



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELDER LUIS BUCK

**EXTRATO DE PRÓPOLIS NO DESEMPENHO, EXPRESSÃO
GÊNICA, HISTOLOGIA MUSCULAR E CARGA
PARASITÁRIA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
CULTIVADAS EM TANQUES-REDE**

ELDER LUIS BUCK

**EXTRATO DE PRÓPOLIS NO DESEMPENHO, EXPRESSÃO
GÊNICA, HISTOLOGIA MUSCULAR E CARGA
PARASITÁRIA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
CULTIVADAS EM TANQUES-REDE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Produção Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ivone Yurika Mizubuti

Co-Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Buck, Elder Luis.

Extrato de própolis no desempenho, expressão gênica, histologia muscular e carga parasitária de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede / Elder Luis Buck. - Londrina, 2016.

74 f. : il.

Orientador: Ivone Yurika Mizubuti.

Coorientador: Nelson Mauricio Lopera Barrero.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2016.

Inclui bibliografia.

1. Desempenho produtivo - Tese. 2. Miostatina e fibras musculares - Tese. 3. Prevalência parasitária - Tese. 4. GIFT - Tese. I. Mizubuti, Ivone Yurika . II. Lopera Barrero, Nelson Mauricio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

ELDER LUIS BUCK

**EXTRATO DE PRÓPOLIS NO DESEMPENHO, EXPRESSÃO GÊNICA,
HISTOLOGIA MUSCULAR E CARGA PARASITÁRIA DE TILÁPIAS
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADAS EM TANQUES-REDE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Produção Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivone Yurika Mizubuti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elaine Barbosa Muniz
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE

Profa. Dra. Odimari Pricila Prado-Calixto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro das Dores Ferreira da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sandra Maria Simonelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de março de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais Luis
Mário e Dolores.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela oportunidade de estar cercado de pessoas fantásticas e de boa vontade.

Aos meus pais, Luís Mário e Dolores, pela educação, amor, carinho, pelos valores que me foram ensinados e pela paixão pelo trabalho.

Agradeço a minha esposa Letícia que com carinho e compreensão aceitou esse desafio que me propus a conquistar e pela alegria de fazer parte da minha vida.

Aos meus filhos Pedro e Heloísa por serem a fonte de alegria da minha vida e por serem a minha razão de continuar lutando.

A minha comadre Juliana (Ju) pelas conversas animadas, churrascos relâmpagos e pelo carinho que tem com a minha (nossa, por que você faz parte dela) família.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Ivone Mizubuti por acreditar em mim e na nossa loucura de conciliar trabalho e estudo.

Ao meu amigo e co-orientador Prof. Dr. Nelson Lopera pela orientação e pelas animadas conversas sobre piscicultura.

Ao Prof. Luiz Alexandre e a todos os funcionários da Universidade Estadual de Maringá por toda ajuda durante o desenvolvimento do nosso trabalho pelas conversas animadas durante os almoços no barranca do Rio do Corvo.

Aos estagiários e pós-graduandos do departamento de Zootecnia da UEL pela preciosa ajuda.

Ao amigo Rodrigo e Sara pela contribuição no trabalho com o PCR Real Time.

A Integrada Cooperativa Agroindustrial pela oportunidade de continuar estudando e acrescentar mais conhecimento ao nosso trabalho do dia-a-dia.

Ao professor Caio Abércio por ter nos ajudado com o transporte da ração de peixes até o local do experimento.

A professora Sandra Simonelli pela gigantesca ajuda com a estatística.

A todos os colegas pós-graduandos da UEM pelo auxílio com toda a parte experimental que de forma direta ou indiretamente nos ajudaram a concluir este projeto.

“Eu prefiro o impossível. Lá a concorrência é menor.”
Walt Disney

BUCK, Elder Luís. **Extrato de própolis no desempenho, expressão gênica, histologia muscular e carga parasitária de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede**. 2016. 74 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O cultivo de peixes em tanque-rede pode induzir ao estresse fisiológico, impedindo o bom desempenho do animal. A própolis pode ser utilizada como promotor de crescimento devido as suas propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e imunoestimulante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de própolis no desempenho produtivo, a expressão gênica (gene da miostatina), histologia muscular e carga parasitária de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede. Foram utilizados 300 peixes machos revertidos da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT, com peso inicial de $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$, distribuídos em delineamento fatorial (2 x 4), sendo duas dietas (DPRO-ração comercial contendo extrato etanólico de própolis a 4% e DCON- ração comercial controle sem própolis), e quatro tempos de avaliação (0, 35, 70 e 105 dias de experimento). Não houve efeito significativo de dietas sobre as variáveis estudadas ($P > 0,05$), contudo observou-se efeito significativo de tempo de avaliação sobre as variáveis peso (PC), comprimento total (CTo), altura corporal (ACo), largura corporal (Lco) e peso do filé (Pfi). Os animais que receberam DCON e DPRO apresentaram efeito linear em relação ao tempo de avaliação para as características PC, CTo e PFi, enquanto que só os alimentados com DCON tiveram comportamento de ACo foi linear. Não houve interação entre dietas e tempos de avaliação sobre a característica (Lco), porém houve efeito quadrático de tempo sobre esta característica. Não houve diferença estatística entre DPRO e DCON, quanto ao crescimento muscular. No entanto, foi observado que o número de fibras com diâmetro menor que $20\mu\text{m}$ foi maior nos animais tratados com extrato de própolis em comparação com os do grupo controle em todos os tempos avaliados. Observou-se também, que a quantidade desse tipo de fibra aumentou aos 35 e 70 dias e foi menor aos 105 dias. Aos 35 e 70 dias observaram-se mais fibras de diâmetros menores que $20\mu\text{m}$ em DPRO, contudo, aos 105 dias essa diferença foi reduzida em relação a DCON. Nesse período é observado maior número de fibras com diâmetro superior a $50\mu\text{m}$, o que caracteriza o crescimento hipertrófico. A expressão da miostatina não apresentou diferença estatística entre DPRO e DCON. Foi constatada maior expressão do gene aos 105 dias, com médias de 1,93 (DCON) e 1,89 (DPRO). Observaram-se valores crescentes de expressão gênica em DPRO e diminuição e aumento da expressão aos 35 e 105 dias em DCON. O DPRO não influenciou a prevalência, intensidade, abundância média parasitária, peso do filé e comprimento padrão. Foi observada uma melhor eficiência na carga parasitária aos 70 dias de utilização. Um provável efeito de assimilação metabólica da própolis pode ter acontecido após os 70 dias de criação. Conclui-se que o extrato etanólico de própolis a 4% na dieta de tilápias do Nilo criadas em condições de cultivo em tanques-rede não influenciou o desempenho produtivo, a expressão gênica da miostatina, o diâmetro de fibras musculares e a carga parasitária. Mais estudos deverão ser realizados para elucidar outros efeitos do produto na criação de tilápias em tanques-rede.

Palavras chave: Apiterápico. Flavonóides. Fibras musculares. Miostatina.

BUCK, Elder Luis. **Propolis extract in the performance, gene expression, muscular histology and parasite load of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred in net cages.** 2016. 74 p. Thesis (Animal Science PhD) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The fish culture in net cages can induce to the physiological stress, impeding the good performance of the animal. Propolis can be used as a growth promoter because of its antimicrobial, antiparasitic and immunostimulating properties. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of propolis extract on productive performance, gene expression (myostatin gene), muscle histology and parasitic load of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred in net cages. A total of 300 reversed male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) GIFT, with initial weight of $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$, were distributed in a factorial design (2 x 4), two diets (DPRO-commercial diet containing ethanolic extract of 4% propolis and control commercial DCON- without propolis), and four evaluation times (0, 35, 70 and 105 days of experiment). There was no significant effect of diets on the variables studied ($P > 0.05$), but there was a significant effect of the evaluation time on the variables weight (CP), total length (CTo), body height (Lco) and fillet weight (Pfi). The animals that received DCON and DPRO presented linear effect in relation to the evaluation time for PC, CTo and PFi characteristics, whereas only those fed DCON had ACo behavior was linear. There was no interaction between diets and evaluation times on the characteristic (Lco), but there was a quadratic effect of time on this characteristic. There was no statistical difference between DPRO and DCON, regarding muscle growth. However, it was observed that the number of fibers with diameter smaller than $20\mu\text{m}$ was higher in the animals treated with propolis extract than in the control group at all evaluated times. It was also observed that the amount of this type of fiber increased at 35 and 70 days and was lower at 105 days. At 35 and 70 days more fibers with diameters smaller than $20\mu\text{m}$ were observed in DPRO, however, at 105 days this difference was reduced in relation to DCON. In this period, a larger number of fibers with a diameter greater than $50\mu\text{m}$ is observed, which characterizes hypertrophic growth. Myostatin expression did not present a statistical difference between DPRO and DCON. The highest expression of the gene was observed at 105 days, with averages of 1.93 (DCON) and 1.89 (DPRO). Increasing values of gene expression in DPRO and decreased and increased expression at 35 and 105 days in DCON were observed. The DPRO did not influence the prevalence, intensity, average parasitic abundance, fillet weight and standard length. A better efficiency in parasite load was observed at 70 days of use. A likely metabolic assimilation effect of propolis may have occurred after the 70 days of creation. It was concluded that the ethanolic extract of 4% propolis in the diet of Nile tilapia grown under conditions of culture in net tanks did not influence the productive performance, myostatin gene expression, muscle fiber diameter and parasite load. Further studies should be carried out to elucidate other effects of the product in the creation of tilapia in net cages.

Key words: Apitherapy. Flavonoids. Miostatin. Muscle fibers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO B - EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT ON MYOSTATIN GENE EXPRESSION AND MUSCLE MORPHOMETRY OF NILE TILAPIA IN NET CAGES.

- Figure 1.** Photomicrography of muscle tissue of Nile tilapia (HE stain; bar 100 μm) from the control group (DCON) and the propolis treatment group (DPRO) at 0 (A and B), 35 (C and D), 70 (E and F), and 105 days (G and H). Arrow shows muscle fibers with diameter $> 20 \mu\text{m}$; asterisk indicates fibers with diameter $< 50 \mu\text{m}$ 53
- Figure 2.** Relative quantification of myostatin in fish fed diets with ethanol extract of propolis (DPRO) and control fish without propolis (DCON), at 0, 35, and 105 assessment days 54

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A - EXTRATO ETANÓLICO DE PROPOLIS NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE TILÁPIAS DO NILO CRIADAS EM TANQUE-REDE.	
Tabela 1 -	Composição química da ração comercial 35
Tabela 2 -	Valores médios de temperatura nos meses que compreenderam o período experimental e nas biometrias 37
Tabela 3 –	Médias do peso corporal, comprimento total, Altura corporal, largura corporal e peso do filé em peixes recebendo dietas contendo extrato alcoólico de própolis e dieta controle 38
Tabela 4 –	Conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência proteica (TEP) em peixes alimentados com ração contendo extrato etanólico de própolis e ração controle 40
ARTIGO B - EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT ON MYOSTATIN GENE EXPRESSION AND MUSCLE MORPHOMETRY OF NILE TILAPIA IN NET CAGES.	
Table 1.	Chemical composition of the diet..... 48
Table 2.	Characterization of identified genes, primer sequence, size of amplified product, and GenBank accession number 50
Table 3.	Diameter of muscle fibers (DM) of the Nile tilapia fed diets with propolis (DPRO) and control (DCON) at 0, 35, 70, and 105 days of assessment 52
ARTIGO C - EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT ON THE PARASITE LOAD OF NILE TILAPIAS REARED IN CAGES.	
Table 1.	Mean water temperature during the experimental..... 64
Table 2.	Prevalence of ectoparasites in the Nile tilapia (strain GIFT) for control treatment and for treatment with propolis 65
Table 3.	Mean rates of prevalence (P%), medium intensity (IM) and medium abundance (AM) of ectoparasites of the Nile tilapia for control treatment (TCON) and treatment with propolis (TPRO) on 0, 35, 70 and 105 day..... 65
Table 4.	Fillet weight (g) and standard length (CP) of Nile tilapia for control treatment (TCON) and treatment with propolis (TPRO) 66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	PRODUÇÃO DE TILÁPIA DO NILO EM TANQUE-REDE	13
2.2	PRÓPOLIS	15
2.2.1	Propriedades Químicas da Própolis	16
2.2.2	Propriedades Biológicas da Própolis	18
2.2.3	Propriedades Antimicrobianas	19
3	UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NA MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	21
3.1	UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NA PISCICULTURA.....	21
	REFERÊNCIAS	23
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	ARTIGO A	31
	EXTRATO ETANÓLICO DE PROPOLIS NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE TILÁPIAS DO NILO CRIADAS EM TANQUE-REDE	31
5	ARTIGO B	45
	EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT ON MYOSTATIN GENE EXPRESSION AND MUSCLE MORPHOMETRY OF NILE TILAPIA IN NET CAGES	45
6	ARTIGO C	60
	EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT ON THE PARASITE LOAD OF	

	NILE TILAPIAS REARED IN CAGES.....	60
7	CONCLUSÃO	72
	ANEXOS	73
ANEXO A	Documento de aprovação do projeto de pesquisa emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animaiss	75

1 INTRODUÇÃO

Em 2009, a tilapicultura foi uma das mais importantes fontes de produção de pescado no Brasil, representando 39,5% da produção total de peixes da água doce no Brasil (LOPERA-BARRERO; RIBEIRO; POVH, 2011). O grande avanço na produção de tilápias no Brasil e no mundo deve-se aos seguintes fatores: rápido crescimento e ganho de peso; facilidade de adaptar-se a diferentes condições ambientais (temperatura, salinidade, baixo oxigênio dissolvido, pH); resistência ao estresse e a doenças; facilidade de reprodução em cativeiro; alimentação em níveis tróficos baixos e aceitação de alimentos artificiais logo após a absorção do saco vitelino (EL-SAYED, 2006).

A demanda pelo pescado de tilápias tem aumentado nos últimos anos, estimulando um novo ritmo de produção com aumento da densidade animal. No entanto, isto tem aumentado o estresse e o aparecimento de infestações parasitárias e de doenças bacterianas (MARTINS et al., 2000). Considerando a crescente demanda por proteínas de alto valor biológico e de baixo custo, tem ocorrido nos últimos anos, o interesse pela utilização de aditivos naturais que não exponham os seres humanos, consumidores de pescado, à ambientes com possíveis contaminação.

Nesse cenário, há um grande esforço na tentativa de se utilizar produtos naturais como a própolis. Própolis é a substância resinosa, adesiva e de odor característico que é coletada pelas abelhas a partir de fissuras de cascas de árvores, botões foliares e exudatos (BANKOVA, 2005). Há evidências de que a utilização da própolis pode aumentar o ganho de peso e melhorar a conversão alimentar, bem como aumentar a eficiência nos peixes (ABD-EL-RHMAN, 2009).

Há que se estudar, portanto, a utilização de própolis como fator imunoestimulante e promotor de crescimento podendo auxiliar na solução de alguns problemas, favorecendo o equilíbrio no processo de produção aliado à qualidade de produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE TILÁPIA DO NILO EM TANQUE-REDE

A expansão da aquicultura brasileira foi impulsionada a partir de 1950, pela modernização dos meios de transportes e comunicação, pelo aperfeiçoamento da reprodução artificial e pelo progresso na área de nutrição animal, que possibilitou o desenvolvimento de alimentos balanceados, bem como os avanços na área da genética (CAMARGO; POUHEY, 2005).

O Brasil produziu em 2014, 475 mil toneladas de peixes em cativeiro, sendo o valor total da produção de R\$ 2,8 bilhões. Estima-se que a aquicultura brasileira possa dobrar o seu volume de produção na próxima década, atingindo até 960 mil toneladas de peixes de cativeiro em 2022. Neste cenário, as tilápias são as primeiras colocadas na produção brasileira de peixes de cativeiro. Em 2014, a produção brasileira de tilápias foi de 198 mil toneladas, representando 41% da produção total de peixes da água doce desse ano (IBGE, 2014).

A tilápia, nome comum dado aos vários gêneros de ciclídeos de água doce, dentre eles os gêneros *Oreochromis* e *Tilapia*, compõem o grupo de peixes que mais crescem em termos de comercialização mundial (HEMPEL, 2002). São nativos da África, Israel e Jordânia, e se espalharam pelo mundo nos últimos 50 anos, sendo produzidos em mais de 100 países com diferentes climas, sistemas de produção e salinidades, devido a sua fisiologia adaptativa, biologia reprodutiva, plasticidade genética, fácil domesticação e comercialização (ZIMMERMANN; FITZIMMONS, 2004). 80% das tilápias produzidas no mundo são da espécie nilótica (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2006). A tilápia do Nilo foi implantada no Brasil em 1971 e em 1996 foram trazidos exemplares da população Chitralada, vindas da Tailândia, dando dessa forma um novo impulso a tilapicultura intensiva no Brasil (ZIMMERMANN; FITZIMMONS, 2004).

Os tanques-rede são estruturas de tela ou rede, fechadas de todos os lados, que retêm os peixes e permitem a troca completa de água, de forma a remover os metabólitos e fornecer oxigênio aos peixes confinados (KUBITZA, 2011). A produção de peixes em tanque-rede possibilita o aproveitamento de parte dos recursos hídricos disponíveis, evitando assim o desmatamento de grandes áreas e a movimentação de terras, preservando o solo dos problemas de erosão e assoreamento de rios e lagos, que pode ocorrer no sistema de produção em tanques escavados (MARENGONI, 2006). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem

grande preferência por parte dos produtores neste tipo de cultivo. Isto se deve principalmente por suas características biológicas e ecológicas que lhes conferem alta tolerância às condições adversas, além de ser uma espécie com ótima aceitação no mercado (KUBITZA, 2011).

As vantagens do cultivo de peixes em tanques-rede em relação aos outros processos de cultivo de peixes são: menor variação dos parâmetros físico-químicos da água durante a criação; maior facilidade de retirada dos peixes para venda (despesca); menor investimento inicial (70% menor do que viveiros convencionais); facilidade de movimentação e relocação dos peixes; intensificação da produção pela alta densidade de estocagem; facilidade de observação dos peixes, melhorando o manejo; redução do manuseio dos peixes; e, diminuição dos custos com tratamento de doenças (MARENGONI, 2006). Aparentemente a maior desvantagem do sistema de criação de peixes em tanques-rede são as alterações na qualidade da água. Durante o processo de produção piscícola é inevitável o acúmulo de resíduos orgânicos e metabólicos nos tanques e viveiros. O volume de fezes excretado diariamente pela população de peixes é uma das principais fontes de resíduos orgânicos em sistemas aquícolas (GUO; LI, 2003).

O maior impacto causado pela piscicultura em tanques-rede corresponde ao aumento nas concentrações de fósforo, nitrogênio e matéria orgânica, tanto na água quanto no sedimento. 13% do nitrogênio e 66% do fósforo ofertados pela ração sofre sedimentação sendo que 25% do nitrogênio e 23% do fósforo são convertidos em carne, e 62% de nitrogênio e 11% de fósforo são dissolvidos na água (FOLKE; KAUTSKY, 1992; GUO; LI, 2003).

O incremento de matéria orgânica favorece o processo de eutrofização, que pode comprometer o sistema de cultivo em decorrência da redução da concentração de oxigênio dissolvido e o aumento de nutrientes na água, podendo ocasionar aumentos de algas e bactérias. Estes microrganismos são produtores de toxinas e de compostos odoríferos trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (geosmina) e 2-metilisoborneol, os quais conferem sabor de barro e ocorrência de off-flavor, depreciando o pescado para sua comercialização (ZAT; BENETTI, 2011).

Alguns estudos evidenciam que em instalações de produção em larga escala, onde os peixes são expostos às condições estressantes relacionados a doenças e deterioração das condições ambientais, frequentemente apresentam graves perdas econômicas, sendo que a prevenção e controle de doenças destes animais levam a aumento substancial da utilização de medicamentos de uso veterinário (BALCÁZAR et al., 2006; KUBITZA, 2011).

Entretanto, quando são adotadas boas práticas de produção e manejo

alimentar dos peixes, pode-se minimizar os efeitos da intensificação da estocagem de peixes pelo sistema de criação em tanques-rede. Mallasen et al. (2012) trabalharam com sistema de piscicultura em tanques-rede no reservatório de Ilha Solteira e concluíram que a atividade produtiva foi capaz de provocar perturbações de baixa intensidade na qualidade da água sem, entretanto, comprometer o ambiente aquático, pois o corpo hídrico foi eficiente na capacidade de assimilação das perturbações na qualidade da água provocadas pelo processo de produção empregado.

O aumento da demanda por pescado promoveu a tendência atual de desenvolvimento de sistemas de piscicultura intensivo, altamente produtivo, sustentável e lucrativo que demanda a adoção de estratégias de produção como o ajuste de densidade de estocagem de peixes e o uso de rações com balanceadas com critérios adequados de modelagem biológica a partir de mecanismos de compensação fisiológica espécie-específico (CYRINO et al., 2010).

2.2 PRÓPOLIS

Própolis é o nome dado à substância resinosa e balsâmica, que possui coloração e consistência diversas, variando de marrom ao verde escuro e de odor característico, produzido pelas abelhas. É constituída por substratos extraídos de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais e exudatos resinosos, sendo transportados para dentro da colmeia onde as abelhas adicionam secreções salivares (MARCUCCI, 1995; BANKOVA, 2005).

O termo própolis é proveniente do idioma grego, em que o prefixo “pro” significa “em prol de”, ou “em defesa de”, enquanto que o sufixo “polis” significa “cidade”. Assim, a própolis tem a função de “defender a cidade”, no caso, a colmeia (GHISALBERTI, 1979).

Os antigos egípcios utilizavam a própolis como produto para embalsamar as múmias devido a sua ação antiputrefativa. Romanos e gregos, como Galeno e Aristóteles a utilizavam por suas propriedades medicinais e os incas tinham o conhecimento de sua ação antipirética. Foi também empregada como antisséptico e cicatrizante em feridas, o seu uso foi perpetuado durante a Idade Média pelos povos europeus e árabes (CAPASSO; CASTALDO, 2002).

Nos dias atuais a própolis é empregada em produtos farmacêuticos e cosméticos, na alimentação em conjunto com outros produtos apícolas como o mel e a geleia

real (VIUDA-MARTOS et al., 2008), além de ser empregada na fabricação e manutenção de instrumentos musicais desde o século XVII (VAN KETEL; BRUYNZEEL, 1992).

A própolis começou a ser utilizada em tratamento de problemas de saúde nas décadas de 1950 e 1960 na ex-União Soviética e em países do Leste da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia. Na metade dos anos 80, a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar. O Japão é o principal importador, com especial preferência pela própolis brasileira (SALATINO et al., 2005).

Os países de clima predominantemente temperado não possuem em sua flora, plantas que produzem a substância resinosa fortemente adesiva, que é coletada e transformada pelas abelhas. O Brasil possui grande variedade de plantas produtoras de resina, portanto é grande produtor de diversos própolis, como a própolis verde ou marrom esverdeada, amarela, amarela escura, castanho escuro, castanho claro e mais recentemente a vermelha (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; TRUSHEVA et al., 2006).

2.2.1 Propriedades Químicas da Própolis

A própolis tem complexa composição química e seus componentes variam dependendo da origem vegetal. Normalmente é composta de 50% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos vegetais, 5% de pólen e 5% de impurezas (MARCUCCI, 1995). O seu ponto de fusão varia entre 60 a 70 °C, podendo atingir até 100 °C. Ao redor de 15 °C, a própolis é dura, tornando-se maleável a partir de 30 °C. Sua parte solúvel é dividida em: materiais cerosos (média de 30%), bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (média de 60%); e a parte insolúvel é constituída principalmente de matéria orgânica, tecidos vegetais, grãos de pólen e outras substâncias (MARCUCCI, 1996).

Mais de 200 compostos químicos na própolis já foram identificados: os flavonoides como a apigenina, galangina, quercetina, pinocembrina e campferol, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico), aminoácidos (arginina, prolina), polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, ácidos benzoicos (cafeico, cumárico e ferúlico), aminoácidos especialmente arginina e prolina, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, vanádio, silício, magnésio, titânio, bromo e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; SOUSA et al., 2007).

Atribui-se a ação antibacteriana, antiviral, antioxidante, antifúngica, anti-

inflamatória, hepatoprotetora, antitumoral, imunomodulador e antiprotozoário da própolis aos compostos flavonoides. Esse sucesso de resultados em vasta possibilidade de aplicação se deve a ação sinérgica destes compostos (MARCUCCI et al., 2001). Porém, há controvérsia em relação ao teor de flavonoides nas amostras brasileiras (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Segundo Bankova et al. (1995) as própolis brasileiras têm baixa concentração de flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos.

No Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distinta para diferentes amostras, coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Amostras de própolis originárias de diferentes regiões geográficas, mesmo contendo composições químicas distintas, podem exercer o mesmo tipo de atividade biológica, e em alguns casos, estas atividades não apresentam diferenças significativas em sua efetividade. É importante detalhar a composição química e as propriedades biológicas da própolis a fim de identificar e especificar as distintas amostras de existentes (BANKOVA, 2005).

Os compostos fenólicos presentes na própolis são substâncias que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila, ligado diretamente a um anel aromático. Os ácidos fenólicos são constituídos por um núcleo básico hidroxifenilpropenoico e são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3). O terceiro grupo é representado pelos ácidos fenólicos que, além de se apresentarem sob uma forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos (SOARES, 2002).

A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido cafeico, que associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002). Nos produtos de origem apícola os ácidos fenólicos mais comuns são o ácido gálico, p-cumárico, cafeico, ferúlico e siríngico (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos

de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6 (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999).

Mais de 4 mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides já foram identificadas. A explicação para a existência de grande diversidade de compostos é devido às reações químicas que esses compostos estão sujeitos, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação e sulfatação entre outras (KOES et al., 1994).

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/ malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição ao anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavononas, flavonóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (LOPES et al., 2000).

Os flavonoides são classificados em: flavonas, flavonóis, dihidroflavonoides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrerem como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (ANGELO; JORGE, 2007).

Existe na própolis e em seus extratos uma variedade de constituintes que são comuns em outros alimentos, alguns dos quais também com atividades biológicas. Destas substâncias com propriedades biológicas, a que mais contribui para os efeitos terapêuticos da própolis são os flavonoides (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; LOPES et al., 2000).

2.2.2 Propriedades Biológicas da Própolis

Diversas capacidades da própolis vêm sendo descobertas, entre elas, especialmente, a antioxidante, anti-inflamatória e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora, antiulcerativa, ações antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2000).

As propriedades farmacológicas da própolis são atribuídas, principalmente, à presença de flavonoides (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). Os flavonoides não interferem apenas na propagação da reação, como também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição, quanto pela inibição de enzimas envolvidas na

inicialização da reação (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). A ação antioxidante se deve ao fato de que os flavonoides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). A glicosilação dos mesmos torna a molécula menos reativa frente aos radicais livres, porém mais hidrossolúvel (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Uma das propriedades biológicas da própolis popularmente conhecida é a sua atividade anti-inflamatória. Hu et al. (2005) observaram que o extrato aquoso e etanólico de própolis diminuíam a extensão da resposta inflamatória através da inibição da produção de prostaglandina e de óxido nítrico, além de possível impedimento da ativação de macrófagos. Outro mecanismo pelo qual a própolis pode conter a inflamação seria através da diminuição da produção de citocinas pró inflamatórias (SY et al. 2006).

A própolis pode exercer importante ação na indução da resposta imune humoral. Experimentos com extrato etanólico de própolis demonstraram que a própolis estimula a produção de anticorpos por camundongos BALB/c imunizados com hemácias de carneiro. (SCHELLER et al., 1988; SFORCIN; ORSI; BANKOVA, 2005).

Fischer et al. (2007) demonstraram que a própolis pode ser um importante adjuvante em vacina contra o vírus da herpes suína tipo 1 (SuHV-1) quando associada com hidróxido de alumínio, estimulando tanto a atividade humoral (através da neutralização de anticorpos) quanto a atividade celular em camundongos (através da indução de mRNA de IFN- γ por células esplênicas).

2.2.3 Propriedades Antimicrobianas

A própolis é um produto natural com ação antimicrobiana (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000) e os compostos responsáveis por esta ação são, principalmente, a flavonona pinocembrina, o flavonol galagina e o éster feniletil do ácido cafeico, com mecanismo de ação baseado, provavelmente, na inibição do RNA-polimerase bacteriano (UZEL et al., 2005).

Scazzocchio et al. (2005) descreveu que o ácido benzoico (ácido cafeico) e ácido cinâmico agem na membrana ou parede celular do micro-organismo, causando danos funcionais e estruturais. A própolis tem ação bacteriostática sobre bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas, aparentemente pela modificação do status bioenergético da membrana bacteriana e pela inibição de sua motilidade (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997). Em experimento *in vitro* com extrato de própolis a 50%, as bactérias gram-

positivas foram mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado, do que as Gram-negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, a bactéria *Nocardia asteroides* (Gram-positiva) foi sensível em 100% e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) apresentou sensibilidade de 72,41% ao extrato de própolis (VARGAS et al., 2004).

O uso do extrato etanólico de própolis apresentou significativa atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas de peixes (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia rucker* e *Streptococcus iniae*). Houve inibição do crescimento de todos os patógenos, com maior atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, notadamente na *Streptococcus iniae* (TUKMECHI; OWNAGH; MOHEBBAT, 2010).

Na odontologia, pesquisou-se a inclusão da própolis em fórmulas para produtos de higiene e limpeza bucal como forma de controle e prevenção de cáries, tratamento de gengivites, estomatites, halitose, eczema, infecções na garganta (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002). Alguns pesquisadores sugeriram que o consumo terapêutico de própolis pode ter um efeito inibidor/preventivo de úlceras gástricas por meio da inibição do crescimento da *Helicobacter pylori*, já que esta bactéria é reconhecidamente associada a estas úlceras (BOYANOVA et al., 2005).

3 UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NA MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Profissionais das áreas de Medicina Veterinária e de Zootecnia vêm descobrindo as propriedades terapêuticas e zootécnicas da propolis. Na Medicina Veterinária a propolis foi testada como medicamento em casos de pododermite necrótica em ovinos (TONHASCA, 1988); coccidiose em coelhos (HOLLANDS et al., 1984, MOURA et al., 1998); pneumonia em bezerros (RODRIGUEZ, 1989); enterites catarral, fibrinosa e hemorrágica em bezerros (FUMERO, 1989; GARCIA; HERNANDEZ, 1989); enfermidade de Aujeszky e de New Castle (MACHADO et al., 1989); entre outros, sendo que em todos os trabalhos foram confirmadas a sua ação terapêutica.

É grande a aplicação da propolis na área da zootecnia. Em suinocultura e avicultura, os resultados da utilização de propolis demonstraram sua ação em melhorar o ganho de peso e conversão alimentar, bem como a prevenção de desordens digestivas (BUHATEL et al. 1983; SANCHEZ; GALARDI, 1989). Trabalhos realizados com cordeiros demonstraram que o extrato etanólico de propolis reduziu o consumo de matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutra (LANA; CAMARDELLI; QUEIROZ, 2005; LOUREIRO et al., 2007).

Em vacas leiteiras, a utilização de 19,2 g de propolis/animal promoveu aumento da proteína do leite devido ao acréscimo de aminoácidos na glândula mamária (FREITAS et al., 2009; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

3.1 UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NA PISCICULTURA

Na criação de peixes, a água de má qualidade predispõe os peixes ao estresse, tornando-os mais sensíveis às enfermidades em geral. Isso porque o estresse afeta sensivelmente o equilíbrio fisiológico, com consequente alteração no sistema imunológico, favorecendo o surgimento de surtos epizooticos. Esse fator é particularmente importante no caso de pisciculturas intensivas, nas quais as cargas de peixes por metro cúbico podem atingir níveis extremamente elevados, chegando a cerca de 60 kg/m³ (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

A utilização de antibióticos de maneira indiscriminada pode acarretar o surgimento de resistência estes medicamentos, além de deixar resíduos na carne do pescado e no ambiente (WESTON, 1996). Um dos mais promissores métodos para controle de doenças na aquicultura é o fortalecimento dos mecanismos de defesa do peixe pela administração

profilática de imunostimulantes (ROBERTSEN, 1999).

Arauco, De Stéfani e Nakaghi (2007) observaram o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). A metamorfose dos girinos foi mais acelerada quando os mesmos receberam própolis, sendo os monócitos, o grupo leucocitário influenciado pela própolis que, nas doses de 0,2 e 0,5%, apresentaram as maiores concentrações, diferindo do grupo-controle e da dose de 1,5%.

Segundo Abd-El-Rhman (2009), trabalhando com *Oreochromis niloticus* observaram que a utilização do extrato etanólico de própolis adicionados a ração de peixes, aumentou consideravelmente a contagem dos linfócitos e monócitos além de aumentarem a atividade da lisozima. Constataram ainda melhores resultados de conversão alimentar e crescimento com o uso da própolis em comparação com o grupo controle. De acordo com Deng et al., (2011) a inclusão na dieta de 2-4 g/kg⁻¹ de extrato etanólico de própolis melhorou significativamente o desempenho do crescimento e eficiência alimentar da truta arco-íris. Além disso, a suplementação com 1 a 4 g extrato etanólico de própolis/kg⁻¹ aumentou a lisozima, mas diminuiu os níveis de malondialdeído e os triglicéridos do plasma e atividades de AST e ALT, indicando o potencial de uso do extrato etanólico de própolis como promotor de crescimento, agente hepatoprotetor, e imunostimulante inespecífico.

Alguns pesquisadores afirmaram que a suplementação de própolis na ração para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e truta marrom (*Salmo trutta*), não só reduz a mortalidade das ovas desses peixes bem como promove maior desenvolvimento muscular quando comparado ao grupo controle (VELOTTO et al., 2010). Entretanto, Meurer et al. (2009) trabalhando com concentrações crescentes, até 3,65 g/kg, de própolis do Serra do Araripe da região do Cariri, Estado do Ceará, em alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) não encontraram diferenças significativas no comprimento total, comprimento padrão, comprimento de cabeça, rendimento de carcaça com cabeça e carcaça sem cabeça.

A própolis é uma importante alternativa de aditivo natural na alimentação de peixes estuários ou de águas continentais, sendo importante objeto de estudo e utilizada em diferentes espécies aquáticas com fins comerciais (ANDRADE et al., 2012; BAE et al., 2012; DENG et al., 2011; VELOTTO et al., 2010).

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-RHMAN, A. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 27, n. 3, p. 454-459, 2009.
- ANDRADE, N. P. C.; SILVA, E. M. S; MOTA, R. A.; VESCHI, J. L. A.; RIBEIRO, M. F.; KREWER, C. C.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixe. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 9-15, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAUCO, L. R. R.; DE STÉFANI, M. V.; NAKAGHI, L. S. O. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Acta Scientiarum: Animal Science**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 227-234, 2007.
- BAE, J-Y.; PARK, G. H.; LEE, J-Y.; OKORIE, E. O.; BAI, S.C. Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 20, p. 513-523, 2012.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173-186, 2006.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand, v. 2, n. 1, p. 29-32, Mar. 2005.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Tubingen, v. 50, n.1-3, p. 167-172, 1995.
- BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASSTEV, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, n. 5, p. 481-483, 2005.
- BUHATEL, T.; VESA, S.; DIMITRIN, A.; MOLDOVAN, I. Contributii la cunoasterea actiunii biostimulatoare a propolisului asupra tincturului porcini si aviar. **Buletinul Institutului Agronomic**, Romania, v. 37, n. 1, p. 45-48, 1983.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. A. Aquicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, 2005.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 1, p. S1-6, 2002.

CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68-87, 2010.

DENG, J.; AN, Q.; BI, B.; WANG, O.; KONG, L.; TAO, L.; ZHANG, X. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 959-967, Dec. 2011.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. Alexandria: Alexandria University, 2006.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Aquaculture production statistics 2000- 2005**. Rome: FAO, 2006.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. D. E. O, DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. Vaccine, Amsterdam, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, Jan. 2007.

FOLKE, C.; KAUTSKY, N. Aquaculture with its Environment; Prospects for Sustainability. **Ocean and Coastal Management**, v.17, p. 5-24, 1992.

FREITAS, J. A.; ANTONANGELO, R. P.; RIBEIRO, J. L.; JOSLIN, M.; NOGUEIRA, S. R. P.; SOUZA, J. C. Extrato etanoico de própolis na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 333-343, 2009.

FUMERO, A. P. Diarrea infecciosa del ternero: resultados preliminares de los tratamientos con NB-1 (una modificación de CNB-R5). In: INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1989, Varadero. **Anais...** Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba, p. 150-151, 1989.

GARCIA, M.; HERNANDEZ, R. Aplicación de propolina en las enteritis en terneros. In: INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1989, Varadero. **Anais...** Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, Cuba, p. 108-112, 1989.

GHISALBERTI, E. L. **Propolis**: a review. *Bee World*, Bucks, v. 60, p. 59-84, 1979.

GUO, L.; LI, Z. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China. **Aquaculture**, v. 226, p.201-212, 2003.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. (Ed.). *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HEMPEL, E. Tilapia, the new whitefish. **Seafood International**, London, v. 17, n. 10, p.16-20, 2002.

HOLLANDS, I.; MIYARES, C.; SIGARROA, A.; PEREZ, A. Efficacy of propolis against infection by intestinal *Eimeria* in rabbits. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, La Habana, v. 5, n. 1, p. 157-163, 1984.

HU; F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 3, p. 276-283, 2005.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/biblioteca/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2015.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **Bioessays**, Cambridge, v. 16, n. 12, p. 123-132, 1994.
KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. 2. ed. Jundiaí, 2011.

LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; QUEIROZ, A. C. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 650-658, 2005.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A. **Produção de organismos aquáticos**: uma visão geral no Brasil e no mundo. Guaíba: Agrolivros, 2011.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. PINTO, A. S. Flavonoides. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOUREIRO, C. M. B.; SILVA SOBRINHO, A. G.; SANTANA, A. E.; LEÃO, A. G.; PEREZ, H. L.; BUZZULINI, C. Eficácia do extrato de própolis no controle de helmintoses de cordeiros naturalmente infectados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007.

MACHADO, J. M. et al. Acción del propoleo contra algunos virus de los animales. In: ASIS, M. Investigaciones cubanas sobre el propoleo: memorias del 1 o Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humana y animal, 1988. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, p. 147-148, 1989.

MALLASEN, M.; CARMO, C.F.; TUCCI, A.; BARROS, H.P.; ROJAS, N.E.T.; FONSECA, F.S.; YAMASHITA, E.Y. Qualidade da água em sistema de piscicultura em tanques-rede no reservatório de Ilha Solteira, SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, n.1, p.15-30, 2012.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, London, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, n. 1, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 529, 1996.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, p. 3-8, 1998.

MARENGONI, N. G. Produção de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.210, p.127- 138, 2006.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. C. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, p. 545-552, 2000.

MEURER, F.; COSTA, M. M.; BARROS, D. A. D.; OLIVEIRA, S. T. L.; PAIXÃO, P. S. B. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, p. 603-608, 2009.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, London, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MOURA, L. P. P.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; FRANCO, S. L.; RIBEIRO, M. C. M. Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocistos por grama de fezes de *Eimeria* spp. em coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 325-30, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 2-7, 2000.

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

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, Juiz de Fora, v. 73, n. 1, p. S7-S20, 2002.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBERTSEN, B. Modulation of non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 9, n. 4, p. 269-90, May 1999.

RODRIGUEZ, R. Neumonía del ternero: efecto clínico de los antibióticos NB-2, variante del CNB-A17, y la oxímicina comercial. In: INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1989, Varadero. Anais... Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba, 1989. p. 149-150.
RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, Juiz de Fora, v. 73, p. S21-S29, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANCHEZ, M.; GALARDI, R. Influencia del propoleo en la conversión de lechones destetados. In: INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1989, Varadero. Anais... Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba. p. 211-214. 1989.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, Jena, v. 4, n. 1, p. 327-333, 2005.

SCHELLER, S.; GAZDA, G.; PIETZ, G.; GABRYS, J.; ECKERT, L.; SHANI, J. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. **Pharmacological Research Communication**, New York, v. 20, n. 4, p. 323-8, Apr. 1988.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 98, n. 3, p. 301-5, Apr. 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1086-1092, 2004.

SY, L. B.; WU, Y. L.; CHIANG, B. L.; WANG, Y. H.; WU, W. M. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, n. 7, p. 1053-60, Feb. 2006.

TONHASCA, J. G. **Utilização da própolis (pasta e solução) no tratamento curativo da pododermite necrótica em ovinos**. 1988. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.

TRUSHEVA, B.; POPOLVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 3, n. 2, p. 249-254, Jun. 2006.

TUKMECHI, A.; OWNAGH, A.; MOHEBBAT, A. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1086-1092, 2010.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, Jena, v. 160, n. 1, p.1 89-195, 2005.

VAN KETEL, W. G.; BRUYNZEEL, D. P. Occupational dermatitis in an accordion repairer. **Contact Dermatitis**, Hamilton, v. 27, p. 186, 1992.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan./fev. 2004.

VELOTTO, S.; VITALE, C.; VARRICHIO, E.; CRASTO, A. Effect of propolis on the fish muscular development and histomorphometrical characteristics. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 79, p. 543-550, 2010.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, própolis and royal jelly. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 117-23, Nov. 2008.

WESTON, D. P. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: BAIRD, D.; BEVERIDGE, M. V. M.; KELLY, L. A.; MUIR, J. F. (Ed.). **Aquaculture and water resource management**. Oxford: Blackwell., p. 140-65, 1996.

ZAT, M.; BENETTI, A.D. Remoção dos compostos odoríferos geosmina e 2- metilisoborneol de águas de abastecimento através de processos de aeração em cascata, dessorção por ar e nanofiltração. **Engenharia sanitária e ambiental**, v.16, n.4, p.353 360, 2011.

ZIMMERMANN, S.; FITZMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Campo Belo: Tecart, p. 239-265, 2004.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com extrato etanólico de própolis no desempenho, expressão gênica, histologia muscular e carga parasitária de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis sobre o desempenho produtivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede.
- Avaliar o efeito do extrato de própolis na expressão gênica da mioestatina e na morfometria muscular em tilápias (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede.
- Avaliar o efeito do extrato de própolis na carga parasitária de tilápias (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede.

4 ARTIGO A

EXTRATO ETANÓLICO DE PROPOLIS NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE TILÁPIAS DO NILO CRIADAS EM TANQUE-REDE

PROPOLIS ETHANOLIC EXTRACT ON PRODUCTIVE PERFORMANCE OF NILE TILAPIA RAISED IN NET CAGES

RESUMO

O cultivo de peixes em tanque-rede pode induzir ao estresse fisiológico, impedindo o bom desempenho do animal. A própolis tem sido utilizada na aquicultura como promotor de crescimento e para estimular a imunidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da própolis no desempenho produtivo de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. Foram utilizados 300 animais machos revertidos de *O. niloticus*, variedade GIFT, com peso inicial de $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$, em delineamento fatorial (2 x 4), sendo duas dietas: dietas contendo extrato etanólico de própolis a 4% (DPRO), e dietas controle, sem própolis (DCON); e quatro avaliações (0, 35, 70 e 105 dias de experimento). Os peixes foram distribuídos em 10 tanques-rede de 1m^3 . Os parâmetros avaliados foram: peso (PC), comprimento total (Cto), altura corporal (Aco), largura corporal (Lco), peso do filé (Pfi), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência proteica (TEP). As avaliações foram realizadas em 15 animais por tratamento de forma aleatória. Não houve efeito significativo de dietas sobre as variáveis estudadas ($P > 0,05$), contudo observou-se efeito significativo de tempo de avaliação sobre as variáveis PC, CTo, ACo, LCo e PFi ($P < 0,001$). Os animais que receberam DCON e os que receberam DPRO apresentaram efeito linear significativo ($P < 0,001$) em relação ao tempo de avaliação para as características PC, CTo e PFi. Para a característica ACo, foi observado que quando os animais receberam DCON, o comportamento dessa variável foi linear ($P < 0,001$). Não houve interação entre dietas e tempos de avaliação sobre a característica (Lco), porém houve efeito quadrático de tempo sobre esta característica ($Y = 2,2 + 0,05x - 0,0003x^2$; $R^2 = 0,84$). Os animais tratados com DCON não apresentaram efeito significativo para as características CA e TEP em relação ao tempo de avaliação ($P > 0,05$). Os resultados foram diferentes para os animais que receberam DPRO em que constatou-se comportamento linear crescente ($P < 0,001$). Independente da dieta recebida houve comportamento linear decrescente ($P < 0,001$) para a característica TCE em relação ao tempo de avaliação. Os resultados sugerem que o extrato etanólico de própolis a 4% na dieta não foi eficaz como promotor de crescimento para Tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Promotor de crescimento. Apiterápico. Flavonóides. Piscicultura.

ABSTRACT

Fish cultivation in cages can induce physiological stress, preventing good performance of animal. Propolis has been used in aquaculture as a growth promoter and to stimulate immunity. The objective of this study was to evaluate the effect of propolis on the productive performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in cages. 300 male reversed animals, *O. niloticus*, GIFT variety, with initial weight of $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$, were used, in a factorial design (2 x 4), two diets: diets containing propolis ethanol extract 4 % (PROD), and control diet, without propolis (COND); and four evaluations (0, 35, 70 and 105 days of experiment). Fish were distributed in 10 cages of 1m^3 . The parameters evaluated were: body weight (BW), total length (TLE), body height (BHE), body width (BWI), fillet weight (FIW), feed conversion (FC), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER). Evaluations were randomly performed on 15 animals per treatment. There was no significant effect of diet on the studied variables ($P>0.05$), however there was a significant effect of evaluation time on BW variables, BHE, LCO and FIW ($P<0.001$). Animals receiving COND and receiving PROD showed a significant linear effect ($P<0.001$) compared to the evaluation time for the BW, TLE and FIW. For BHE characteristic was observed when animals received COND, the behavior of this variable was linear ($P<0.001$). There was no interaction between diets and evaluation times of the characteristic (WCO), but there was a quadratic effect of time on this characteristic ($Y= 2.2+0.05x-0.0003x^2$; $R^2 = 0.84$). Animals treated with COND no presented significant effect to the FC and PER characteristics in relation to the evaluation time ($P>0.05$). The results were different for animals receiving DPRO in which it was observed linear increase ($P<0.001$). Independe of diet, there was a linear decrease ($P<0.001$) for SGR characteristic in relation to the evaluation time. The results suggest that the ethanolic extract of propolis 4% in diet was not effective as growth promoter in Nile Tilapia.

Key words: Growth promoter. Apitherapy. Flavonoids. Fish farming.

Introdução

A produção mundial de peixes em 2001 foi de 34,6 milhões de toneladas, passando para, 59,9 milhões de toneladas em 2010, sendo, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) considerada como a sétima espécie mais produzida (FAO, 2012). Em 2014, a produção brasileira de tilápia foi de 198 mil toneladas, representando 41% da produção total de peixes de água (IBGE, 2014).

A intensificação da produção de pescado em cativeiro tem levado a utilização de sistemas de criação em altas densidades, como a criação em tanque-rede. Esse sistema de criação tem como vantagem a facilidade de implantação de projetos e de determinados manejos, porém pode desencadear maior estresse devido ao contato mais próximo entre os peixes, o que pode levar às perdas na produção com o aparecimento de doenças e menor aproveitamento da alimentação (KUBITZA, 2011).

Promotores de crescimento como antibióticos e quimioterápicos são usados na tentativa de diminuir o risco de perdas em produções com altas densidades. Entretanto, esses produtos são evitados em muitos países em que o mercado consumidor exige alimentos de alta qualidade, de alta segurança e livres de resíduos químicos (TELLI et al., 2014), estimulando a pesquisa de produtos alternativos aos antibióticos e quimioterápicos. Substâncias como os probióticos e prébióticos tem sido utilizados como promotores de crescimento, moduladores do sistema imune, inibidores de organismos patogênicos e com a finalidade de aumentar a tolerância ao estresse (WANG et al., 2008). Neste sentido, a própolis também tem sido estudada como substância alternativa na aquicultura.

Própolis é a substância resinosa, adesiva e de odor característica, coletada pelas abelhas a partir de fissuras de cascas de árvores, botões foliares e exsudatos (BANKOVA, 2005). Possui complexa composição química e seus componentes variam dependendo da origem vegetal. Normalmente, a própolis é composta de 50% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos vegetais, 5% de pólen e 5% de impurezas. Mais de 200 compostos químicos já foram identificados na própolis: flavonoides como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides (ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico), aminoácidos (arginina, prolina), polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros compostos em pequenas quantidades (MARCUCCI, 1996).

Atualmente a própolis tem sido utilizada com sucesso como promotor de crescimento e imunomodulador em diversas espécies de peixes em condições de laboratório, inclusive como promotor de defesas imunológicas (ABD-EL-RHMAN, 2009; BAE et al., 2012; DENG et al., 2011). No entanto, em condições de campo, os animais são frequentemente submetidos ao estresse, como variações de temperatura, manejo e presença de predadores. Os efeitos de produtos sobre o ganho de peso dos animais criados a campo podem apresentar variações quando comparados às avaliações em condições controladas. Poucos estudos tem sido conduzido para avaliar os efeitos da própolis em condições de cultivo a campo (AGOSTINHO, 2010).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do extrato etanólico de própolis no desempenho de tilápias do Nilo cultivadas em tanques-redes.

Material e Métodos

O experimento foi executado no campus regional da Universidade Estadual de Maringá, localizado em Diamante do Norte, especificamente no rio do Corvo (22°36'S e 52°50'W), afluente do rio Paranapanema e tributário do reservatório da hidrelétrica de Rosana, que delimita os municípios de Diamante do Norte e Terra Rica, ambos no Estado do Paraná.

Foram utilizados 300 peixes machos revertidos da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT, com peso inicial de 170 g \pm 25 g, distribuídos em delineamento fatorial (2 x 4), sendo duas dietas (DPRO-ração comercial contendo extrato etanólico de própolis a 4% e DCON- ração comercial controle sem própolis), e quatro tempos de avaliação (0, 35, 70 e 105 dias de experimento). O período experimental total foi de 105 dias com 10 dias para a adaptação dos animais.

Para iniciar o experimento, todos os peixes foram pesados, separados e colocados em 10 tanques-redes de 1 m³, em densidade de 30 peixes por tanque. Os tanques-rede foram dispostos em uma só linha, intercalando-se um tanque com peixes recebendo DPRO e um tanque com peixes recebendo DCON.

Durante todo o experimento, a temperatura da água foi monitorada com mensurações em três pontos da linha dos tanques-rede, em duas tomadas diárias (9:00 e 18:00 horas).

Extratos de Própolis e Dietas

Utilizou-se o extrato de própolis alcoólico a 4%, elaborado pelo Laboratório de desenvolvimento e controle de qualidade de fitoterápicos e apiterápicos do departamento de farmácia e farmacologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, segundo o protocolo adaptado de Franco e Bueno (1999).

As dietas experimentais foram compostas por ração comercial, extrusada, com 30% de proteína bruta, em partículas de cinco milímetros de diâmetro (Tabela 1).

O extrato etanólico de própolis foi incorporado na ração por aspersão direta de uma solução composta por 250 ml de extrato etanólico de própolis a 4% e 250 ml de álcool de cereais. Após a aspersão, a ração foi seca à temperatura ambiente para evaporação do álcool. A ração foi reembalada em sua embalagem original e mantida em local seco, arejado e protegido da incidência de luz solar até a utilização.

As dietas foram fornecidas três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), sendo que após

cada pesagem, as quantidades foram ajustadas de acordo com os pesos médios dos peixes por tanque.

Tabela 1 - Composição química da ração comercial

Nutrientes	Níveis de garantia
Umidade (max)	130g/kg
Proteína Bruta (min)	300g/kg
Extrato Etéreo (min)	25g/kg
Matéria Fibrosa (max)	65g/kg
Matéria Mineral (max)	100g/kg
Fósforo (min)	10g/kg
Cálcio (max)	25g/kg
Cálcio (min)	10g/kg
Vitamina C (min)	300 mg/kg
Análise bromatológica ²	
Proteína bruta	31,91%
Extrato etéreo	4,75%

¹Composição apresentada pelo fabricante.

Composição: Farelo de germen de milho, farelo de soja, farelo de trigo, milho, farinha de carne, farinha de peixes, farinha de vísceras, sal e premix mineral vitamínico.

Mistura vitamínico e mineral (níveis de garantia por quilo do produto): ácido fólico: 2 mg; ácido pantotênico: 50 mg; antioxidante: 0,60 g; biotina: 0,6 mg; cobalto: 0,2 mg; cobre: 8,0 mg; ferro: 60 mg; iodo: 0,5 mg; manganês 15 mg; niacina 80 mg; selênio: 0,3 mg; vitamina A: 10.000 UI; vitamina B1: 10 mg; vitamina B12: 30 mcg; vitamina B2: 20 mg; vitamina B6: 10 mg; vitamina C: 300mg; vitamina D3: 1.200 UI; vitamina E: 160 UI; vitamina K: 9.0mg; zinco: 80 mg

²Análises realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da UEL.

Fonte: O fabricante.

Biometria

A biometria dos peixes foi realizada a cada 35 (trinta e cinco) dias sendo amostrado aleatoriamente três peixes de cada tanque. Estes foram insensibilizados com a dose de 5 mg de eugenol (óleo de cravo) por litro de água, e em seguida, com uso de balança eletrônica de precisão, paquímetro e ictiômetro tiveram as seguintes características mensuradas: peso corporal; altura do corpo (distância entre as nadadeiras dorsal e peitoral, em cm); largura do

corpo (medida na inserção da nadadeira dorsal, em cm).

O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso médio inicial dos peixes e o obtido pela pesagem no período. Para o cálculo de consumo de ração considerou-se que os animais consumiram toda a ração fornecida em cada período. A conversão alimentar (CA) foi obtido pela relação entre o consumo de ração total de cada unidade experimental e o ganho de peso final, corrigida pelo peso dos peixes mortos. Calculou-se também a taxa de eficiência alimentar, de acordo com Zhou et al. (2003), pela razão entre ganho de peso da biomassa e o consumo de ração, multiplicado por 100. A taxa de sobrevivência foi determinada pela razão entre o número final e o número inicial de peixes, multiplicado por 100.

A taxa de eficiência proteica (TEP) foi determinada pela relação entre as médias de ganho de peso corporal e consumo de proteína bruta da dieta (dado pela média da concentração proteica das duas rações utilizadas) multiplicado pelo consumo diário de ração, dividido pelo número de peixes, para cada unidade experimental. A taxa de crescimento específico em peso (%/dia) foi determinada de acordo com HEPHER (1988).

Filetagem

Durante as biometrias realizava-se o abate dos animais já insensibilizados e prosseguia-se com a filetagem. Utilizou-se a técnica que emprega o descabeçamento, realizado com um corte no sentido dorsoventral, o mais próximo possível do opérculo, e em seguida fazia-se a evisceração. Os filés eram retirados do esqueleto, no sentido craniocaudal e dorsoventral, um lado de cada vez. A pele foi removida no sentido caudocranial, com auxílio de um alicate próprio, realizando-se em seguida, a limpeza nos filés para retirada de restos de pele e espinhos presentes na parte cranial destes. Logo após a limpeza, os filés eram pesados em balança digital. O procedimento de filetagem era sempre realizado pelo mesmo pesquisador a fim de evitar erros manipulação.

Análise Estatística

Os dados foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância e em caso de interação significativa os dados foram submetidos à análise de regressão. Adotou-se um nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o programa R.

Resultados e Discussão

Durante o período experimental as temperaturas mostraram-se dentro da faixa de conforto durante todos os meses, com exceção das manhãs de novembro, cujas temperaturas ficaram abaixo de 25°C (Tabela 2).

Verificou-se que não houve efeito significativo de dietas sobre as variáveis estudadas ($P>0,05$). Entretanto, houve efeito significativo de tempo de avaliação sobre as variáveis: peso corporal (PC), comprimento total (CTo), altura do corpo (ACo), largura do corpo (LCo) e peso de filé (PFi) ($P<0,001$). Houve ainda efeito de interação entre as dietas e o tempo de avaliação sobre as variáveis PC ($P=0,019$), CTo ($P<0,01$), ACo ($P=0,027$) e PFi ($P<0,05$) (Tabela 03).

Ao se desdobrar o tempo de avaliação dentro de cada dieta verificou-se que nas características PC, CTo e PFi houve efeito linear significativo ($P<0,001$) em relação ao tempo de avaliação, tanto em animais que receberam a DCON como naqueles que receberam DPRO. Porém, para a característica ACo, foi observado que quando os animais receberam DCON, o comportamento dessa variável foi linear ($P<0,001$).

Tabela 2 - Valores médios de temperatura nos meses que compreenderam o período experimental e nos dias de biometrias (Bio).

Data	Manhã	Tarde	Média
Temperatura			
Novembro/2013	24,8±0,8	25,3±1,0	25,1±4,6
Dezembro/2013	27,2±1,0	27,7±1,0	27,4±0,9
Janeiro/2014	27,3±2,0	27,8±1,1	27,5±6,9
Fevereiro/2014	28,7±0,4	29,8±0,4	29,3±0,3
Biometria			
Novembro/2013	25±0,0	25±0,0	25±0,0
Dezembro/2013	25±1,0	25,6±1,1	25,3±4,4
Janeiro/2014	27,4±0,7	27,7±0,9	27,5±0,8
Fevereiro/2014	27,8±2,1	28,6±1,3	28,2±6,8

Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Médias do peso corporal (PC), comprimento total (CTo), Altura corporal (ACo), largura corporal (LCo) e peso do filé (PFI) em peixes recebendo dietas contendo extrato alcoólico de própolis (DPRO) e dieta controle (DCON), conforme os tempos de avaliação.

Tratamento	Tempo de Avaliação				Média±DP	Equação de regressão
	0	35	70	105		
PC (g)						
DCON	178,2±30,3	375,4±62,1	567,8±130,0	872,8±162,7	498,6±279,6	Y=178,3+6,82x; R ² =0,84
DPRO	171,3±24,2	372,2±52,9	614,6±52,9	736,4±205,9	473,6±248,7	Y=0,415+0,017x; R ² =0,96
Média±DP	174,8±27,2	373,8±56,7	591,2±117,8	804,6±195,1		
CTo (cm)						
DCON	21,05±1,10	26,33±1,36	29,28±1,81	33,81±1,76	27,62±4,91	Y= 21,05+0,22x; R ² =0,90
DPRO	21,13±0,97	26,31±1,16	30,15±1,16	32,08±2,10	27,42±4,5	Y=21,09+0,10x; R ² =0,86
Média±DP	21,09±1,03	26,32±1,24	29,72±1,60	32,95±2,10		
ACo (cm)						
DCON	5,96±0,28	8,66±0,60	9,03±0,81	10,27±0,80	8,49±1,71	Y=6,49+0,037x; R ² =0,76
DPRO	5,71±0,52	8,80±0,40	9,35±0,40	9,94±0,91	8,37±1,70	Y=6,53 +0,035x; R ² =0,65
Média±DP	5,84±0,43	8,73±0,51	9,19±0,76	9,94±0,91		
LCo (cm)						
DCON	2,18±0,33	3,50±0,25	3,64±0,25	3,60±0,24	3,23±0,67	Y=2,2+0,05x-0,0003x ² R ² = 0,84
DPRO	2,07±0,13	3,54±0,23	3,81±0,23	3,43±0,34	3,22±0,72	
Média±DP	2,13±0,25	3,52±0,23	3,73±0,27	3,52±0,30		
PFI						
DCON	95,00±4,47	126,0±27,3	197,53±46,2	292,53±71,3	177,7±88,14	Y=78,14+1,89x R ² =0,72
DPRO	58,13±90,2	126,2±18,0	217,60±18,0	259,33±73,8	165,3±89,09	Y=54,49+2,55x R ² =0,77
Média±DP	76,5±20,01	126,1±22,7	207,5±41,67	275,9±73,31		

DP= desvio padrão. Fonte: Do autor .

Meurer et al. (2009) trabalharam com extrato etanólico de própolis proveniente da Serra do Araripe na região do Cariri (Ceará, Brasil) em condição laboratorial de experimento com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recebendo dietas com quatro níveis de própolis (0,91, 1,83, 2,74 e 3,65 g/kg). Não encontraram diferenças significativas no comprimento total, comprimento de cabeça e rendimento de carcaça, porém, o extrato de própolis na ração proporcionou efeito quadrático sobre o peso médio final.

Ao final do presente experimento, os peixes tratados com o extrato etanólico de própolis, apresentaram peso corporal 5% menor do que peixes que receberam somente a ração controle. De modo semelhante, ao final do experimento, o peso do filé, foi em média 6,88% menor do que filé proveniente de peixes alimentados com a dieta controle (Tabela 03). Estes resultados diferem daqueles encontrados por outros pesquisadores. Agostinho (2010) trabalhou com extrato alcoólico de própolis na ração comercial (1,0 g/kg e 10,0 g/kg) fornecida a juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criados em tanques-rede, e observou que pacus recebendo a ração com própolis (10 g/kg), apresentaram ganho de peso e peso médio final superiores àqueles animais tratados apenas com a ração controle, sem adição de própolis.

Neste estudo houve efeito de interação entre dietas e tempos de avaliação sobre o peso corporal, comprimento total, altura do corpo e peso de filé. Não houve interação entre dietas e tempos de avaliação sobre a característica largura do corpo (Lco), porém houve efeito quadrático de tempo sobre esta característica (P_{máx.} = 83,33 dias) (Tabela 03). Os resultados obtidos podem estar relacionados a dose de própolis utilizada neste estudo (0,4 g/kg). Verificou-se que em pesquisas realizadas com tilápias, houve melhora nos parâmetros de crescimento corporal com a utilização de níveis de própolis variando entre 0,183 a 0,274% (ABDEL-RHMAN, 2009) e 0,91, 1,83, 2,74 e 3,65 g/kg (MEURER et al., 2009). Verificou-se também que dietas contendo 2,5% de própolis proporcionaram aumento significativo de taxa de crescimento específico, ganho de peso diário e de eficiência alimentar em tilápias, além de melhorar os índices reprodutivos tanto de fêmeas quanto de machos (ABASS et al., 2012). Portanto, a resposta à adição de extrato etanólico de própolis na dieta pode estar relacionada à dose utilizada, além do tempo de aplicação e da composição da própolis (UCZAY et al., 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes ao de outros pesquisadores. Agostinho (2010) trabalhou com extrato alcoólico de própolis na ração comercial (1,0 g/kg e 10,0 g/kg) fornecendo-a juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criados em tanques-rede, e observou que pacus recebendo ração com própolis (10 g/kg), apresentaram ganho de peso e

peso médio final superiores àqueles animais tratados apenas com a ração controle, sem adição de própolis. Outros pesquisadores como Uczay et al. (2014), trabalhando com inclusão de até 2% de própolis na ração de Jundiá, *Rhamdia quelen*, não observaram alterações significativas ($P>0,05$) na taxa de crescimento e no teor de proteína bruta corporal ($P>0,05$), contudo, o teor de gordura corporal foi menor nos peixes considerando todos os níveis de inclusão de própolis na ração (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%). Da mesma forma, Cho et al. (2012) trabalhando com adição de 1% de própolis na ração de juvenis de *Paralichthys olivaceus*, também não encontraram efeitos significativos da própolis sobre o crescimento e ganho de peso em relação ao grupo que recebeu apenas ração controle.

Os animais tratados com dietas contendo extrato etanólico de própolis apresentaram conversão alimentar (CA) pior do que aqueles que receberam a dieta controle, sem própolis (Tabela 04). Observou-se que em animais recebendo dieta controle, não houve efeito de tempo de avaliação sobre a CA. No entanto, em animais recebendo dieta com própolis, houve efeito linear ($P< 0,001$) de tempo de avaliação sobre a CA (Tabela 04).

Tabela 4 – Conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência proteica (TEP) em peixes alimentados com ração contendo extrato etanólico de própolis e ração controle.

Tratamento	Tempo de Avaliação			Média±DP	Equação de regressão
	35	70	105		
CA					
Controle	1,18±0,27	0,83±0,33	1,08±0,69	1,03±0,46	NS
Própolis	1,02±0,07	1,61±0,11	2,19±0,08	1,61±0,50	Y=0,415+0,017x; R ² = 0,965
Média±DP	1,10±0,20	1,22±0,47	1,63±0,74		
TCE					
Controle	2,12±0,65	0,58±0,28	0,45±0,19	1,07±0,87	Y=2,88-0,02x; R ² = 0,67
Própolis	2,21±0,51	0,71±0,26	0,29±0,24	1,17±0,91	
Média±DP	2,17±0,58	0,64±0,28	0,39±0,23		
TEP					
Controle	1,11±0,18	1,70±0,28	2,01±0,32	1,60±0,46	NS
Própolis	1,07±0,15	2,32±0,33	3,58±0,52	2,17±1,04	Y= 0,074+0,024x; R ² =0,87
Média±DP	1,09±0,17	2,01±0,43	2,67±0,88		

DP= desvio padrão. Fonte: Do autor

A adição de extrato de própolis (MEURER et al., 2009) ou própolis bruto (ABD-EL-RHMAN, 2009) podem proporcionar benefícios no desenvolvimento dos peixes, melhorando a taxa de conversão alimentar, aumentando a performance e a taxa de crescimento específico (DENG et al., 2011). A frequência de administração da dieta com adição de própolis pode ter relação com a conversão alimentar e ganho de peso dos animais (AGOSTINHO et al., 2010). Em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) que foram alimentados com dietas suplementadas com 1 e 10 gramas de própolis/kg de ração na frequência de 4 vezes ao dia, o ganho de peso foi reduzido em comparação aos animais que foram alimentados 24 vezes ao dia, demonstrando que a frequência de alimentação altera a conversão alimentar da dieta com adição de própolis (AGOSTINHO, et al., 2010).

Para a característica taxa de crescimento específico (TCE) observou-se que, independente da dieta recebida, houve comportamento linear decrescente ($P < 0,001$) dessa variável em relação ao tempo de avaliação. Deng et al. (2011) trabalhando com adição de 2 - 4 g de extrato etanólico de própolis na ração de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), durante 70 dias de experimento, verificaram aumento na taxa de crescimento destes animais bem como a melhora na conversão alimentar. Bae et al. (2012), utilizando a inclusão de 0,5% de extrato etanólico de própolis na ração de *Anguilla japonica*, durante 84 dias, relataram que os peixes que receberam própolis apresentaram melhor crescimento corporal específico, ganho de peso, conversão alimentar e eficiência de utilização de proteína.

Na medicina humana, alguns flavonoides são utilizados como promotores da diminuição de peso e gordura corporal, bem como, auxiliares em tratamentos de obesidade, de diabetes, doenças cardiovasculares e dislipidemias (LIN; LIN-SHIAU, 2006). Neste experimento, pode-se supor que os flavonoides contidos na própolis (campferol, quercetina, isoramnetina e galangina) (MARCUCCI et al., 1998) pode ter contribuído para diminuir o percentual de gordura corporal e assim, ter reduzido de maneira geral, a taxa de crescimento específico e demais variáveis dependente desta característica. Segundo Rivera (2011), não se sabe o mecanismo pelo qual esses flavonoides reduzem o teor de gordura corporal.

Quanto à taxa de eficiência proteica (TEP) verificou-se que quando os animais receberam DCON não houve efeito significativo ($P > 0,05$) de tempo sobre esta variável. Porém, quando os animais receberam DPRO verificou-se comportamento linear crescente ($P < 0,001$) da variável em relação ao tempo (Tabela 04). Bae et al. (2012) relataram que ao utilizarem doses crescentes de própolis na ração de *Anguilla japonica* (0; 0,25; 0,5 ;1;0; 2,0 e 4,0 %) encontraram melhor TEP em animais recebendo ração com 0,5% de própolis, concluindo que é possível a utilização deste como aditivo. Já a adição de 10 ou 30 g/kg de

extrato etanólico de própolis na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não influenciou a TEP (KELESTEMUR et al., 2012).

Verifica-se que na literatura são encontrados diferentes resultados para as mesmas variáveis estudadas por diferentes pesquisadores e isto pode estar relacionado com a composição química da própolis, que pode variar com a região geográfica, época de colheita e a flora da região em que se encontra a colmeia (PARK et al., 2002). Outros fatores também podem interferir na ação da própolis, incluindo o tempo de duração do experimento e a espécie de peixe utilizada.

Conclusão

A adição de 4% de extrato etanólico de própolis na dieta não melhora o desempenho zootécnico de tilápias do Nilo criadas em tanques-rede.

Referências

- ABD-EL-RHMA, A. M. M. Antagonism of aeromonas hydrophila by propolis and its effect on the performance of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fish & shellfish. **Immunology**, London, v. 27, n. 3, p. 454-459, 2009.
- AGOSTINHO, L. M. **Própolis no desempenho produtivo de juvenis de pacu criados em tanque rede e arraçoados com baixa e alta frequência alimentar**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.
- ARAUCO, L. R. R.; DE STÉFANI, M. V.; NAKAGHI, L. S. O. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Acta Scientiarum: Animal Science**, Maringá, v. 29, p. 227-234, 2007.
- BAE, J-Y.; PARK, G. H.; LEE, J-Y.; OKORIE, E. O.; BAI, S.C. Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 20, p. 513-523, 2012.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

- DENG, J.; AN, Q.; BI, B.; WANG, O.; KONG, L.; TAO, L.; ZHANG, X. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 959-967, 2011.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. **Fishery and aquaculture statistics 2010**. Rome: FAO, 2012.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, Brasília, v. 11, n. 11-12, p. 48-51, 1999.
- IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/biblioteca/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2015.
- ITO, E. H.; SILVA, N. V. P.; ORSI, R. O. Uso da própolis em ração de leitões desmamados. **PUBVET**, Londrina, v. 3, n. 4, Fev. 2009. Artigo 498.
- KELESTEMUR, Gülüzar Tuna; SEVEN, Pinar Tatli; YILMAZ, Seval. Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in blood of juvenile Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmoniformes) under different flow rates. **Zoologia (Curitiba)**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 99-108, Apr. 2012.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed. Jundiaí, 2011.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 529, 1996.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 22, 545-552, 2000.
- MEURER, F.; COSTA, M. M.; BARROS, D. A. D.; OLIVEIRA, S. T. L.; PAIXÃO, P. S. B. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, p. 603-608, 2009.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fito químicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, p. 997-1003, 2002.

- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009, ISBN 3-900051-07- 0, <http://www.R-project.org>.
- RIVERA, N. L. M. **Extrato de própolis na alimentação de cães**. 2011. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011. 75p.
- SAHA, N. C.; BHUNIA, F.; KAVIRAJ, A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, n. 2, p. 195-202, 1999.
- TELLI, G. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DIAS, D.; SUSSEL, F. R.; ISHIKAWA, C. M.; TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 39, n. 2, p. 305-311, 2014.
- WANG, Y. B.; TIAN, Z. Q.; YAO, J. T.; LI, W. Effect of probiotic *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 277, n. 3, p. 203-207, 2008.
- WON, E. T.; BORSKI, R. J. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 4, p. 74, 2013.
- ZHOU, B. Z.; CUI, Y.; XIE, S.; ZHU, X.; LEI, W.; XUE, M.; YANG, Y. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, and size variation of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Applied Ichthyology**, Germany, v. 19, p. 244-249, 2003.

5 ARTIGO B (Publicado na revista: Genetics and Molecular Research)

**EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT ON MYOSTATIN GENE
EXPRESSION AND MUSCLE MORPHOMETRY OF NILE TILAPIA IN NET CAGES**

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
MIOSTATINA E NA MORFOMETRIA MUSCULAR DE TILÁPIAS DO NILO
CULTIVADAS EM TANQUE-REDE**

RESUMO

A própolis pode ser utilizada como promotor de crescimento devido as suas propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e imunoestimulante, porém sua atuação na expressão gênica da mioestatina não é conhecida. O presente estudo avaliou a influência da própolis na morfometria muscular e na expressão gênica do gene da mioestatina em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada em tanques-rede. Machos revertidos (variedade GIFT) com peso inicial de $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$ foram distribuídos em esquema fatorial (2×4), sendo duas dietas (DPRO-ração comercial contendo extrato etanólico de própolis a 4% e DCON-ração comercial controle, sem própolis) e quatro tempos de experimentação (0, 35, 70 e 105 dias de experimento). Os músculos foram analisados em cada período de avaliação. A análise histomorfométrica classificou os diâmetros das fibras em quatro grupos: $<20 \mu\text{m}$; $20\text{-}30 \mu\text{m}$; $30\text{-}50 \mu\text{m}$; e $> 50 \mu\text{m}$. O RT-qPCR foi realizado para avaliar a expressão do gene da mioestatina. As fibras de $20 \mu\text{m}$ de diâmetro foram mais frequentes em DPRO do que em DCON em todos os momentos. Percentagens de fibra $> 30 \mu\text{m}$ ($30\text{-}50 \mu\text{m}$ e $> 50 \mu\text{m}$) aos 70 dias foram 25,39% e 40,07% para DPRO e DCON, respectivamente. Houve maior expressão de genes de mioestatina aos 105 dias, com média de 1,93 e 1,89 para DCON e DPRO, respectivamente, sem diferença significativa em nenhum dos períodos analisados. O extrato de etanol de própolis não afetou o diâmetro das fibras musculares ou a expressão gênica da mioestatina. Estudos futuros devem descrever os mecanismos dos efeitos dos produtos naturais sobre o crescimento muscular e o desenvolvimento, uma vez que esses fatores são altamente relevantes para o desempenho da produção de peixe.

Palavras-chave: Aquicultura. Mioestatina. Morfometria muscular. Própolis. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Propolis can be used as growth enhancer due to its antimicrobial, antioxidant, and immune-stimulant properties, but its effects on morphometry and muscle gene expression are largely unknown. The present study evaluates the influence of propolis on muscle morphometry and myostatin gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred in net cages. Reversed males (GIFT strain) with an initial weight of $170 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$ were distributed in a (2×4) factorial scheme, with two diets (DPRO, commercial diet with 4% propolis ethanol extract and DCON, commercial diet without propolis, control) and four assessment periods (0, 35, 70, and 105 experimental days). Muscles were evaluated at each assessment period. Histomorphometric analysis classified the fiber diameters into four groups: $< 20 \mu\text{m}$; $20\text{-}30$

μm ; 30–50 μm ; and $> 50 \mu\text{m}$. RT-qPCR was performed to assess myostatin gene expression. Fibers $< 20 \mu\text{m}$ diameter were more frequent in DPRO than in DCON at all times. Fiber percentages $> 30 \mu\text{m}$ (30–50 and $> 50 \mu\text{m}$) at 70 days were 25.39% and 40.07% for DPRO and DCON, respectively. There was greater myostatin gene expression at 105 days, averaging 1.93 and 1.89 for DCON and DPRO, respectively, with no significant difference in any of the analyzed periods. Propolis ethanol extract did not affect the diameter of muscle fibers or the gene expression of myostatin. Future studies should describe the mechanisms of natural products' effects on muscle growth and development since these factors are highly relevant for fish production performance.

Keywords: Aquaculture. Myostatin. Muscle morphometry. Propolis. *Oreochromis niloticus*.

INTRODUCTION

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the most commonly bred species worldwide. Brazilian tilapia production in 2014 reached 198,000 tons, or 41% of total production of freshwater fish (Ibge, 2014). Adaptability, wide geographic distribution, and high meat quality make the species highly acceptable to consumers. In fact, it is one of the most commonly bred species in tropical regions (Castagnolli, 1992; Kubitzka, 2011).

High demand for tilapia meat has intensified production, increasing efficiency and lowering costs. Production in net cages yields excellent productivity/space unit results, since the cage structure offers high water renewal rates and oxygen supply, easy hauling, and lower installation costs as compared to intensive culture systems in earth ponds (Kubitzka, 2011).

In spite of its advantages, production in net cages may induce stress in fish, due to the increased animal density per cubic meter of water (Adamante et al., 2008). However, several growth enhancers have been used to improve the muscle development of the animals through better nutrients in the diet and higher yield so that the negative effects of intensive production can be eliminated. Although antibiotics, ionophores, microorganisms, and salts have been used (Fuller, 1992), their indiscriminate and inadequate employment may cause adverse effects and resistance to pathogenic organisms (Lara-Flores et al., 2003). Consequently, studies on the use of functional ingredients and feeds to provide greater feed efficiency and fish yield have increased (Nayak, 2010).

Propolis is a natural product that can be used as growth enhancer. It is a resinous, adhesive, and odorous compound collected by bees from the fissures of tree trunks, flower buds, and exudates (Bankova, 2005). More than 200 chemical compounds have been identified in propolis, including the flavonoids galangin, quercetin, pinocembrin, and kaempferol; aromatic acids and esters; aldehydes and ketones; terpenoids and

phenylpropanoids (caffeic and chlorogenic acids); steroids; alcohols (cinnamic, phenethyl, prenilic, isobutenol, and benzylic); amino acids (arginine and proline); polysaccharides; carbohydrates; fatty acids; and small amounts of other compounds (Marcucci, 1996).

Propolis has been successfully used as a growth enhancer and immuno-modulator in several fish species (Abd-El-Rhman, 2009; Deng et al., 2011; Bae et al., 2012). Research has correlated its capacity as a growth enhancer to its antimicrobial, anti-parasitic, and immune-stimulant properties (Meurer et al., 2009; Segvic-Bubic et al., 2013; Uczay et al., 2014), although to our knowledge, no studies have investigated the effect of propolis on fish morphology and muscle gene expression.

The present study aimed to assess the effect of propolis ethanol extract on the muscle morphometry and myostatin gene expression (MSTN 1) of Nile tilapia bred in net cages.

MATERIAL AND METHODS

Sampling of fish

The methodology of the present study was approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals of the Universidade Estadual de Londrina (CEUA UEL n. 27941.2012.79).

The assay was performed at the regional campus of the Universidade Estadual de Maringá in Diamante do Norte PR Brazil, on the Corvo river (22°36'S; 52°50'W), an affluent of the Paranapanema River and a tributary of the Rosana hydroelectric reservoir, within the limits of the municipalities of Diamante do Norte and Terra Rica PR Brazil.

Three hundred male reversed tilapias (*Oreochromis niloticus*), strain GIFT, with an initial weight of 170 g ± 25 g were distributed in a (2 x 4) factorial design, with two diets (DPRO, commercial diet with 4% propolis ethanol extract, and DCON, commercial diet without propolis, control) and four assessment periods (0, 35, 70, and 105 experimental days). The total assay period comprised 105 days, with additional 10 days for animal adaptation. At the start of the experiment, all fish were weighed, separated, and placed in ten net cages (1 m³ each), at a density of 30 fish per cage. The net cages were placed in a single line, intercalating cages with DPRO fish and cages with DCON fish. Water temperature was monitored throughout the experiment at three sites within the net cage line at 09:00 and 18:00 h daily.

Propolis extracts and diets

The 4% alcoholic propolis extract was prepared by the Laboratory of Development and Quality Control of Phytotherapeutic and Apitherapeutic Agents of the Department of Pharmacy and Pharmacology of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brazil, following the protocol (modified) by Franco and Bueno (1999). Experimental diets comprised commercial extruded ration with 30% crude protein in 5-mm diameter particles (Table 1).

Table 1. Chemical composition of the diet.

Nutrients	Guarantee levels
Humidity (max)	130 g/kg
Crude protein (min)	300 g/kg
Ether extract (min)	25 g/kg
Fiber (max)	65 g/kg
Minerals (max)	100 g/kg
Phosphorus (min)	10 g/kg
Calcium (max)	25 g/kg
Calcium (min)	10 g/kg
Vitamin C (min)	300 mg/kg
Chemical analysis	
Crude protein	31.91%
Ether extract	4.75%

Composition: Corn germ meal, soybean meal, wheat meal, corn, meat flour, fish flour, viscera flour, salt and vitamin mineral premix

Vitamin and mineral mix (guarantee levels per kilo of the product): folic acid: 2 mg; pantothenic acid: 50 mg; antioxidant: 0.60 g; biotin: 0.6 mg; cobalt: 0.2 mg; copper: 8.0 mg; iron: 60 mg; iodine: 0.5 mg; manganese 15 mg; niacin 80 mg; selenium: 0.3 mg; vitamin A: 10.000 UI; vitamin B1: 10 mg; vitamin B12: 30 mcg; vitamin B2: 20 mg; vitamin B6: 10 mg; vitamin C: 300mg; vitamin D3: 1.200 UI; vitamin E: 160 UI; vitamin K: 9.0mg; zinc: 80 mg
Source: manufacturer.

Ethanol extract of propolis was added to the diet by direct dispersion from a solution composed of 250 mL 4% ethanol extract of propolis and 250 mL cereal alcohol. The diet was dried at room temperature to evaporate the alcohol. The diet was conditioned in the original package, kept in a dry, well-aired place, and protected from light until use. Diets were given three times a day (morning, afternoon and evening); after weighing, amounts were adjusted according to the mean weight of fish per cage.

Histological analysis

Fifteen samples of white muscle per treatment (DPRO and DCON) at each assessment time (0, 35, 70, and 105 days) were removed from the medial section, below the dorsal fin, for the evaluation of white fibers. They were fixed in 10% buffered formaldehyde, preserved in 70% alcohol, and then dehydrated in increasing solutions of ethylic alcohol, diaphanized in xylol, and placed in paraffin. Next, 4 μm -thick transversal sections were made and stained with eosin hematoxylin (EH); laminas were made in duplicate. The diameters of 30 transversally sectioned muscle fibers were measured for each lamina with Motic Image Plus, magnified 10x (Leica microscope, USA). Diameters of the fiber were grouped into four classes: $< 20 \mu\text{m}$; $20\text{--}30 \mu\text{m}$; $30\text{--}50 \mu\text{m}$ and $> 50 \mu\text{m}$. Rates were expressed as proportions of fibers in each diameter class to the total fibers for the evaluation of the relative contribution of hyperplasia and hypertrophy mechanisms.

RNA extraction

Samples were collected at 0, 35, and 105 days of breeding and eight samples ($N = 8$) were used for each treatment. Muscle samples were placed in tubes with RNAlater® (Invitrogen/USA) solution and kept in a freezer at -80°C until analysis.

For RNA extraction, 50 mg of each sample was weighed. We then added 1 mL TRIzol (Invitrogen/USA), mixed it in a tissue homogenizer and centrifuged it at 12,000 rpm at 4°C for 10 min. Samples were kept at rest for 5 min at room temperature (26°C). Next, 200 μl chloroform was added. The sample was homogenized and kept at rest for 3 min at room temperature, and then centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 15 min.

Two phases were established. The aqueous phase was placed in a new microtube to which 500 μl of 100% isopropanol was added. After 10 min at room temperature, it was centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 10 min. When RNA pellet was formed, cleaning was undertaken by adding 1 mL 75% ethanol, with homogenization and centrifugation at 7500 rpm at 4°C for 5 min. After discarding the ethanol, the RNA pellet was dried for 10 min at room temperature. RNA suspension was performed in DEPC water (Invitrogen/USA) and incubation at 60°C for 15 min. Total RNA was calculated by spectrophotometry. Next, 1 μg RNA was placed in a tube, and 1 μl 10X DNase I Reaction Buffer, 1 μl DNase Amp Grade (1 U/ μl - USA), and DEPC water sufficient to produce a total volume of 10 μl were added. The solution was kept at rest at room temperature for 15 min; then, 1 μl 25 nM EDTA (pH

8.0) was added and the solution was incubated at 65°C for 10 min for inactivation of enzyme DNase (Invitrogen/USA).

RT-qPCR

In order to quantitatively assess myostatin levels, reverse transcription was performed, followed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) with myostatin primers, paralog *MSTN 1*, and reference gene beta actin (*βACT*) (Table 2) using the GoTaq® 1-Step RT-qPCR System Kit. RNA (5 µl), 10 µl 2x GoTaq® RT-qPCR (Invitrogen/USA) Master Mix, 2 µl 10x forward primer (Invitrogen/Brazil), 2 µl reverse primer (Invitrogen/Brazil), 0.4 µl GoScript® RT Mix (Invitrogen/USA) for 1-Step RT-qPCR 50X, 0.3 µl supplemental CXR reference, and a sufficient volume of DEPC water to produce 20 µl were used for each sample (one gene at a time). Reactions were performed in duplicate for each gene using the RealTime PCR 7500 system. In the case of reverse transcription, a cycle was performed at 37°C for 15 min. A cycle was performed for the inactivation of reverse transcription and activation of PCR at 95°C for 10 min in real time, followed by 40 cycles of PCR in real time with denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C for 30 s and an extension at 72°C for 30 s. Finally, a dissociation cycle was performed at 60–95°C.

Table 2. Characterization of identified genes, primer sequence, size of amplified product, and GenBank accession number.

Gene	Primer sequence	Size of amplification (pb)	GenBank accession
<i>MSTN 1</i>	5' CGCAACCACGGAGACAATT 3' 5' CACCTGGACAGCGGAATCA 3'	58	FJ972683
<i>βACT</i>	5' ACCTTCAACACCCCGCCAT 3' 5' ACAGGGACAGCACAGCCTGGAT 3'	52	EU887951

Source: Mareco (2012)

Standard dilution curves in the cDNA series (with a randomly selected sample pool) were constructed for each gene under analysis to calculate its amplification efficiency. Results from the amplification reaction produced the graph of Cts vs. log₁₀ of the number relative to the dilution copies in the series. A linear regression was performed to determine the angular coefficient of the slope, which was used to calculate the amplification efficiency using Equation (1) from Rasmussen (2001) as follows:

$$(1) \text{ Efficiency} = [10^{-1/\text{angular coefficient of slope}}]$$

Calculation of relative expression (R) of target gene was based on the efficiency of amplification (E) and PCR cycle in which an increase of fluorescence above the basal sign was detected (Ct) (Pfaffl, 2001). In the case of relative quantification, the method described by Pfaffl (2001) was employed. Relative expression was determined by Equation (2) as follows:

$$(2) \text{ Relative expression (R)} = \frac{E_{\text{target gene}}^{(Ct_{\text{target gene Treatment}} - Ct_{\text{target gene Control}})}}{E_{\text{control gene}}^{(Ct_{\text{control gene Treatment}} - Ct_{\text{control gene Control}})}}$$

where E = Efficiency of primer amplification and Ct (threshold cycle) = PCR cycle in which fluorescence above the basal signal of the equipment was detected.

Statistical analysis

Muscle fibers were grouped into classes according to their diameter: < 20 μm , 20–30 μm ; 30–50 μm ; and > 50 μm . Frequency of muscle fibers (%) was given as the number of fibers from each diameter class according to total number of fibers measured. Data on the genic expression underwent analysis of variance at the 5% significance level (significant at $P < 0.05$) by the R statistical program.

RESULTS

Water temperature

Daily mean water temperature during the experimental months varied from $25^{\circ}\text{C} \pm 4.6$ (November 2013) to $29.3^{\circ}\text{C} \pm 0.3$ (February 2014). According to Kubitzka (2011), the best temperature range for tilapia is between 26 and 30°C . Thus, the mean daily temperature was within the comfort range for tilapia during most of the experimental period.

Muscle morphometry

Fish muscle fibers registered a typical morphology compatible with the different assessment times. There was no statistical difference ($P > 0.05$) in muscle growth between DPRO and DCON. However, the number of fibers of $< 20 \mu\text{m}$ diameter was greater in animals treated with propolis extract than in the control group for all times analyzed. It was also observed that the number of fibers increased after 35 and 70 days and decreased after 105 days. Although more fibers of $< 20 \mu\text{m}$ diameter were reported in DPRO after 35 and 70 days, the difference after 105 days decreased as compared to DCON. A greater number of fibers of diameter $> 50 \mu\text{m}$ was registered during this period, characterizing hypertrophic growth (Table 3) (Figure 1).

Analysis of the frequency of muscle fibers revealed that the percentage of fibers of up to $30 \mu\text{m}$ diameter (< 20 and $20\text{--}30 \mu\text{m}$) in DPRO at 70 days reached 74.6%, while the percentage of fibers of more than $30 \mu\text{m}$ ($30\text{--}50$ and $>50 \mu\text{m}$) was 25.39%. Similarly, DCON had 59.93% fiber diameter of up to $30 \mu\text{m}$ and 40.07% of more than $30 \mu\text{m}$. At 105 days, however, the frequency of muscle fibers of less than $30 \mu\text{m}$ decreased for the two treatments (34.47% and 32.81%, respectively, for DCON and DPRO), whereas the percentage of fibers greater than $30 \mu\text{m}$ increased (65.52% and 67.19% for DCON and DPRO, respectively).

Table 3. Diameter of muscle fibers (DM) of the Nile tilapia fed diets with propolis (DPRO) and control (DCON) at 0, 35, 70, and 105 days of assessment.

DM (μm)	Assessment time							
	0		35		70		105	
	DCON	DPRO	DCON	DPRO	DCON	DPRO	DCON	DPRO
< 20	4.73	5.0	8.73	12.90	5.50	8.53	1.84	2.10
$20\text{--}30$	39.49	40.91	45.98	45.90	54.43	66.07	32.63	30.71
$30\text{--}50$	54.96	52.88	45.21	40.80	39.72	25.05	64.47	65.88
> 50	0.82	1.21	0.09	0.4	0.35	0.34	1.05	1.31

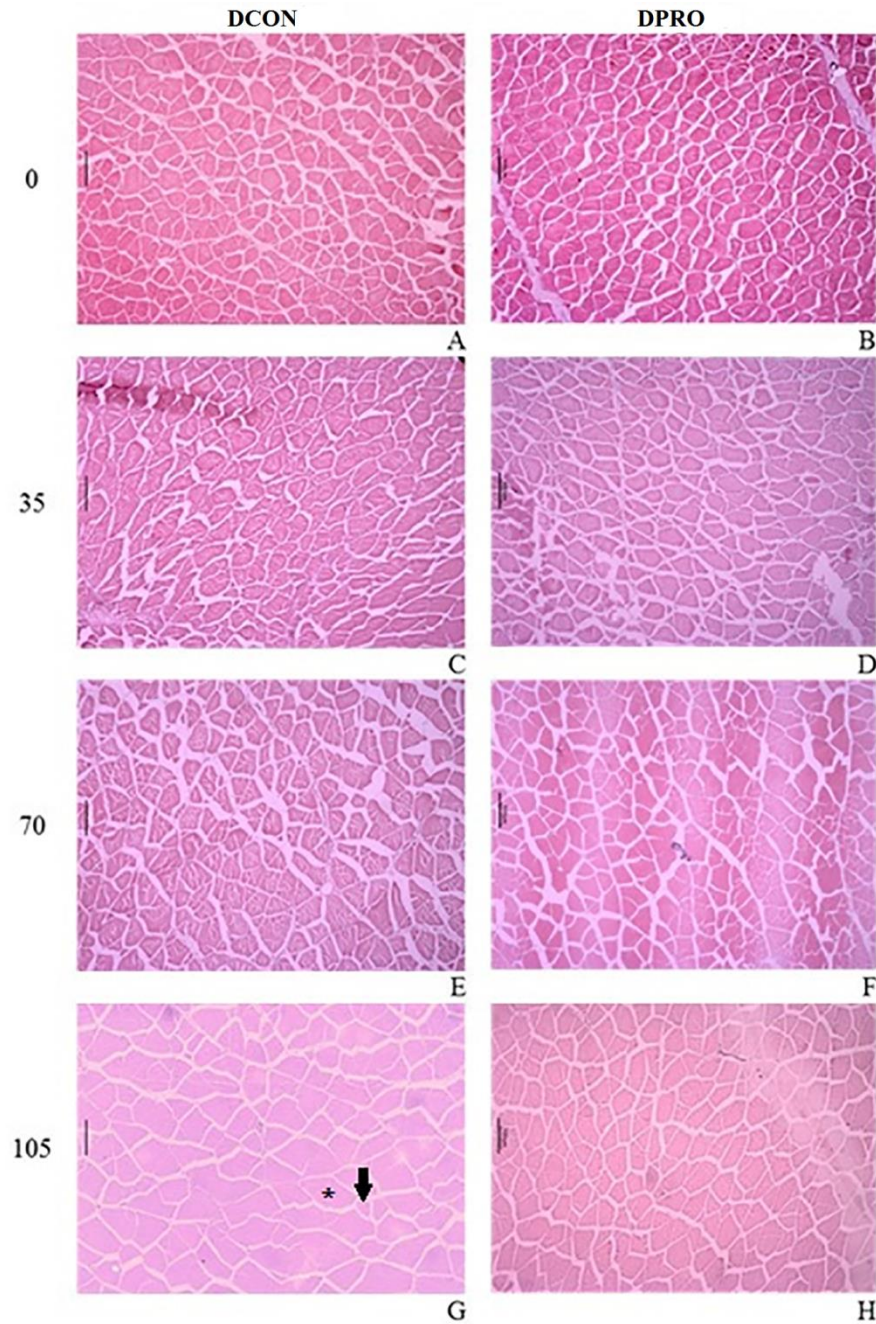


Figure 1. Photomicrography of muscle tissue of Nile tilapia (HE stain; bar 100 μm) from the control group (DCON) and the propolis treatment group (DPRO) at 0 (A and B), 35 (C and D), 70 (E and F), and 105 days (G and H). Arrow shows muscle fibers with diameter $> 20 \mu\text{m}$; asterisk indicates fibers with diameter $< 50 \mu\text{m}$.

Myostatin gene expression

There was no statistical difference ($P > 0.05$) between DPRO and DCON for myostatin levels. The results showed that genic expression of myostatin occurred at 0, 35, and

105 days, with highest gene expression at 105 days, averaging 1.93 (DCON) and 1.89 (DPRO) (Figure 2). There were increasing gene expression rates in the DPRO group and decreasing and increasing gene expression rates at 35 and 105 days, respectively, in DCON. As a rule, myostatin expression followed an increase in muscle fiber diameter throughout the breeding period.

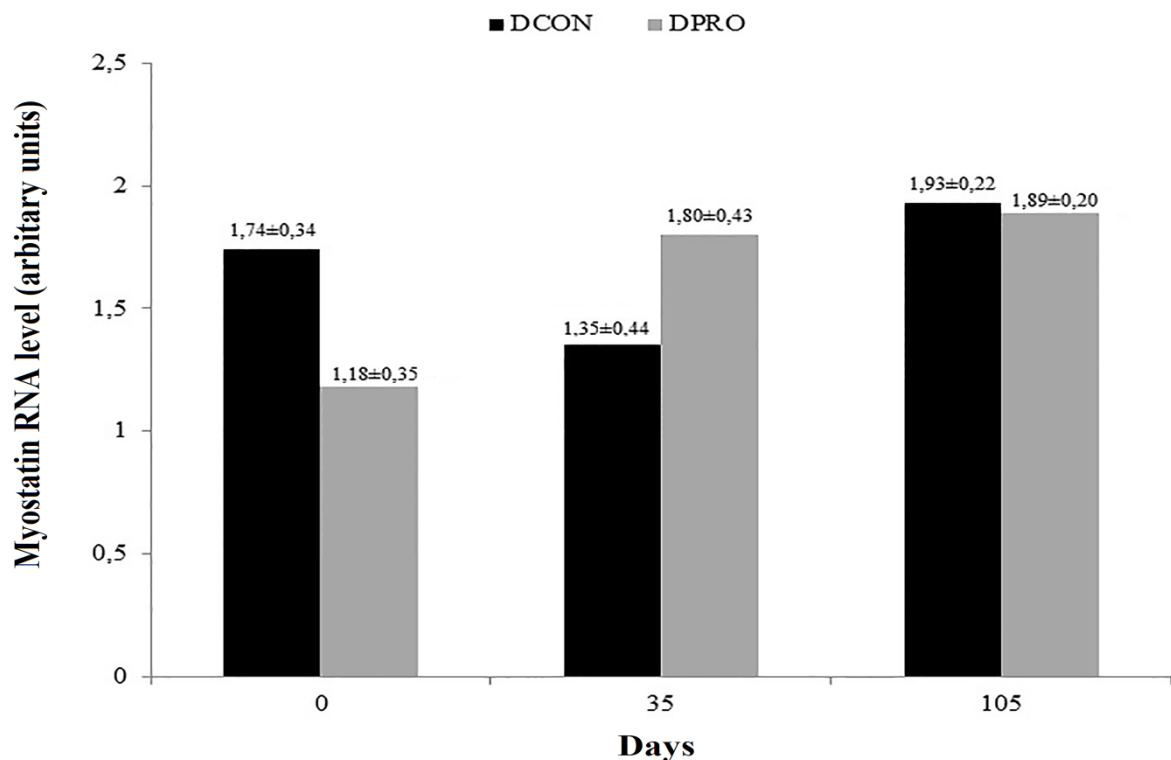


Figure 2. Relative quantification of myostatin in fish fed diets with ethanol extract of propolis (DPRO) and control fish without propolis (DCON), at 0, 35, and 105 assessment days.

DISCUSSION

The cell structure of fish muscle tissue varies according to its growth phase. Small-diameter fibers have been reported in the initial growth phases, and they correspond to greater cell proliferation. Proliferation ceases as the animal grows and muscle fibers gain volume. In other words, a greater number of muscle fibers with greater diameters may be observed in adult animals as compared to juveniles (Dal Pai-Silva et al., 2003).

Several studies have detected the same trend in the growth of white muscle fibers throughout the fish breeding period. Aguiar et al. (2008) reported greater percentages of fibers

of less than 32 μm diameter in fries and juvenile Nile tilapia and a greater percentage of fibers of greater diameter ($>32 \mu\text{m}$) in adults. The distribution of muscle fiber diameter in *Piaractus mesopotamicus* (pacu) varied according to the animal's growth phase. In fact, fibers of $< 20 \mu\text{m}$ and $20\text{--}50 \mu\text{m}$ diameter were more frequent in juveniles, whereas diameters greater than $50 \mu\text{m}$ were more frequent in adults (Almeida et al., 2008). Similar results were found in the current study, with a gradual decrease of fibers with smaller diameters ($< 20 \mu\text{m}$) and an increase of fibers with diameters $> 50\mu\text{m}$, or rather, a decrease in the recruitment of new muscle fibers and muscle growth (process of hypertrophy) throughout the cultivation period.

Although no statistical difference ($P > 0.05$) was detected between DCON and DPRO, except for days 0 and 35 in DCON, myostatin increased during the periods evaluated. According to McGivney et al. (2012) and Tripathi et al. (2013), the muscle growth process unites hyperplasia and hypertrophy, and is regulated by myogenic factors. Myostatin is a member of the genes of the transforming growth factor beta (TGF- β). *In vitro* studies on cell muscles show that myostatin inhibits myoblast proliferation and differentiation. Other studies have demonstrated that this factor might be related to the activation of differentiation and myosatellite cell fusion in fish (Santis et al., 2012), increasing the fibers' diameter by absorbing the growing ones. Such a mechanism is linked to a negative control, which myostatin provides on the myogenic regulating factors (MRFs), whose function is the enhancement of muscle growth through the formation of new muscle fibers (Johansen and Overturf, 2005).

Increase of myostatin over time is corroborated by other studies involving myostatin paralog *MSTN 1*. Mareco (2012) analyzed the effect of temperature on the muscle gene of Nile tilapia (GIFT) at different periods (7, 30, and 60 days), and found lower myostatin expression on day 7 as compared to that on days 30 and 60. The same author did not report any significant difference when the influence of temperature in the factor's gene expression was assessed. Paula et al. (2014) also registered a higher expression of the gene in *P. mesopotamicus* at 60 days of culture at 28 and 32°C. However, under these conditions, higher myostatin expression was reported in animals at 24°C. Although water temperature in the current analysis was not constant since the study was performed under field conditions and not under laboratory control (a novel factor in this study), mean temperature range remained within the comfort zone for the Nile tilapia throughout most of the experiment (except mornings in November) and did not affect the gene expression analysis.

When the results of muscle morphometry and myostatin gene expression are associated, the development of the white muscle in the Nile tilapia may be presumed to be

related to a greater occurrence of hypertrophied muscle fibers and to myostatin increase throughout the life cycle of the fish. There was a greater recruitment of muscle fiber $<30\ \mu\text{m}$ (hyperplasia process) in the initial culture phases, coupled with a decrease at 105 days with a myostatin peak. When the inhibition of expression and activity of growth factors in muscle differentiation such as *MyoD* and myogenin by myostatin (Ruan et al., 2016) are taken into account, it may be supposed that these factors were suppressed throughout the experimental period at the same time as myostatin expression, causing a recruitment decrease of new fibers and a hypertrophic increase of muscle mass in the final phases of culture.

High myostatin rates in animals fed DCON at 0 d and their decrease at 35 d (despite the increasing trend in DPRO) may be accounted for by other factors. According to Gabillard et al. (2013), myostatin is not merely related to muscle development. Its regulating mechanism involves other fish organs and tissues. Several studies have shown that diet may affect the gene *MSTN 1*. In their study on *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) with low (10%) and high (25%) lipid levels, Galt et al. (2014) reported a significant decrease in gene expression in animals fed at high lipid rates. The authors underscored a possible relationship between lipid deposition and energy partition with a decrease in myostatin. *Lates calcarifer* (sea bass) submitted to a feed fast had an approximate three-fold increase in myostatin gene expression as compared to the control. This factor may participate in the control of apoptosis of muscle cells (Santis and Jerry et al., 2011). Further, the concentration of fatty acids, diacylglycerols, and ceramides may induce apoptosis and decrease proliferation and differentiation of myoblasts due to the influence of myostatin (Ruan et al., 2016). Consequently, further studies are required to elucidate myostatin's inhibition mechanism. In fact, a parallel evaluation of *MyoD* and myogenin and their activities on other tissues may elucidate more clearly the role of myostatin throughout the animal's growth phases.

Since the current experiment comprised a field assay (with net cages), several factors that affect muscle growth, such as temperature, dissolved oxygen, pH, water flow, and the parasite and microbial loads of the fish, could not be controlled or were difficult to control. For the same reason, the current study paves the way for further research, because this type of experiment gives results that are more applicable to fish production under fish farming conditions. Analysis with greater concentrations of propolis may provide more conclusive results, since an increase in the active principals of feed facilitates their effects on muscle development. Furthermore, studies that associate propolis with other natural products, such as the alga *Schizochytrium* sp. (with its great capacity for tilapia growth), may provide more relevant results with regard to the genes that control muscle growth. Studies on fish species

other than tilapia with different fat/muscle percentages, such as *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*, may provide different results from those of the current investigation. They may also be of great importance in understanding muscle growth regulation in these species.

Results of this novel trial showed that propolis affected neither muscle development nor myostatin in Nile tilapia bred in net cages. Owing to the large number of chemical compounds in propolis, such as ketones, amino acids, several types of alcohol, polysaccharides, fatty acids, and others (Marcucci, 1996), and to its positive effects on animal production, more analyses should be undertaken. Research coupling sustainability and productivity is highly relevant for the productive chain in fish farming. The understanding of muscle growth and development processes and the way that feed supplements affect these processes are important for the incorporation of knowledge and technology. Further investigations are needed to verify the hypothesis that propolis, a growth enhancer, affects the inhibition of regulation factors of tilapia muscle genes.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Fundação Araucária for funding this study.

REFERENCES

- Abd-El-Rhman AMM (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 27: 454-459.
- Adamante WB, Nuñez APO, Barcellos LJG, Soso AB, et al. (2008). Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60: 755-761.
- Aguiar DH, Bock C, Padovani CR and Pai-Silva MD (2008). MyoD, myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquac. Res.* 39: 1673-1679.
- Almeida FLA, Carvalho RF, Pinhal D, Padovani CR, et al. (2008). Differential expression of

myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: *Serrasalminae, Characidae, Teleostei*) during juvenile and adult growth phases. *Micron* 39: 1306-1311.

Bankova V (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2: 29-32.

Bae JY, Park GH, Lee JY, Okorie OE, et al. (2012). Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. *Aquac. Int.* 20: 513-523.

Castagnolli N (1992). Piscicultura de água doce. Funep, Jaboticabal.

Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Pellizzon CH and Dal Pai V (2003). Muscle fibre types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue Cell* 35: 179-187.

Deng J, An Q, Bi B, Wang Q, et al. (2011). Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 37: 959-967.

Franco SL, Bueno JHF (1999). Otimização de processo extrativo de própolis. *Infarma* 11: 48-51.

Fuller R (1992). History and development of probiotics. In: Probiotics: the scientific basis (Fuller R). Chapman & Hall, London, 1-18.

Gabillard JC, Biga PR, Rescan PY and Seiliez I (2013) Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 194: 45-54.

Galt NJ, Froehlich JM, Meyer BM, Barrows FT, et al. (2014) High-fat diet reduces local myostatin-1 paralog expression and alters skeletal muscle lipid content in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 40: 875-886.

Ibge. Produção da pecuária municipal. Available at: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf]. Accessed 11 March 2016.

Johansen KA and Overturf K (2005). Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7: 576-587.

Kubitza F (2011). Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. 2nd ed. Aqua Supre, Jundiaí.

Lara-Flores M, Overa-Novoa M and Guzmán-Mendez, BE (2003). Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216: 193-201.

Marcucci MC (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim. Nova* 19: 529.

Mareco EA (2012). Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT. Master's Thesis, UNESP, Botucatu.

McGivney BA, Browne JA, Fonseca RG, Katz LM, et al. (2012). MSTN genotypes in Thoroughbred horses influence skeletal muscle gene expression and racetrack performance. *Anim. Genet.* 43: 810-812.

Meurer F, Costa MM, Barros DAD, Oliveira STL, et al. (2009). Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. *Aquac. Res.* 40: 603-608.

Nayak SK (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 2-14.

Paula GT, Almeida FLA, Carani FR, Vechetti-Júnior IJ, et al. (2014). Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 169: 31-37.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.

Rasmussen R (2001). Quantification on the lightcycler. In: Rapid cycle real time PCR: methods and applications (Meuer S, Witter C, Nakagawara K, eds) Springer, Berlin, 21-34.

Ruan J, Zhang Y, Yuan J, Xin L, et al. (2016). A long-term high-fat, high-sucrose diet in Bama minipigs promotes lipid deposition and amyotrophy by up-regulating the myostatin pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 425: 123-132.

Santis C and Jerry DR (2011) Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish *Lates calcarifer* in response to fasting. Evidence for functional differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335: 158-165.

Santis C, Gomes GB and Jerry DR (2012) Abundance of myostatin gene transcripts and their correlation with muscle hypertrophy during the development of barramundi, *Lates calcarifer*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 163: 101-107.

Segvic-Bubic T, Boban J, Grubisic L, Trumbic Z, et al. (2013). Effects of propolis enriched diet on growth performance and plasma biochemical parameters of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) under acute low-temperature stress. *Aquac. Nutr.* 19: 877-885.

Tripathi AK, Ramani UV, Patel AK, Rank DN, et al. (2013). Short hairpin RNA-induced myostatin gene silencing in caprine myoblast cells in vitro. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 688-694.

Uczay J, Pianesso D, Adorian TJ, Mombach PI, et al. (2014). Própolis em dietas para o jundiá (*Teleostei, Pimelodidae*). *Biosci. J.* 30: 1912-1918.

6 ARTIGO C (Publicado na revista: Semina: Ciências Agrárias)

EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT ON THE PARASITE LOAD OF NILE TILAPIAS REARED IN CAGES

INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS NA CARGA PARASITÁRIA DE TILÁPIAS DO NILO CRIADAS EM TANQUES-REDE

ABSTRACT

Due to increase in demand for healthy and chemical residue-free products, natural therapeutic substances are being enhanced in fish cultivation. Current study evaluates in an unprecedented way the effect of propolis on the parasite charge of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in fish cages. Six hundred male Nile tilapia (200g) conditioned in ten 1 m³ cages were used. Two treatments with five replications each were provided: TCON: control (extruded meal without propolis) and TPRO: extruded meal with 4% propolis extract. Parasite collection occurred on 0, 35, 70 and 105 days. At the same time, fillet was weighed and fish standard length measured. Temperature was kept within the comfort range for the species during the experimental period (>25°C). Trichodinids and Monogenoids (*Dactylogyridae*) were detected in the two treatments. There was no statistical difference ($p>0.05$) in mean parasite intensity (total parasites/specimens with parasites) and abundance (total parasites/examined specimens) among treatments in the four evaluation periods. Lowest parasite prevalence occurred after 70 days in TPRO (26.66%). There was no statistical difference ($p>0.05$) among treatments with regard to fillet weight and standard length of fish. Results show that propolis extract 4% did not significantly affect parasite load, fillet weight and standard length of Nile tilapia.

Key words: Aquaculture. *Oreochromis niloticus*. Fish parasites. Natural products.

RESUMO

Devido ao aumento da demanda por produtos saudáveis e livres de resíduos químicos, a utilização de terapêuticos naturais na criação de peixes tem sido cada vez mais estimulada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar de forma inédita o efeito do extrato de própolis sobre a carga parasitária de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanque-rede. Foram utilizados 600 machos revertidos de tilápias-do-Nilo (200g) acondicionados em 10 tanques-rede de 1 m³. Foram utilizados dois tratamentos com cinco repetições: TCON: controle (ração extrusada sem própolis) e TPRO: ração extrusada contendo extrato de própolis a 4%. As coletas de parasitas foram realizadas nos dias 0, 35, 70 e 105 dias. Paralelamente, foi realizado a mensuração do peso do filé e comprimento padrão. A temperatura durante o período experimental se manteve dentro da faixa de conforto para a espécie. Foi verificada a presença de tricodinídeos e Monogenóides (*Dactylogyridae*) em ambos os tratamentos. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) nos valores de intensidade (total de parasitas/número de indivíduos parasitados) e abundância (total de parasitas/total de indivíduos examinados) média parasitária entre os tratamentos nos quatro períodos de avaliação. A menor prevalência parasitária foi aos 70 dias em TPRO (26,66%). Não foi constatada diferença estatística

($p > 0,05$) entre os tratamentos na mensuração do peso do filé e comprimento padrão. Concluiu-se que o extrato de própolis a 4% não influenciou significativamente a carga parasitária, no peso do filé e no comprimento padrão em tilápias-do-Nilo.

Palavras-chave: Aquicultura. *Oreochromis niloticus*. Parasitas de peixe. Produtos naturais.

Introduction

Fish production in Brazil in 2015 reached 483,241 tons, totaling R\$ 3,064 billion, with tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture ranking first, or rather, 45.4% of total fresh-water fish production and high growth rates during the last decade (IBGE, 2015).

Great progress in tilapia production during the last few years is mainly due to several characteristics (white flesh, firm texture, nice taste, fillets without fish bones) featuring the species as one of the consumers most favorable fish. Since the tilapia adapts itself well to several and different environmental conditions (variations in temperature, pH, salinity and dissolved oxygen), the species is also of interest for producers (EL-SAYED, 2006). However, the intensification of tilapia production has also triggered high density breeding systems with great risks related to diseases caused by stocking stress (KUBITZA, 2011). For instance, infestations by Tricodinids and Monogenoids parasites cause external lesions that become the gateway for bacteria, with significant mortality rates for fish (BRACCINI et al., 2008; JERÔNIMO et al., 2011; DOTTA et al., 2015).

Several antibiotics and anti-parasites agents have been employed to minimize the effects of disease on tilapia production and to decrease production liabilities. On the other hand, several products used are prohibited in countries where consumers give priority to high quality meat, food safety and products free from chemical residues (TELLI et al., 2014). Further, concern on the contamination of the environment is also present and research for alternative products is stimulated to lessen liabilities. Propolis, a natural product with therapeutic capacity (FISCHER, 2008), has been suggested to minimize the negative effects in fish production.

Propolis, an adhesive substance with a characteristic smell, is a resin collected by bees from fissures in tree barks, leaf buds and shoots (BANKOVA, 2005). Among its several chemical components, propolis may be highlighted for anti-parasite compounds, such as phenolic and flavonoid substances (HEINZEN et al., 2012), anti-inflammatory and antimicrobial compounds (FISCHER, 2008) and other active chemical ingredients (MARCUCCI, 1995). Although the employment of propolis in animals has had positive

results against parasites (HEINZEN et al., 2012; MELLO-PEIXOTO et al., 2013), few studies have been undertaken to evaluate the effect of propolis against pathogens.

Since propolis extract as a diet supplement had provided positive results in growth performance, antimicrobial potential and immune-stimulant in fish (ABD-EL-RHMAN, 2009; DENG et al., 2011) and due to the growing demand by consumers for healthier and residue-free meat, the current study assesses the effect of propolis on the parasite charge of the Nile tilapia reared in fish cages.

Materials and Methods

Place and experimental conditions

Current assay was performed on the Regional Campus of the Universidade Estadual de Maringá in Diamante do Norte PR Brazil, in the Rio do Corvo, an affluent of the River Paranapanema. The Rio do Corvo is a tributary of the Rosana Hydroelectric Reservoir, delimiting the municipalities of Diamante do Norte and Terra Rica, both in the state of Paraná, Brazil. Current research was approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals of the Universidade Estadual de Londrina (Process 27941.2012.79).

Six hundred reversed male Nile tilapias (strain GIFT), initial weight $200 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$ were used. Two treatments were evaluated: TCON - diet without propolis, with five replications (five 1 m^3 cages; 60 fish per tank) and TPRO - diet with propolis with five replications (five 1 m^3 cages; 60 fish per tank). Fish were acclimated for 10 days and four parasite samples were collected (0, 35, 70 and 105 days) in November, December (2013), January and February (2014), respectively. Mortality rate was calculated every day by individual observation for each cage and for each treatment.

Diet comprised an extruded commercial meal without propolis and a meal with 4% propolis extract (30% crude protein; 5 mm diameter). Propolis extract was prepared with alcohol 4% by the Laboratory for the Development and Quality Control of Phytotherapics and Apitherapics of the Department of Pharmacy and Pharmacology of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brazil, following protocol (adapted) by Franco and Bueno (1999). Propolis extract was added to the diet by direct aspersion and dried in the open air to remove alcohol excess. The product was placed in a dry and aired placed till use. Diet was provided three times a day at alternate periods.

Temperature

Mean water temperature was registered twice a day (09:00 and 18:00 h). Measurements were taken at three sites of the cage lines and at alternate lines.

Analysis of parasites

Procedures followed Braccini et al. (2008). Ectoparasites were determined by the scratching test involving the first branchial arc and left dorsal region of each fish previously anesthetized with benzocaine (0.1g mL^{-1} alcohol 96° into 10 L water). Each treatment comprised 15 animals (totaling 30 fish per harvest) in four harvests (totaling 60 fish per treatment). Scratching, visualized between the lamina and the cover slip (22×22 mm) was performed by scalpel and magnified 100 x under an optic microscope Olympus CBB. Material was disinfected with an iodine-based product (2.6 % iodine - 1000 ml alcohol 96°) after each harvest.

Weight of fillet and standard length

Standard length (the distance from the tip of the lip till the caudal peduncle) was measured by caliper ruler. The fillet weight (g) and standard length (cm) were also measured. These measurements were performed at 0, 35, 70 and 105 days. Animals were then insensitized with benzocaine (0.1g mL^{-1} alcohol 96° in 10 L of water); filleting was performed by technique involving the cutting of the head (dorsum-ventral direction), close to the opercula, and evisceration. Fillets were removed from the skeleton within a cranium-caudal and dorsum-ventral direction, one side at a time. The skin was removed in a caudal-cranial direction by tweezers and the fillets were cleaned by removing skin residues and fish bones in the cranial section. After cleaning, the fillets were weighed on a digital scale. Filleting was performed by the same researcher to avoid handling mistakes.

Data analysis

Occurrence of ectoparasites was assessed qualitatively (presence or absence) and quantitatively (the sum of the occurrence of parasites in the branchial filaments, skin or in both) of Trichodinids and Monogenoids (*Dactylogyridae*) in the two treatments. The number

of fish with and without parasites was counted, coupled to the number of parasites in the branchiae and in the skin for each treatment to determine prevalence, intensity and abundance, following Bush et al. (1997). Results generated efficaciousness, according to Dotta et al. (2015) by formula: $E = \frac{MNPCG - MNPTG}{MNPCG} \times 100$ (E: efficaciousness; MNPCG: number of parasites in control group; and MNPGT: number of parasites in the group with treatment). Results on parasite intensity and abundance underwent Student's *t* test ($p > 0.05$). Results were compared according to treatment and cultivation days. Means of fillet weight and standard length were similarly analyzed, as those between treatments.

Results

Low mortality was reported in the assay with the two treatments (TCON: four fish; TPRO: two fish). Mean temperature rates of water were within the comfort zone for Nile tilapia (KUBITZA, 2000), above 25°C in most of the experimental period, except during the mornings in November (24.8°C). Table 1 shows that mean general temperature of water ranged between 25.1°C (November) and 29.3°C (February).

Table 1. Mean water temperature (°C) during the experimental period.

Date	Water temperature (°C)		
	Morning	Afternoon	Mean
Nov/2013	24.8±0.8	25.3±1	25.1±4.6
Dec/2013	27.2±1.0	27.7±1.0	27.4±0.9
Jan/2014	27.3±2.0	27.8±1.1	27.5±6.9
Feb/2014	28.7±0.4	29.8±0.4	29.3±0.3

Monogenoids in the branchiae and Trichodines in the tegument mucus occurred at the onset of the assay (day 0). As a rule, the two types of parasites during the four periods studied were restricted to a single tissue, or rather, Monogenoids in the branchial filaments and Trichodines in the tegument. The only exception occurred for the evaluation on the 35th day with Trichodines on two sites in the two treatments. Highest prevalence rates (P%) for parasite Trichodina were identified on the 35th day in TCON and on the 105th day in TPRO (26.67%) (Table 2).

When total prevalence rates were analyzed (for the two parasites together), higher percentages were reported after 35 days (46.66%) for the two treatments. There was no difference ($p > 0.05$) in Mean Intensity (MI) between TCON and TPRO during the four periods analyzed. However, when only the evaluation days were taken into account, a significant rise

in intensity rate occurred between the 70th and 105th days in both treatments. There was no difference ($p>0.05$) in mean abundance (MA) between treatments and between the evaluation periods (Table 3).

Table 2. Prevalence of ectoparasites in the Nile tilapia (strain GIFT) for control treatment (TCON) and for treatment with propolis (TPRO) on 0, 35, 70 and 105 days.

Treatment (day)	Parasite	Branchiae		Tegument	
		PP/PE	P (%)	PP/PE	P (%)
TCON (0)	Trichodina	0/15	0	2/15	13.33
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0
TPRO (0)	Trichodina	0/15	0	3/15	20
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0
TCON (35)	Trichodina	1/15	6.67	4/15	26.67
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0
TPRO (35)	Trichodina	1/15	6.67	3/15	20
	Monogenoidea	3/15	20	0/15	0
TCON (70)	Trichodina	0/15	0	2/15	13.33
	Monogenoidea	3/15	20	0/15	0
TPRO (70)	Trichodina	0/15	0	2/15	13.33
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0
TCON (105)	Trichodina	0/15	0	3/15	20
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0
TPRO (105)	Trichodina	0/15	0	4/15	26.67
	Monogenoidea	2/15	13.33	0/15	0

PP: fish with parasites; PE: examined fish; P(%): Prevalence.

Table 3. Mean rates of prevalence (P%), medium intensity (IM) and medium abundance (AM) of ectoparasites of the Nile tilapia for control treatment (TCON) and treatment with propolis (TPRO) on 0, 35, 70 and 105 days.

	TCON			TPRO		
	P%	IM	AM	P%	IM	AM
0 Days	26.66	4.5 (4.94) Aab	0.6 (0.7) Aa	33.33	3.92 (2) Aab	0.7 (0.59) Aa
35 Days	46.66	1.8 (1.13) Aab	0.5 (0.5) Aa	46.66	1.8 (0.6) Aab	0.43(0.24) Aa
70 Days	33.33	1.66 (0.47) Ab	0.27 (0) Aa	26.66	1.5 (0.7) Ab	0.2 (0.09) Aa
105 Days	33.33	4.66 (5.19) Aa	0.9(1.1) Aa	40	4.62 (3.4) Aa	0.77(0.24) Aa
Mean	35 A	3.15(1.64) A	0.57(0.26) A	36.6 A	2.96(1.54) A	0.525(0.26) A

Capital letters indicate significant difference between treatments (TCON and TPRO); small letters indicate significant difference between different cultivation days by Student's *t* test at $p<0.05$.

Propolis-supplemented diet had the best efficaciousness on the 70th day (25%) when compared to evaluation rates on the 35th and 105th days (13.33 and 14.81%, respectively) (Figure 1). There was no difference ($p>0.05$) between fillet weight (g) and standard length (cm) between treatments after 35, 70 and 105 days. On the 70th day, the two parameters were

numerically higher in TPRO, although at the end of the assay (105 days), rates were higher in TCON (Table 4).

Table 4. Fillet weight (g) and standard length (CP) of Nile tilapia for control treatment (TCON) and treatment with propolis (TPRO) on 35, 70 and 105 days.

	TCON		TPRO	
	Fillet (g)	Standard length (cm)	Fillet (g)	Standard length (cm)
35 Days	126(27.37)	21.28(1.14)	126.27(18.01)	21.29(0.98)
70 Days	197.53(46.24)	24.27(1.56)	217.6(35.23)	24.94(1.09)
105 Days	292.53(71.86)	28.01(1.65)	259.33 (73.86)	27.05(1.68)

Discussion

Occurrence and intensity of ectoparasites in fish are correlated with eutrophication rates, diet management and adopted technology in productive systems. Conditions worsened when production intensified through high densities (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Trichodines and monogenenoids in the Nile tilapia have already been detected in several fish farms with different stocking densities, cultivation phases and at different periods of the year (BRACCINI et al., 2008; JERÔNIMO et al., 2011; ZAGO et al., 2014; DOTTA et al., 2015; PAREDES-TRUJILLO et al., 2016). The above reveals that parasites always occur in culture conditions but are only relevant when there is an imbalance between host, parasite and environment.

High temperature during spring and summer enhances parasite infestation due to the improvement of proliferation conditions of fish pathogens (SCHALCH et al., 2005). On the other hand, sub-optimal temperature conditions may reduce immune response and fish's capacity with regard to their response to antigens. Consequently, the animals are greatly susceptible to parasites. Braccini et al. (2008) analyzed the occurrence of ectoparasites of the Nile tilapia in the Rio do Corvo (the same river as that in current study) during May, June, July and August (mean water temperature at approximately 23°C) and detected a slightly higher mean prevalence (38.2%) when compared to that in current assay. The same authors also detected high ectoparasite prevalence at the start of the assay in May, although infestations decreased as fish grew up, with an increase of more than 25% in ectoparasites prevalence during the last month (August). Similarly, Marengoni et al. (2009) failed to report the relationship with monogenoids in the tilapias bred in cages between February and June, even though there was a greater temperature oscillation throughout the period. Contrastingly,

Zago et al. (2014) reported an increase in mean intensity of ectoparasites according to the cultivation phase (initial, intermediate and final).

In spite of increase in mean temperature throughout the cultivation period detected in current assay, there was no relationship with parasite load, probably due to the fact that mean temperature in all periods remained within the species's comfort zone and management provided an adequate immunological response for pathogens. According to Kubitza (2000), tilapias cultivated at a temperature between 23 and 32°C tended to be less harmed by parasites since they lay between the thermal comfort boundaries for the species and, consequently, less susceptible to immunity decrease.

Due to its different therapeutic factors, such as anti-parasite (mainly phenolic and flavonoid compounds) (HEINZEN et al., 2012) and anti-inflammatory substances (FISCHER, 2008), propolis added to diets provided good results against parasites in several animal species, such as mammals (MELLO-PEIXOTO et al., 2013) and fish. Dotta et al. (2015) analyzed the effect of diet supplementation composed of a mixture of propolis and *Aloe barbadensis*, between 15 and 21 days, and detected significant decrease in mean parasite intensity and prevalence in tilapias. Different from the above experiments, results in current analysis revealed that diet supplemented with propolis extract 4% failed to affect mean prevalence, occurrence and abundance of ectoparasites.

Lack of influence may be associated with the cultivation medium. Adequate temperature interval during the assay did not affect anti-parasite conditions of propolis contents since, within the best cultivation conditions (best temperature; low density), fish had sufficient immunological defense and probably responded naturally to the agents. It has been reported that propolis extract may increase bactericide activity in tilapias confronted with *Aeromonas hydrophila* by stimulating the defense cells (ABD-EL-RHMAN, 2009). Probably, in more challenging conditions within the environment, the therapeutic components of propolis act more significantly and efficaciously.

Efficaciousness should be underscored. Its rate was higher on the 70th day when compared to that on the 105th day. Dotta et al. (2015) found the same pattern between the 15th and the 21st day and attributed decrease to possible stress caused by animal density and product accumulation. However, in current research, the animal's age and immunity, environmental variations or pharmacological reactions due to the period in which propolis was employed may have decreased efficaciousness during the final period.

It seems that there was no difference between TCON and TPRO with regard to animals' age and immunity since mortality rate was low and animals grew homogeneously,

when standard length was analyzed. According to Saha et al. (1999), the chronic use of phenolic compounds may reduce fish growth and development. The authors underscore that compounds enhance excessively mucus secretion on the skin and in the branchiae, causing difficulty in oxygen transport and, consequently, respiration capacity. Further, high concentration of these compounds may decrease the nutritional rates of the food when they interact with proteins, carbohydrates and minerals (SHAHIDI; NACZK, 1995). Consequently, the dispensation of propolis may have either triggered a chronic toxicity reaction or it interfered in nutrient absorption causing difficulties in the assimilation of propolis components after 70 days. Future studies are required to elucidate toxic concentrations and the manner the compounds' concentration affects the performance of the species.

Several researches on the effect of propolis in the diet have given satisfactory results on growth performance in fish (ABD-EL-RHMAN, 2009; DENG et al., 2011). However, no study has yet related the use of therapeutic products with biometric rates and the occurrence of parasites. Current assay failed to identify any statistical difference in intensity and abundance of ectoparasites, in fillet weight and in standard length between treatments on days 35, 70 and 105.

Stress is a crucial factor in animal production with regard to animals zootechnical performance. Research with mammals have already underscored that propolis may have a positive effect on stress-related biochemical responses (MISSIMA; SFORCIN, 2008). Since propolis decreases stress and parasite load, it may have affected fillet weight rates and standard length after 70 days. Further studies should be undertaken to elucidate this effect on fish and verify the mechanisms involved in anti-parasite processes, performance and stress in cage conditions.

Conclusions

Propolis extract 4% did not affect mean parasite prevalence, intensity and abundance, fillet weight and standard length. A greater efficiency occurred on the parasite load after 70 days. Although a probable effect of the metabolic assimilation of propolis may have occur after 70 days of cultivation, further studies should be undertaken to elucidate other effects of the product on the cultivation of tilapias in cages.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Fundação Araucária for funding and for the scholarship and the Cooperativa Integrada for donating the diets employed.

References

- ABD-EL-RHMAN, A. M. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunology*, London, v. 27, n. 3, p. 454-459, 2009.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Thousand Oaks, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- BRACCINI, G. L.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ALEXANDRE-FILHO, L.; DIGMAYER, M. Ectoparasitos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em tanques-rede nos rios do Corvo e Guairacá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 17, p. 24-29, 2008. Suplemento 1.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.
- 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 Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 959-967, 2011.
- DOTTA, G.; BRUM, A.; JERONIMO, G. T.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 66-71, 2015.
- EL-SAYED, A. F. M. *Tilapia culture*. Alexandria: Alexandria University, 2006. 277 p.
- FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. *Infarma*, Brasília, v. 11, n. 11-12, p. 48-51, 1999.
- HEINZEN, E. L.; MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; JARDIM, J. G.; GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; ORSI, R. O. Extract of propolis in the control of helminthiasis in calves. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 40-44, 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção Pecuária Municipal 2015. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. v. 43, 100 p.

JERÔNIMO, G. T.; SPECK, G. M.; CECHINEL, M. M.; GONÇALVES, E. L. T.; MARTINS, M. L. Seasonal variation on the ectoparasitic communities of Nile tilapia cultured in three regions in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 71, n. 2, p. 365-373, 2011.

KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 289 p.

_____. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. 2. ed. Jundiaí: Acqua Supre, 2011. 316 p.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Paris, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARENGONI, N. G.; SANTOS, R. S.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; GINO, D. M.; ZERBINATTI, D. C.; LIMA, F. S. Monogenoidea (Dactylogyridae) em tilápias-do-nilo cultivadas sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, p. 393-400, 2009.

MELLO-PEIXOTO, E. M.; ANDRADE, A.; VALADARES, F.; SILVA, L. Phytotherapy in the control of helminthiasis in animal production. *African Journal of Agriculture Research*, Lagos, v. 8, n. 21, p. 2421-2429, 2013.

MISSIMA, F.; SFORCIN, J. M. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Thousand Oaks, v. 5, n. 1, p. 71-75, 2008.

PAREDES-TRUJILLO, A.; VELÁZQUEZ-ABUNADER, I.; TORRES-IRINEO, E.; ROMERO, D.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. Geographical distribution of protozoan and metazoan parasites of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) (Perciformes: Cichlidae) in Yucatán, México. *Parasites & Vectors*, Prague, v. 9, n. 66, p. 1-16, 2016.

SAHA, N. C.; BHUNIA, F.; KAVIRAJ, A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v. 63, n. 2, p. 195-202, 1999.

SCHALCH, S. H. C.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pague do município de Guariba, São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, Maringá, v. 28, n. 3, p. 291-297, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995. 576 p.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 429 p.

TELLI, G. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DIAS, D. C.; SUSSEL, F. R.; ISHIKAWA, C. M.; TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish Shellfish Immunology*, London, v. 39, n. 2, p. 305-11, 2014.

ZAGO, A. C.; FRANCESCHINI, L.; GARCIA, F.; SCHALCH, S. H. C.; GOZI, K. S.; SILVA, R. J. D. Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a

hydroelectric reservoir in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 171-178, 2014.

7 CONCLUSÃO

Neste experimento a adição de extrato etanólico de própolis a 4% na ração de peixes não promoveu melhora no desempenho zootécnico quando comparados aos animais do grupo controle, contudo, embora não comprovado, pode ter ocorrido um efeito farmacológico da interação dose/tempo de exposição à própolis.

Verificou-se também que o extrato etanólico de própolis a 4% não promoveu efeito sobre a expressão gênica da miostatina.

Há necessidade de mais estudos para investigar melhor as propriedades da própolis, inclusive os seus possíveis efeitos adversos em peixes.

ANEXOS

ANEXO A

Documento de aprovação do projeto de pesquisa emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 260/12

Londrina, 07 de Dezembro de 2012.

Prezada Pesquisadora,

A CEUAUEL reunida em 13 de novembro de 2012 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Extrato de própolis no desempenho, expressão gênica, histologia muscular, imunologia e parasitologia da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanque rede", registrado sob o processo CEUA nº 27941.2012.79, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está aprovado para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 600 alevinos de peixes, da linhagem Gift, machos, com idade de 60 dias e peso de 200g, com procedência da piscicultura da codapar da UEM. O projeto tem como objetivo avaliar o efeito do extrato de própolis no desempenho, expressão genética, histologia muscular, imunologia e parasitologia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criada em tanque rede. Para isto no 1º experimento será utilizado um extrato de própolis obtida do cultivo de colmeias na fazenda experimental de Iguaçu. Já o 2º experimento será executado na Universidade Estadual de Maringá, onde neste projeto será utilizado um delineamento experimental casualizado, com dois tratamentos e 10 repetições, a biometria dos peixes realizada a cada 30 dias para determinar o desempenho dos peixes nos dois tratamentos, os peixes amostrados serão pesados, medidos com comprimento padrão e serão retiradas amostras de musculatura dorsal para serem para serem utilizados nas análises de expressão gênica, as amostras musculares retiradas serão fixadas em formalina tamponada e submetidas a inclusão em historesina, amostras de sangue serão coletadas dos peixes abatidos para análise de expressão gênica nos dias experimentais 1, 30, 60 e 90 sendo num total de 120 coletas, a determinação por ectoparasitas será registrada pelo exame do raspado do primeiro arco braquial e região dorsal. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 48 meses.

Cumpra orientar que caso pretendem-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUAUEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Aparecido Perri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Perri Junior
Coordenador CEUAUEL

Em: Sra.
Profa. Dra. Ivone Yurika Mizubuti
Coordenadora do Projeto
Departamento de Zootecnia
Centro de Ciências Agrárias
Com cópia para Sra. Egilene Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e diretor (a) do Centro de Ciências Agrárias