejo em cada granja. Por outro lado, o fornecimento de diferentes níveis de ômega-3 com concentrações variadas de

proteínas também não foi associado com a ocorrência de natimortalidade (MATEO *et al.*, 2014).

Anteriormente, Palmer *et al.* (1970) relataram um aumento no tamanho da leitegada de fêmeas suínas suplementadas com farinha de peixe. Segundo Smits *et al.* (2011) descreveram uma melhora no desempenho reprodutivo de fêmeas suínas, suplementadas com 3g de óleo de peixe, durante a gestação e lactação, o que poderia ocorrer devido a efeitos positivos sobre o ambiente uterino, favorecendo a sobrevivência e a viabilidade dos embriões. Apesar de alguns efeitos positivos sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas suínas terem ocorrido (TANGHE & DE SMET, 2013), estes foram acompanhados de alguns efeitos inconsistentes, como o prolongamento do parto nas fêmeas, além de um baixo número de animais testados. No parto subsequente à suplementação, não se observou efeito positivo dos tratamentos sobre o total de nascidos por parto. Porém, é possível que talvez em outras granjas, com os índices de desempenho inferiores, efeitos positivos sobre o tamanho total da leitegada sejam mais evidentes. Considerando os dados por Smits *et al.* (2011), que relataram aumento de um leitão no parto subsequente de fêmeas suplementadas com ômega-3 (de 9,7 para 10,7 leitões nascidos), os índices obtidos no presente estudo indicam um tamanho de leitegada superior, com média de mais de 14 leitões nascidos por parto, mesmo em fêmeas do grupo controle. Segundo Mateo *et al.* (2014), a suplementação com ômega-3 influencia apenas o peso dos leitões ao nascimento, após suplementação durante a lactação.

A avaliação dos níveis séricos de indicadores metabólicos não revelou diferença entre os diferentes tratamentos. Rovira *et al.* (2014) verificaram que fêmeas suínas suplementadas com uma dieta contendo alto teor de gordura saturada apresentaram altos níveis de triglicerídeos, o que pode afetar negativamente a viabilidade dos leitões no primeiro terço da gestação, por alterações na secreção de estradiol pelo próprio concepto durante este período, afetando também a placentação. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos diminuem progressivamente no terço final da gestação (MOSNIER *et al.*, 2010), podendo ser associadas ao crescimento posterior dos leitões, através do incremento na produção de leite, o que sugere que sua absorção pela glândula mamária antes do parto seja associada à redução nos níveis circulatórios de triglicerídeos. A redução dos níveis séricos do NEFA no início da lactação e o posterior aumento na lactação sugerem um aumento da mobilização de gordura corporal no final da

lactação (MOSNIER *et al.*, 2010). Com isso, a produção de leite aumenta durante a segunda e a terceira semanas da lactação, evidenciado pelo maior crescimento dos leitões que não tiveram acesso a alimentação complementar. Em ratos, após suplementação de fêmeas e seus filhotes com PUFA durante 12 semanas, os níveis de triglicérides nos filhotes foram reduzidos (LOMBARDI *et al.*, 2001), ocorrendo também queda nos níveis de triglicérides nas mães do grupo tratado, sem efeito sobre os níveis de colesterol.

5 Considerações Finais

A suplementação de dietas de fêmeas suínas durante o último mês da gestação, a lactação e o intervalo desmame-estro (IDE) com ômega-3 extraído de microalgas não resultou em benefício sobre a taxa de natimortalidade e a duração do IDE, bem como sobre o tamanho total da leitegada, tanto no parto no qual houve suplementação, quanto no subsequente. A ausência destes efeitos pode ter sido devido ao excelente desempenho reprodutivo da granja na qual o experimento foi conduzido. Em comparação com a lactação e o IDE, os níveis séricos de colesterol e IGF-1 foram inferiores e os níveis de ácido graxos não esterificados foram elevados durante a gestação. Os níveis de triglicerídeos também foram reduzidos durante a gestação, mas apenas em fêmeas suplementadas com 14 e 28 g de ômega-3.

Referências

ABPA. **Suinocultura**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura>>. Acesso em: 06 out. 2015

AGRINESS. **Melhores da Suinocultura**. Disponível em <<http://www.melhoresdasuinocultura.com.br/edicoes?edicao=7>>. Acesso em 22 de julho de 2014.

BRAZLE, A.E.; JOHNSON, B.J.; WEBEL, S.K.; RATHBUNAND, T.J.; DAVIS, D.L. Omega-3 fatty acids in the gravid pig uterus as affected by maternal supplementation with omega-3 fatty acids. **Journal of Animal Science**, 87, 994-1002, 2009.

CALDER, P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutrition Research**, 21, 309–341, 2001.

CAUGHEY, G.E.; JAMES, M.J.; CLELAND; L.G. 2005. **Prostaglandins and leukotrienes**. In: CABALLERO B.; ALLEN L.; PRENTICE A. (Ed). Encyclopedia of human nutrition. v. 4. Elsevier, Oxford, UK. p. 42–49.

D'ALLAIRE, S.; DROLET, R. 2006. **Longevity in breeding animals**. In: STRAW B.E.; ZIMMERMAN J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Ed). Diseases of swine (9th Ed.) Blackwell Publ. Ltd., Oxford, UK, p. 1011–1025.

DIAL, G.D.; MARSH W.E.; POLSON D.D.; VAILLANCOURT J.-P.; 1992. **Reproductive failure: differential diagnosis**. In: LEMAN A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. (Ed.). Diseases of Swine (7th Ed.) Iowa State University Press, Ames, IA, USA. p 88–137.

FLORENT, S.; MALAPLATE-ARMAND, C.; YOUSSEF, I.; KRIEM, B.; KOZIEL, V.; ESCANYÉ, M.C. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- β oligomers. **Journal of Neurochemistry**, 96, 385–395, 2006.

GULLIVER, C.E.; FRIEND, M.A.; KING, B.J.; CLAYTON, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012000565>.H. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, 131, 9–22, 2012.

INNIS, S.M. Essential fatty acids in growth and development. **Progress in Lipid Research**, 30, 39–103, 1991.

JUMP, D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, 13, 155–164, 2002.

JUMP, D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, 19, 242–247, 2008.

KURLAK, L.O.; STEPHENSON, T.J. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, 80, 148–154, 1999.

LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. **Reproduction in Domestic Animals**, 43, 623–632, 2008.

LESKANICH, C.O.; NOBLE, R.C. The comparative roles of polyunsaturated fatty acids in pig neonatal development. **British Journal of Nutrition**, 81, 87–106, 1999.

LOMBARDI, V.R.M., CAGIAO, A., FERNANDEZ-NOVOA, L., LVAREZ, X.A.A., CORZO, M.D., ZAS, R., SAMPEDRO, C., CACABELOS, R. Short term food supplementation effects of a fish derived extract on the immunological status of pregnant rats and their sucking pups. **Nutrition Research** 21, 1425–1434, 2001.

LUCIA, T., DIAL, G.D., MARSH, W.E. Lifetime reproductive performance in female pigs having distinct reasons for removal. **Livestock Production Science**, 63, 213–222, 2000.

MARTINS, D.A., CUSTÓDIO, L., BARREIRA, L., PEREIRA, H., BEN-HAMADOU, R., ABU-SALAH, K.M. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. **Marine Drugs**, 11, 2259-2281, 2013.

MATEO, R.D.; CARROLL, J.A.; HYUN, Y.; SMITH, S.; KIM, W.S. Effect of dietary supplementation of n-3 fatty acids and elevated concentrations of dietary protein on the performance of sows. **Journal of Animal Science**, 87, 948-959, 2014.

MOSNIER, E.; ETIENNE, M.; RAMAEKERES, P; PERE, M.C. The metabolic status during the peripartum period affects the voluntary feed intake and the metabolism of the lactating multiparous sow. **Livestock Science**, 127, 127–136, 2010.

NRC. National Research Council, 2012. **Nutrient Requirements of Swine**, 11th Rev. Ed. National Academy Press, Washington, DC, USA, p. 236.

PALMER, W.M.; TEAGUE, H.S.; GRIFO Jr. A.P. Effect of whole fish meal on the reproductive performance of swine. **Journal of Animal Science**, 31, 535–539, 1970.

PEREZ RIGAU, A.; LINDEMANN, M.D.; KORNEGAY, E.T.; HARPER, A.F. WATKINS, B.A. Role of dietary lipids on fetal tissue fatty acid composition and fetal survival in swine at 42 days of gestation. **Journal of Animal Science**, 73, 1372–1380, 1995.

PETIT, H.V.; DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D.; PROULX, J.G.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; TWAGIRAMUNGU, H.; MANN, G.E. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. **Journal of Dairy Science**, 85, 889–899, 2002

PIGCHAMP®. <http://www.pigchamp.com>. 2015.

QUINIOU, N.; DAGORN, J.; GAUDRÉ, D. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. **Livestock Production Science**, 78, 63–70, 2002.

RATLEDGE, C.; 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, 86, 807–815.

ROOKE, J.A.; SINCLAIR, A.G.; EDWARDS, S.A.; CORDOBA, R.; PKIYACH, S.; PENNY, P.C.; PENNY, P.; FINCH, A.M.; HORGAN, G.W. The effect of feeding salmon oil to sows throughout pregnancy on pre-weaning mortality of piglets. **Animal Science**, 73, 489–500, 2001.

ROSSI, R., PASTORELLI, G., CANNATA, S., CORINO, C. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 162, 1–11, 2010.

ROVIRA, S.T., ASTIZ, S., AÑOVER, P.G., PALLARES, P., PEREZ-GARNELO, S., PEREZ-SOLANA, M., SANCHEZ-SANCHEZ, R., GONZALEZ-BULNES, A. Intake of high saturated-fat diets disturbs steroidogenesis, lipid metabolism and development of obese-swine conceptuses from early-pregnancy stages. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 139, 130-137, 2014.

RYCKEBOSCH, E., BRUNEEL, C., MUYLAERT, K., FOUBERT, I. Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Lipid Technology**, 24, 128-130, 2012.

SMITS, R.J.; LUXFORD, B.G.; MITCHELL, M.; NOTTLE, M.B. Sow litter size is increased in the subsequent parity when lactating sows are fed diets containing n-3 fatty acids from fish oil. **Journal of Animal Science**, 89, 2731-2738, 2011.

SOEDE, N.M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs. **Animal Reproduction Science**, 124, 251–258, 2011.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1486, 219–231, 2000.

STATISTIX®. **Statistix 10 Analytical Software**. Tallahassee, FL, USA. 2013.

STILLWELL, W.; WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, 126, 1–27, 2003.

TANGHE, S.; DE SMET, S. Does sow reproduction and piglet performance benefit from the addition of n-3 polyunsaturated fatty acids to the maternal diet? **The Veterinary Journal**, 197, 560–569, 2013.

TANGHE, S.; COX, E.; MELKEBEEK, V.; DE SMET, S.; MILLET, S.; Effect of fatty acid composition of the sow diet on the innate and adaptive immunity of the piglets after weaning. **The Veterinary Journal** 200, 287–293, 2014. 2014a.

TANGHE, S.; MISSOTTEN, J.; RAES, K.; VANGEYTE, J.; DE SMET, S.; Diverse effects of linseed oil and fish oil in diets for sows on reproductive performance and pre-weaning growth of piglets. **Livestock Science** 164, 109-118, 2014. 2014b.

ULGUIM, R.R.; BIANCHI, I.; LUCIA, T. Jr. Female lifetime productivity in a swine integration system using segregated gilt development units. **Tropical Animal Health and Production**, 46, 697–700, 2014.

VICENTE, J.G., ISABEL, B., CORDERO, G., LOPEZ-BOTE, C.J. Fatty acid profile of the sow diet alters fat metabolism and fatty acid composition in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, 181, 45– 53, 2013.

WAKEFIELD, S.L.; LANE, M.; SCHULZ, S.J.; HEBART, M.L.; THOMPSON, J.G.; MITCHELL, M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 294, 425–434, 2008.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, 77, 190–201, 2007.

WHITTEMORE, C.T. 1998. **Reproduction**. In: The science and practice of pig production, 2ndEd. Blackwell Science Ltd., UK, pp. 91–130.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, 135, 683-692, 2008.

Anexo

Pelotas, 02 de abril de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor Thomaz Lucia Jr

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Influência da adição de ácidos graxos poliinsaturados na dieta de fêmeas suínas sobre fatores intrafoliculares, qualidade oocitária, parâmetros metabólicos e moleculares**”, processo nº23110.009648/2013-22, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9648).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2014

Assinatura do Professor Responsável:

