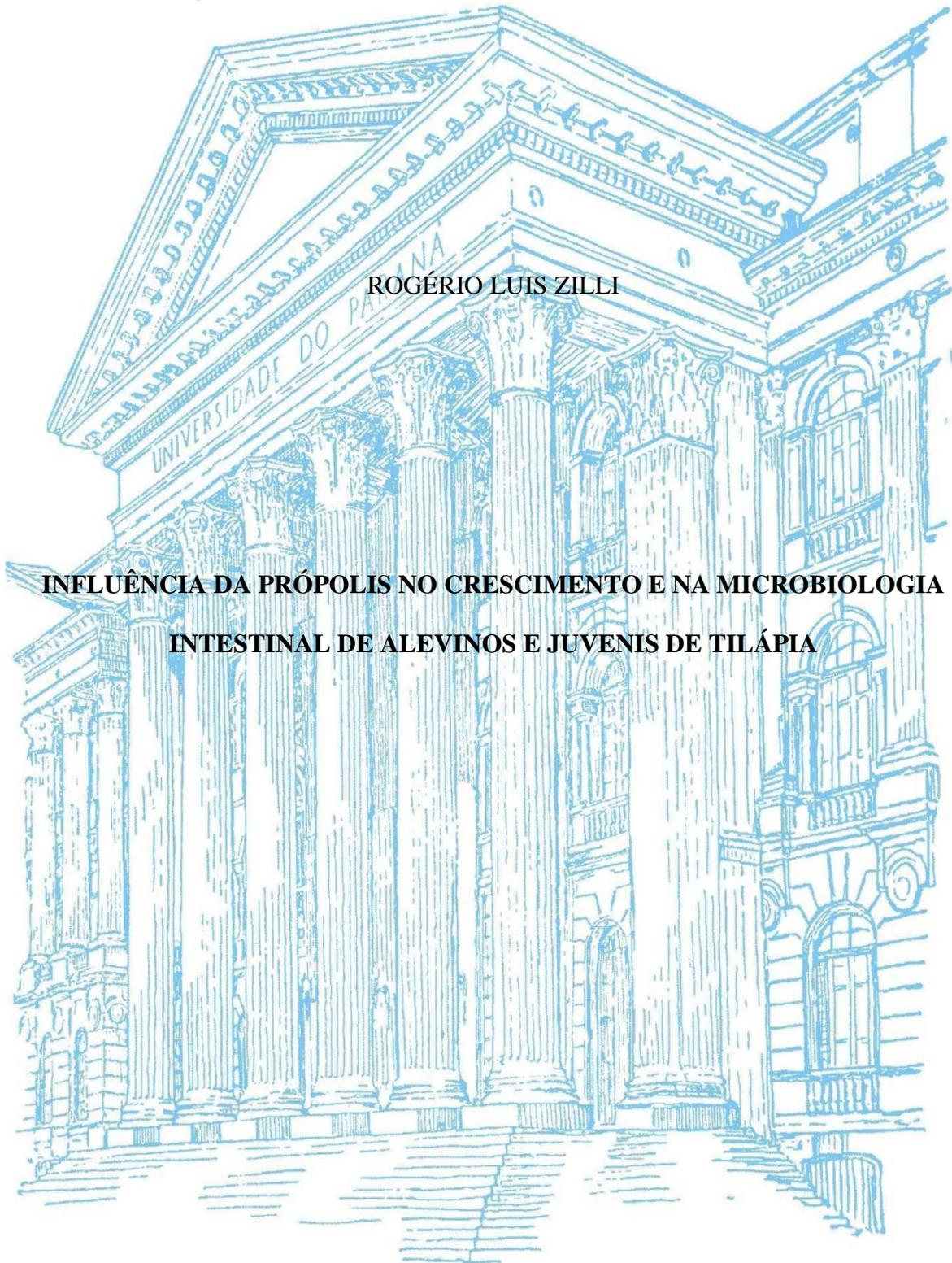


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

ROGÉRIO LUIS ZILLI

**INFLUÊNCIA DA PRÓPOLIS NO CRESCIMENTO E NA MICROBIOLOGIA
INTESTINAL DE ALEVINOS E JUVENIS DE TILÁPIA**



PALOTINA

2016

ROGÉRIO LUIS ZILLI

**INFLUÊNCIA DA PRÓPOLIS NO CRESCIMENTO E NA MICROBIOLOGIA
INTESTINAL DE ALEVINOS E JUVENIS DE TILÁPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Área de concentração: Produção de organismos aquáticos

Orientador: Prof. Dr. Fábio Meurer

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lilian Dena dos Santos

PALOTINA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Z69 Zilli, Rogério Luis
Influência da própolis no crescimento e na microbiologia intestinal de alevinos e juvenis de tilápia / Rogério Luis Zilli - Palotina, 2016.
81f.
Orientador: Fábio Meurer
Coorientador: Lillian Dena dos Santos
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

1. Aditivos alimentares. 2. Alevinagem. 3. Larvicultura. 4. Nutrição de peixes.. I. Meurer, Fábio. II. Santos, Lillian Dena dos . III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 639.3.043



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL
Código CAPES: 40001016078P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ROGERIO LUIS ZILLI**, intitulada: **"INFLUÊNCIA DO PRÓPOLIS NO CRESCIMENTO E NA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS E JUVENIS DE TILÁPIA"**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

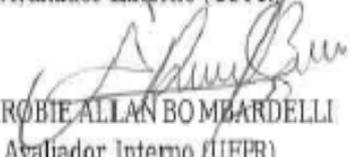
Palotina, 28 de Julho de 2016.



Prof. PAULO MEURER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



Prof. RAFAEL ERNESTO BALEN
Avaliador Externo (UFPR)



Prof. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI
Avaliador Interno (UFPR)

DEDICATÓRIA

*Dedico a duas pessoas incríveis,
que sempre me apoiaram em
todas as situações, em sua
maioria difíceis (realmente
a sorte não anda comigo),
mas faz parte da vida.*

Obrigado Nelci e

Terezinha por

serem meus

pais.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela minha existência;

Aos meus pais, pelo dom da vida;

Aos demais familiares pelo incentivo;

À Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina;

Ao Prof Dr Marco Antonio Bacellar Barreiros;

A minha coorientadora Prof^a Dra. Lilian Dena dos Santos, pelo auxílio;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Meurer;

Aos demais professores pelas orientações nos momentos de dúvidas; A minha amiga Marlise, por toda ajuda;

Aos amigos de laboratório pelo auxílio;

Aos demais colegas que de alguma forma contribuíram para com o trabalho;

Influência da própolis no crescimento e na microbiologia intestinal de alevinos e juvenis de tilápia

Experimento I: Extrato de própolis como promotor de crescimento para alevinos de tilápias do Nilo e sua influência na microbiologia intestinal

Experimento II: Efeito do extrato de própolis da região oeste do Paraná no desempenho e microbiologia intestinal de pós-larvas de tilápias do Nilo

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a inclusão de níveis crescentes do extrato da própolis produzida na região Oeste do Paraná como promotor de crescimento durante a alevinagem (experimento 1) e a reversão sexual (experimento 2) da tilápia do Nilo criados em alta densidade de estocagem. No experimento 1, 600 alevinos foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições em 30 tanques de 60 litros. No experimento 2, 1.800 pós-larvas foram distribuídas na mesma estrutura e delineamento semelhante ao experimento I. Os tanques estavam dispostos em sistema de recirculação da água com biofiltro central. O trabalho teve 5 tratamentos com níveis crescentes de inclusão de extrato de própolis (10, 20, 30 e 40 mL/kg⁻¹ de ração) e uma ração controle. Ao final do período experimental, todos os alevinos de cada unidade experimental foram contados, pesados e medidos individualmente para a determinação dos parâmetros médios de peso final, comprimento final, comprimento padrão. Para avaliação da altura dos vilos, foram utilizados três exemplares e mais três animais para avaliação da diversidade de bactérias intestinais. Também para o experimento 1 foram utilizados três alevinos para retirada do hepatopâncreas para determinação do índice hepatossomático. Houve uma

resposta quadrática ($p < 0,05$) do fator de condição corporal, que apresentou um efeito quadrático para ambas as fases de crescimento avaliadas. A inclusão do extrato de própolis da região Oeste do Paraná em rações para as duas fases testadas, proporcionou um aumento na diversidade da microbiota intestinal.

Palavras chave: aditivos alimentares, alevinagem, larvicultura, nutrição de peixes.

Propolis influence on growth and intestinal microbiology fingerlings and juvenile tilapia

I Propolis extract of western Paraná as a growth promoter for fingerlings of tilapia Nile

subjected to high density storage

II Effect of propolis extract of western Paraná performance and intestinal microbiology post-

larvae of tilapia

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the inclusion of increasing levels of propolis extract produced in western Paraná as a growth promoter during the spawning grounds (experiment 1) and sex reversal (experiment 2) of Nile tilapia reared in high density storage. In experiment 1, 600 fingerlings were distributed in a completely randomized design with five treatments and six repetitions in 30 tanks of 60 liters. In experiment 2, 1800 post-larvae were distributed in the same structure and design similar to experiment I. The tanks were arranged in water recirculation system with central biofilter. The work had 5 treatments with increasing levels of propolis extract of inclusion (10, 20, 30 and 40 mL / kg⁻¹ of diet) and a control diet. At the end of the trial period, all fingerlings each experimental unit were counted, weighed and measured individually to determine the mean parameters of final weight, final length, standard length. To evaluate the height of the villi were used triplicate and three animals to evaluate the diversity of intestinal bacteria. Also for the experiment 1 were used three fingerlings for removal of the hepatopancreas to determine the hepatossomatic index. There was a quadratic response ($P < 0.05$) body condition factor, which had a quadratic effect on both growth phases evaluated. The inclusion of propolis extract of Paraná West Region in

diets for the two tested phases, resulted in an increase in the diversity of the intestinal microbiota.

Key words: food additives, nursery, hatchery, fish nutrition

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CONTEXTO DA AQUICULTURA.....	16
2.2 HISTÓRICO SOBRE A TILÁPIA.....	18
2.3 ENDEMIAS.....	19
2.4 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS.....	21
2.5 A PRÓPOLIS.....	23
2.5.1 A PRÓPOLIS COMO ADITIVO EM RAÇÕES.....	25
2.6 MICROBIOTA INTESTINAL DE PEIXES.....	27
3. REFERÊNCIAS.....	31
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
EXPERIMENTO I.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4. CONCLUSÃO.....	56
5. REFERÊNCIAS.....	58
EXPERIMENTO II.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. CONCLUSÃO.....	77
5. REFERÊNCIAS.....	78

TABELAS

Tabela 1 - Principais substâncias encontradas na própolis de diferentes fontes.	24
Tabela 2 - Composição percentual e química da ração experimental base (matéria natural). .	46
Tabela 3 - Parâmetros de desempenho e histológicos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do Paraná e submetidas à alta densidade de estocagem.	51
Tabela 4 - Análise da composição bromatológica das carcaças de tilápias do Nilo.	56
Tabela 5 - Composição percentual e química da ração experimental base (matéria natural). .	68
Tabela 6 - Parâmetros de desempenho e histológicos de pós-larvas de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do Paraná e submetidas ao desafio sanitário.....	71

FIGURAS

Figura 1 - Fator de condição corporal de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do paraná e submetidos ao desafio sanitário.....	50
Figura 3 - Quantidade e diversidade de bactérias do intestino das tilápias do Nilo.....	54
Figura 2 - Fotodocumentação dos vilos de intestino da tilápia do Nilo.....	55
Figura 4 - Fator de condição corporal das tilápias do Nilo durante a reversão, alimentadas com níveis crescentes de extrato de própolis do Oeste do Paraná	72
Figura 5 - O Gráfico representa a quantidade e a diversidade de bactérias do intestino das tilápias do Nilo.	76

1. INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura nacional é um ramo da zootecnia que está em evidência atualmente, fato este relacionado com a grande aptidão do país para este tipo de atividade, como o clima adequado e grande disponibilidade de água, excelente qualidade nutricional do pescado. Do ponto de vista social, a piscicultura pode fornecer renda para a população local, tanto como trabalhadores formais em empresas de grande porte, bem como em pequenas associações de produtores ou cooperativas (MEURER et al., 2009). Dentro das espécies mais comumente cultivadas estão as de origem exótica, como é o caso da tilápia do Nilo.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a *Oreochromis niloticus*, foi à espécie mais difundida entre os anos 1960 e 1980, devido suas qualidades zootécnicas, como o rápido crescimento, a resistência a altas densidades e alta taxa de reprodução (KUBITZA, 2000). Atualmente, a tilápia é cultivada em todos os continentes, principalmente nas áreas tropicais, sendo catalogados pela FAO mais de 140 países produtores (FITZSIMMONS, 2015). Com o aumento da pressão quanto à intensidade da produção, os consequentes problemas com a qualidade da água podem levar a ocorrência de enfermidades, ocasionando relevantes prejuízos para a piscicultura (KUBITZA, 2005).

Os problemas advindos de enfermidades levam a prejuízos na piscicultura, resultado provocado pelo emprego de altas densidades em sistemas de produção, afetando o desenvolvimento econômico do setor (KUBITZA, 2005). Com o crescimento da piscicultura intensiva no Brasil, observa-se o aumento da ocorrência de patologias nos sistemas de produção, onde as bactérias do gênero *Aeromonas* são as causadoras de consideráveis perdas na piscicultura (COSTA, 2003).

Em função dos problemas advindos com a utilização de antibióticos em rações animais, a União Européia restringiu o uso de alguns destes, tais como a tilosina, virginamicina,

espiramicina e bacitracina de zinco (JIN et al., 2000), bastante utilizados como promotores de crescimento, particularmente em monogástricos, como suínos e aves (DENLI et al., 2003).

A busca por promotores de crescimento que não promovam problemas de resistência bacteriana e resíduos na carne têm levado a pesquisas em direção de produtos naturais. As investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidas, sobretudo, na área médica e veterinária, onde o produto tem demonstrado uma eficiente atividade bacteriostática e bactericida em relação a diversos gêneros de bactérias gram positivas tanto gram negativas (MAZZUCO et al., 1996; GARCIA et al., 2004; CUESTA et al., 2005).

A própolis tem sido empregada amplamente na preparação de medicamentos em diversos países do mundo, inicialmente na Europa e Ásia e mais recentemente em alguns países da América do Sul e Central. A própolis oferece a vantagem de ser um produto natural e sua utilização na área zootécnica pode substituir ou reduzir o uso de quimioterápicos (GARCIA et al., 2004).

Poucos são os trabalhos com extrato da própolis como promotores de crescimento em peixes. Em função dos dados coletados da literatura com outras espécies, o seu estudo pode proporcionar impactos significativos à piscicultura, especialmente sobre as fases iniciais do cultivo da tilápia do Nilo.

Na busca de trazer medidas sanitárias para amenizar os problemas de doenças e enfermidade na produção da tilápia do Nilo, principalmente nas fases iniciais, o trabalho propôs a utilização de própolis da região Oeste do Paraná, que é um produto abundante da região e tem efeitos como promotor de crescimento, e diversas funções biológicas no organismo dos animais desde funções antimicrobianas, antifúngicos, antiprotozoário, levando até a melhora do sistema imunológico. A utilização deste produto busca melhorar a produção das tilápias em termos de sanidade, melhorando a produtividade, a qualidade dos peixes comercializados em todas as fases, e até levando ao produtor agregar maior valor ao seu

produto final. Esse peixe tratado com própolis pode servir como estratégia de mercado, levando a maior aceitação e procura pelo consumidor final.

Assim os estudos aqui propostos possibilitarão um aumento de conhecimento técnico-científico da utilização do extrato de própolis do Oeste do Paraná. Os resultados servirão como subsídios a futuros trabalhos com outros produtos naturais, além de poder ser utilizado como ferramenta simples para geração de conhecimento básico que servindo como ponto de partida para criação de novas tecnologias, além da divulgação e implantação dos resultados para piscicultores e até para as indústrias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTEXTO DA AQUICULTURA

Nos últimos 30 anos a depleção nos estoques pesqueiros naturais provocou um aumento exponencial na atividade aquícola. Segundo a FAO (2012) esta é a atividade de produção de alimentos que mais cresce hoje no mundo. O Brasil vem obtendo destaque na aquicultura na América do Sul em função do grande área de águas continentais e uma área de 5.500.000 hectares de lâmina d'água, representada pelos 72 reservatórios (BRASIL, 2012), oferecendo um enorme potencial para produção e desenvolvimento (FAO 2012).

A pesca extrativista vem diminuindo no decorrer dos anos, certamente por não ocorrer um planejamento de captura e controle dos ciclos de reprodução e também o tempo necessário de recuperação dos estoques pesqueiro, aonde nos últimos anos vem atingindo seus limites, tendo como alternativa a atividade aquícola pra supressão de pescado para o consumidor (SIDONIO et al., 2012).

A média de consumo mundial *per capita* de pescado aumentou 85% de 1960 para 2009 (FAO, 2010), mostrando que a aquicultura desenvolve um papel econômico e social de grande importância para a produção de alimentos, gerando empregos, renda e igualdade social. Entre 2004 a 2009, o crescimento do consumo de pescados foi de aproximadamente 13% no acumulado, em 2009 o consumo *per capita* mundial foi de 17,2 kg/hab/ano (FAO, 2010). Em 2011 o consumo *per capita* aumentou para 18,8 kg/hab/ano (FAO, 2012) representando um acréscimo importante para a aquicultura.

No Brasil o consumo de pescado é 11,17 kg por habitante por ano (BRASIL, 2013), valor ainda abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 12

kg por habitante por ano (FAO, 2012), mas 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior (BRASIL, 2010).

A procura por alimentos mais saudáveis e a queda na pesca tem acelerado o crescimento da aquicultura, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil em 2009, aumento de 35% em menos de uma década, no ano de 2010 foram produzidos 1.264 mil toneladas, sendo 62% oriundos da pesca e os outros 38% provenientes da aquicultura (BRASIL, 2012). Estimativas indicam que para 2018 a produção oriunda da aquicultura ultrapasse a pesca por captura, chegando a 52% de todo o pescado em 2021, segundo a (FAO, 2012).

De maneira isolada a produção de tilápia aumentou 105% em apenas sete anos (2003-2009). Em conjunto, a aquicultura cresceu 43,8%, entre 2007 e 2009, tornando a produção de pescado a que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período (MPA, 2010).

Com o aumento acelerado da atividade aquícola, surge à necessidade de aumento na produtividade, intensificando os sistemas de produção (MOESCH, 2014). Quando a atividade aquícola cresce, verifica-se claramente a necessidade de aumento de índices de produtividade da piscicultura. Este aumento de produtividade implica em intensificação dos sistemas de produção.

Entre os benefícios socioeconômicos da aquicultura pode-se destacar: alimento, emprego e recursos por meio de métodos, sistemas de cultivo e espécies criadas. Ela ainda aumenta o acesso direto ao alimento, incluindo o peixe para consumo doméstico para pessoas de baixa renda. As espécies mais baratas no mercado muitas vezes possuem ciclo curto de produção, o que requer baixo investimento e assim pouco capital investido (WILLIAMS, 1997).

Vários problemas são relacionados a esta intensificação da atividade, entre eles a maior quantidade de efluentes gerados e emitidos, os surtos de doenças que acarretam o uso

de químicos, entre outros (FERREIRA & BARCELLOS, 2008). Mas estes problemas não causam somente prejuízos para a produção, mas também para o meio ambiente como perdas na biodiversidade esgotamento dos recursos hídricos, portanto é necessário reduzir ao mínimo o impacto sobre o meio ambiente na busca de tornar aquicultura cada vez mais sustentável (VALENTI, 2002).

2.2 HISTÓRICO SOBRE A TILÁPIA

A tilápia é um peixe de água doce que pode ser criada também em água estuarina ou salobra (MEURER & HAYASHI., 2003). Pertence à família *Cichlidae*, nativa da África, foram introduzidas em diversas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo durante a segunda metade do século XX (EL-SAYED, 2006).

De acordo com AZEVEDO (1955), as primeiras espécies de tilápia trazidas para o Brasil chegaram ao Estado de São Paulo em 1953, embora MAINARDES-PINTO et al. (1989) afirmaram que tilápia do Nilo foi introduzida no Brasil em 1971, sendo uma das espécies que melhor se adaptou ao nosso clima.

Sua criação tem aumentado de forma exponencial, sendo o segundo grupo de peixes de água doce em escala de produção mundial, inferior somente ao grupo das carpas (MPA, 2014). Em 2011, a produção de tilápias foi de 254 mil toneladas, o que correspondeu aproximadamente a 46,6% da produção de peixes de água doce no Brasil. No ano de 2010, foi a espécie mais utilizada na piscicultura brasileira (39,4%), seguido pela criação de carpa (23,9%), tambaqui (13,8%) e pacu (5,4%). Estes dados demonstram que há alguns anos a tilapicultura é responsável por mais ou menos 50% do consumo de carne de peixe nacional (MPA, 2014).

Diversos fatores incentivaram a disseminação da tilápia do Nilo por todo o território nacional, obtendo maior destaque sua maturidade sexual precoce e facilidade na reprodução (GAMA, 2008); alta taxa de crescimento (LOPERA-BARRERO et al., 2011); adaptabilidade em diversas condições de criação, bem como tolerância a altas densidades de estocagem e a níveis críticos de oxigênio dissolvido (FERREIRA et al., 2011). Outras características que a tornam uma espécie promissora são os requisitos típicos dos peixes preferidos pelo mercado consumidor como carne branca de textura firme e sabor delicado, ausência de espinhas intramusculares (JORY et al., 2000)

As principais características que a tilápia possui são a tolerância à má qualidade da água, boa aceitabilidade a uma variedade de alimentos tanto natural quanto artificiais, fácil reprodução, resistência a altas densidades de estocagem, além de possuir um excelente rendimento de filé (HILSDORF, 1995). A nutrição adequada desta espécie é importante para a sua cadeia produtiva, pois geralmente para a aquicultura o custo da ração varia de 50 a 70% do custo total da criação (BOSCOLO et al., 2001) demonstram hábito alimentar onívoro, quando criadas em altas densidades, aceitando facilmente uma alimentação artificial (CYRINO & FRACALLOSSI, 2013).

2.3 ENDEMIAS

O aumento da atividade da aquicultura pelo uso de altas densidades de estocagem, manejo intenso e grande aporte de nutrientes nos corpos de água, traz como consequência o risco de epidemias causadas por bactérias patogênicas (CYRINO & CONTE, 2006; EL-SAYED, 2006). A manutenção de altas densidades de populações de peixes em áreas limitadas favorece o surgimento e a propagação de doenças responsáveis por grandes mortalidades e perdas econômicas significativas (COSTA, 2003).

As doenças de peixes são fatores limitantes no desenvolvimento em um sistema aquícola, e dentre os vários patógenos, as bactérias provavelmente constituam o grupo de agentes etiológicos economicamente mais significantes na aquicultura mundial (PAVANELLI et al., 1998). Isto ocorre devido as espécies de peixes serem susceptíveis a infecções bacterianas, não sendo possível evitar sua propagação, uma vez que estes microrganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático e fazem parte da flora microbiana normal dos organismos aquáticos (COSTA, 2003).

A aquisição de animais de baixa qualidade sanitária é um entrave para o cultivo, sendo um dos problemas mais impactante para a disseminação de doenças no sistema, onde os animais jovens são portadores assintomáticos e a enfermidade manifesta-se na fase adulta. Nesse caso como a detecção não é realizada na aquisição dos alevinos, os peixes são alojados nos sistemas de cultivo, disseminam o agente etiológico no plantel (LEAL, 2009).

A larvicultura e alevinagem são as fases iniciais do cultivo, sendo consideradas etapas fundamentais para o sucesso de empreendimentos comerciais de produção dessa espécie. A tilapicultura no Brasil é caracterizada pela presença na cadeia produtiva de poucas unidades de reprodução e diversas unidades de engorda. Desse modo, cada larvicultura no país costuma fornecer pós-larvas, alevinos e juvenis para propriedades em diferentes regiões geográficas, facilitando a difusão de agentes infecciosos por todo o território nacional (LEAL, 2009).

Muitos dos agentes com potencial patogênico ainda não foram identificados e os processos inflamatórios, infecciosos e distúrbios do crescimento merecem estudos mais aprofundados para a piscicultura nacional (TORANZO et al., 2004). Alguns destes agentes já vêm causando prejuízos nos cultivos de tilápias, como bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Flavobacterium* e infestações por parasitos do grupo dos tricodinídeos, bem como a disseminação destes agentes entre as propriedades (COSTA, 2003; LEAL, 2009). Os principais fatores de risco associados a epidemias ocasionadas por esses patógenos são o

emprego de altas densidades de estocagem, estresse dos animais e elevação da temperatura da água, todos comumente verificadas na maioria das tilapiculturas nacionais (ARANA, 2004).

2.4 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

Dentro da piscicultura nacional, bem como em outras linhas de produção animal, ocorria à inclusão de antibióticos na ração, com o objetivo de diminuir a carga de microrganismos patogênicos evitando o aparecimento de infecções, geralmente na fase inicial de cultivo, pois é nesta fase onde possuem baixa resistência, estando mais suscetíveis aos agentes agressores (MEURER et al., 2008). Porém não existiam informações confiáveis sobre este tipo de manejo, podendo ser usado livremente em pisciculturas. Esta falta de conhecimento favoreceu o aparecimento de bactérias resistentes, onde, ao invés de trazer benefícios, gerou prejuízos para a produção, dificultando o seu controle patogênico (CARNEIRO et al., 2007).

Desta forma, a União Europeia proibiu o uso de vários agentes antimicrobianos que antes eram utilizados na alimentação animal como aditivos que eram capazes de promover a saúde intestinal e melhor desempenho dos animais (AARESTRUP et al., 2010). Desse modo, a busca por produtos alternativos aos agentes antimicrobianos tornou-se tema de estudo de empresas e pesquisadores.

A possível modulação da microbiota intestinal por estes produtos alternativos ocorre devido aos mesmos funcionarem como nutrientes às bactérias intestinais benéficas, priorizando seu crescimento, onde os metabólitos estarão reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos, reduzindo a capacidade de fixação de bactérias patogênicas na mucosa intestinal (SANTANA et al., 2011). Especula-se também, que estes produtos possam atuar, estimulando o sistema imune, através da redução indireta da

translocação intestinal por patógenos, que determinariam infecções após atingir a corrente sanguínea (KIM et al., 2011).

Outro efeito da suplementação alimentar com estes produtos é o desenvolvimento do intestino, aumentando a altura dos vilos nos diferentes segmentos intestinais (SANTIN, 2001). De acordo com MCMULLIN (2004) os antibióticos promotores de crescimento podem acarretar problemas potenciais à saúde humana, como toxicidade, ação alérgica e desenvolvimento de resistência, razão pela qual vêm sendo criticados severamente. Além disto, causam efeitos de má formação, aparecimento de carcinomas e mutações, o que tem trazido preocupações à saúde pública (GÓRNIK & SPINOSA, 2007).

O benefício do uso de antibióticos e quimioterápicos no controle de doenças se baseia no aumento do efeito terapêutico e na diminuição da toxicidade relacionada à droga e ao aparecimento de resistência ao antimicrobiano (SANTANA et al., 2011). Entretanto, esta prática acabou com o tempo, ocasionando aumento da resistência bacteriana contra os antibióticos, levando ao aparecimento de bactérias cada vez mais difíceis de serem controladas (CABELLO, 2006). Dessa forma, os antibióticos, depois de muitos anos de uso na nutrição animal, passaram a serem vistos como um fator de risco para a saúde humana devido à possibilidade de resistência cruzada com bactérias patogênicas para humanos (FRANCO et al., 2007).

A sanidade no cultivo de peixes é um grande entrave da produção industrial, levando a grandes perdas em termos de mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar. Dessa forma a utilização de produtos naturais, principalmente da região do cultivo e que ajudem a minimizar os problemas de sanidade devem ser buscados cada vez mais, bem como é importante o conhecimento de todos os seus efeitos nos animais estudados.

2.5 A PRÓPOLIS

Vários estudos têm sido realizados para avaliar novos aditivos visando a substituir os antibióticos como promotores de crescimento. As alternativas mais pesquisadas envolvem o uso de enzimas, probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e extratos vegetais. A própolis se destaca entre os extratos de origem vegetais, já que possui inúmeras características de interesse (FRANCO et al., 2007).

Própolis é o termo genérico utilizado para denominar um material resinoso coletado pelas abelhas de várias fontes. O nome própolis é derivado do grego *pro*: em defesa de, e *polis*: a cidade, o que quer dizer: “em defesa da cidade ou da colmeia”. As abelhas, de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microrganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colmeia, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1995).

A própolis possui inúmeras propriedades biológicas e é um apiterápico utilizado há séculos na medicina popular como agente anti-inflamatório e tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, principalmente nas últimas duas décadas, no sentido de elucidar suas propriedades biológicas e farmacológicas. Sua ação antimicrobiana é reconhecida mundialmente, com muitos trabalhos científicos realizados neste sentido, confirmando sua ação anti-inflamatória, antioxidantes e imune estimulante, antiprotozoário, antifúngica, bactericida, bacteriostática, anestésica, cicatrizante, anti-séptica e hipotensiva, hepatoprotetora, imunoprotetora, antitumoral e anti-HIV (MIORIN, 2003; ARAUCO et al., 2007).

Dentre as ações biológicas da própolis, a antibacteriana e a antifúngica são as mais populares e as que vêm sendo mais extensivamente estudadas (MARCUCCI, 1995), devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos em humanos e animais (DA SILVA

FRANCO et al., 2007). Sua atividade antibacteriana é atribuída principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico, com mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteria (UZEL et al., 2005).

A composição química da própolis inclui mais de 180 compostos (Tabela 1), por isso suas propriedades biológicas são diversas (CUESTA et al., 2005). A própolis apresenta em sua composição resinas, bálsamos, ceras, ácidos graxos e possui em sua composição numerosos princípios ativos com atividade biológica, como flavonóides, ácidos fenólicos, terpenóides, cumarinas, vitaminas e oligoelementos (PODOLSKI, 2000; PACKER et al., 2007).

Tabela 1 - Principais substâncias encontradas na própolis de diferentes fontes.

Componentes	Principais substâncias	Quantidade (%)
Resinas	Flavonóides	45-55
	Terpenóides	
	Cumarinas	
	Ácidos fenólicos e ésteres	
Ceras e ácidos graxos	A partir de abelhas e plantas	25-35
	Ácidos graxos poli-insaturados	
Óleos essenciais	Voláteis	10
Pólen	Proteínas	5
	Aminoácidos livres	
	Vitaminas (A,B,C,E, etc)	
Outras substâncias	Minerais traços (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, etc)	5
	Cetonas	
	Lactonas	
	Quinonas	
	Esteróides	
	Açucares	

*Adaptado de Krell (1996)

Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõe a própolis (CABRAL, 2008). Destes, os flavonóides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas (PARK et al., 1998).

Os flavonóides são considerados o grupo químico majoritário da própolis (flavonas, flavonóis, flavononas e dihidroflavonóis) e são descritos como tendo atividade antibacteriana e antiprotozoária (MOURA et al., 1998). A própolis apresenta importante atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, incluindo bacilos da tuberculose humana, segundo GRANGE & DAVEY (1990).

A composição da própolis varia com a época e as região geográfica, bem como fatores como a ecologia vegetal da região onde os extratos são coletados (CASTRO et al., 2007; LUSTOSA et al., 2008) e até mesmo a variabilidade genética das rainhas (KOO & PARK, 1997). Essa extraordinária variabilidade entre amostras provenientes de diferentes fontes leva a variação das propriedades farmacológicas da própolis.

2.5.1 A PRÓPOLIS COMO ADITIVO EM RAÇÕES

Os estudos sobre a atividade antibiótica da própolis têm sido conduzidos sobre tudo na área de produção animal, onde o produto tem demonstrado uma eficiente atividade bacteriostática e bactericida em relação a diversos gêneros de bactérias principalmente gram positivas (BIANCHINI & BEDENDO, 1998) e como promotor de crescimento (MEURER et al., 2009).

CHU (2006) afirmou que a própolis pode estimular a resposta imune de carpas (*Carassius auratus gibelio*) contra *Aeromonas hydrophila*. MAZZUCO et al. (1996) citam que o extrato etílico da própolis tem efeito bactericida contra *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis* em rações de avícolas, COELHO et al. (2010) em estudo afirma que a própolis atua inibindo o crescimento bacteriano principalmente bactérias gram-positivas e algumas cepas de bactérias gram-negativas evitando doenças importantes que atrapalham a produtividade.

GARCIA et al. (2004) concluíram que a própolis demonstrou ação contra *Pasteurella multocida* “in vitro” e também sobre essa bactéria em coelhos, quando incorporada à ração PINTO et al. (2004) concluíram que o extrato alcoólico da própolis tem efeito antimicrobiano. DENLI et al. (2005) demonstraram que a inclusão de própolis na dieta de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) acarretou em melhor ganho de peso e conversão alimentar comparado ao tratamento controle.

AGOSTINHO (2010) utilizando à própolis no desempenho produtivo de juvenis de pacu criados em tanque rede e arraçoados com baixa e alta frequência alimentar, concluiu que a suplementação com o extrato de própolis na dieta melhorou o desempenho dos animais, com uma frequência de 24 vezes ao dia, efeito contrario observado em uma menor frequência alimentar.

MEURER et al. (2009) incluindo extrato de própolis marrom em dietas para alevinos de tilapia do Nilo obteve resultados diferentes entre os tratamentos, sendo que onde houve um melhor desempenho zootécnico para a dose 2,22g por kg de ração, definindo a própolis marrom como um promotor de crescimento com um bom potencial.

UCZAY et al. (2014) em ensaio com duração de 42 dias, utilizando própolis em dietas como promotor de crescimento para alevinos de jundiá, não observou diferenças significativas da suplementação de própolis na dieta sobre os parâmetros de crescimento, igual ao período utilizado CHO (2011), e que também não foi constatado efeito no crescimento dos peixes alimentados com própolis.

A própolis pode promover toxicidade para o animal, onde foram testados para a truta arco-íris por KASHKOOLI et al. (2011) avaliando seu efeito da administração de extrato de própolis a longo prazo, com dietas contendo 0,0; 0,5; 1,5; 4,5 e 9,0 g de própolis/kg ração, concluído que não apresentam sinais de toxidez a longo prazo para os peixes. Também para trutas, os dados demonstraram que a suplementação na ração de extrato etanólico de própolis

atuou como promotor de crescimento, agente hepatoprotetor e imunostimulante (DENG et al., 2011).

O extrato etanólico de própolis apresenta maior eficiência em relação ao extrato bruto contra *A. hydrophila* promovendo melhor crescimento para tilapia do Nilo em dietas contendo 30% de proteína bruta (ABD-EL-RHMAN, 2009). Portanto é de grande importância realizar estudos com o objetivo de considerar a resposta dos animais frente a algumas dessas atividades biológicas da própolis, em termos de desempenho zootécnicos, principalmente em relação à piscicultura.

2.6 MICROBIOTA INTESTINAL DE PEIXES

Os peixes, como todos os outros seres vivos, estão sujeitos a um amplo espectro de enfermidades com causas muito diversas. Sabe-se que a produção de organismos aquáticos é um fenômeno duradouro e crescente. Sabe-se também que o mercado consumidor está cada vez mais exigente e existe uma demanda crescente por alimentos mais saudáveis.

Para dar suporte ao avanço neste setor são necessários cada vez mais estudos de manejo nutricional e nessa área, em particular, destaca-se o conhecimento da microflora intestinal, cujo estado da arte ainda se encontra muito superficial, quando comparado a de outras espécies, como vertebrados terrestres (CAHILL, 1990).

As bactérias apresentam papel importante na piscicultura, pois estão relacionadas a muitas doenças, que provocam um grande impacto econômico na população de peixes (BEJERANO et al., 1979). Diante do aumento da produtividade na piscicultura, atenção especial deve ser dada ao surgimento de doenças nos peixes, que podem ocorrer em decorrência da superpopulação nos criatórios e outros motivos de estresse.

De acordo com SNIESZKO (1974), a ocorrência de doenças nos peixes depende de três variáveis. Tais variáveis são controladas por fatores abióticos, bióticos e genéticos, incluindo a qualidade do ambiente, suscetibilidade ou predisposição genética dos indivíduos

aos patógenos, bem como seu estado atual de saúde e a presença do patógeno no ambiente.

O conhecimento aprofundado das bactérias intestinais é fundamental para tomar medidas profiláticas como o uso de probióticos, pois o trato gastrointestinal é um importante reservatório de bactérias aeróbias potencialmente patogênicas (VERSCHURE et al., 2000).

A população microbiana pode variar entre as espécies, porém normalmente apresentam a mesma população que está presente no meio e na dieta. A alteração desta não influencia significativamente na contagem total de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. Porém, a distribuição de espécies pode ser alterada. Essa população tem grande influência no organismo do animal, sendo as principais funções: a contribuição nutricional, resistência à colonização por microrganismos patogênicos e imunomodulação dos hospedeiros (MACFARLAND, 2000). A maior parte das bactérias encontradas na superfície dos peixes, brânquias e intestino são organismos que fazem parte da comunidade microbiana normal da água (CAHILL, 1990).

Os patógenos bacterianos de maior importância na piscicultura são gram-negativos. Dentre os agentes bacterianos amplamente distribuídos no ecossistema aquático, destacam-se aqueles pertencentes às famílias *Aeromonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. A presença nesse ambiente pode ser reconhecida através de sua detecção na pele, brânquias e intestinos dos peixes e, quando há desequilíbrio do sistema bactéria-hospedeiro-ambiente, podem estar envolvidos como agentes etiológicos primários, inclusive desencadeando epizootias em pisciculturas (ESPOSTO et al., 2007).

Existem ainda muitos outros agentes etiológicos que influenciam no surgimento de patologias em peixes. É importante destacar a existência de uma interação entre o organismo patogênico (1), o hospedeiro (2) e o ambiente (3). Quando o organismo patogênico e o hospedeiro (1-2) estão presentes, mas o ambiente não é favorável à doença, os surtos epizooticos não se produzem, e quando o ambiente é propício à doença e o hospedeiro está

presente (1-3) ela não se manifesta, a não ser que o organismo patogênico esteja também presente. No entanto, quando acontecem as condições 1, 2 e 3, desenvolve-se um surto epizootico explosivo. Nestas circunstâncias é indispensável uma adequada terapia, uma vez que em reduzido período de tempo, se não houver o devido tratamento, seguido do manejo adequado e medidas profiláticas indicadas, a doença irá se manifestar novamente (PAVANELLI et al., 2008).

Se compararmos os peixes com animais terrestres, a sua microbiota é menos populosamente densa, mas suas funções parecem ser semelhantes, mas em relação ao habitat os peixes possuem um maior contato com as bactérias do ambiente, sendo mais suscetível a contaminação (NAVARRETE et al., 2010). A microbiota que habita o trato digestório dos peixes está relacionada diretamente com a fisiologia, principalmente com metabolismo dos nutrientes e da ação de resistência contra outros agentes bacterianos, por meio de seleção (BAUER et al., 2006). Sua colonização se dá por bactérias heterotróficas, ou seja, que necessitam dos hospedeiros para seu desenvolvimento, sendo um exemplo de uma relação simbiótica (HOOPER & GORDON, 2001). Observa-se uma dominância de bactérias Gram negativas no trato digestório de peixes de água doce, sendo geralmente bactérias do gênero *Aeromonas spp* e *Pseudomonas spp* e espécies *Flavobacterium* e *Cytophaga* (RINGO & BIRKBECK, 1999).

A bactéria do gênero *Aeromonas* tem apresentado problemas para a aquicultura intensiva nos últimos anos, ocorrendo com maior frequência nos diagnósticos de doenças de peixes, onde muitas vezes são identificadas como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce, tendo como principais sinais clínicos a perda de escamas, surgimento de manchas despigmentadas na pele, onde essas manchas geralmente evoluem em ulcerações, exoftalmia, ascite, intestino com aspecto inflamatório e coloração avermelhada (GHENGHESH et al., 2001; SAHA & PAL, 2002),

proporcionando prejuízos significativos na produção e na qualidade do pescado (RADU et al., 2003; KOZINSKA, 2007). As *Flavobacterium* são bactérias oportunista, sendo a principal causadora da columnariose , apresentando lesões com pontos brancos na nadadeira caudal e progride até a cabeça (GEORGIADIS et al., 2001; FIGUEIREDO, 2008).

O gênero *Pseudomonas* também causadoras de septicemia apresentam sinais clínicos semelhantes às *Aeromonas*. Estas bactérias estão presentes em praticamente todos os ambientes de água doce e se manifestam no momento em que os peixes estão debilitados por problemas de qualidade da água, nutricionais, temperaturas baixas ou por um manuseio inadequado (KUBITZA, 2005).

3. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. et al. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, Denmark, v.71, 2010.

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**, Egypt, v.27, p. 454-459, 2009.

AGOSTINHO, L. M. **Própolis no desempenho produtivo de juvenis de pacú criados em tanque rede e arraçoados com baixa e alta frequência alimentar**. 2010. 36f. Dissertação (Mestrado) - Zootecnia - FMVZ, Universidade Estadual Paulista.

ARANA, L.V. **Fundamentos de Aquicultura**. Santa Catarina: Florianópolis, 2004.

ARAUCO, L.R.R. et al. 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**, Santa Catarina, v.29, p.227-234, 2007.

AZEVEDO, P. **Aclimação da tilápia no Brasil**. Chácaras e quintais, v.2, 191-92, 1955.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm**, São Paulo, v.22, p. 318-22, 2009.

BAUER, E. et al. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. **Nutrition research reviews**, Alemanha, v.19, p. 63-78, 2006.

BEJERANO, Y. et al. Mass mortalities in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) associated with bacterial infection following handling. **Journal of Fish Diseases**, v. 2, p. 49-56, 1979.

BRASIL. **Ministério de Pesca e Aquicultura**. Boletim estatístico de pesca e aquicultura. 2010.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. Brasília, DF. 2012. 128p.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos. 2013.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, São Paulo, v.55, p. 149-152, 1998.

BOSCOLO, W.R. et al. Farinhas de peixe, carne e ossos, vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Maringá, v.30, p. 1397-1402. 2001.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environment Microbiology**, New York, v.8, p. 1137-1144, 2006.

CABRAL. I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividades antimicrobiana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

CAHILL, M. M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microbial Ecology**, New York, v.19, p. 21-41, 1990.

CARNEIRO, D. O. et al. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arq. bras. med. vet. zootec**, Minas Gerais, v.59, p. 869-876, 2007.

CASTRO, M.L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p-1512-1516, 2007.

CHO, S.H. Effects of Putative Growth or Health-Enhancing Dietary Additives on Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Performance. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 42, 2011.

CHU, W.H. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish & Shellfish Immunology**, Amsterdam, China, v.21, p.113-117, 2006.

COELHO, M. D. S. et al. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Arch. Zootec**, Paraíba, v. 59, p. 95-112, 2010.

COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. 2003. 54p. Tese (Doutorado) - Universidade São Paulo.

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

CYRINO, J.E.; CONTE, L.; Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati In: AquaCiência 2004, Jaboticabal, **Anais...** Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2006, cap.12, p.151-171.

CYRINO, J. E. P. e FRACALOSSO, D. M. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, 2013,

DA SILVA FRANCO, S., ROSA, A. P., LENGLER, S., UTTPATEL, R., ZANELLA, I., GRESSLER, C., & DE SOUZA, H. M. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais, **Ciência rural**, Santa Maria, v.37, p. 1765-1771, 2007.

DENG, J. et al. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol Biochem**, China, v.37,p.959–967, 2011.

DENLI, M. et al. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. **Pakistan Journal of Nutrition**, Paquistão, v.2, p.89-91, 2003.

DENLI, M. et al. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Asian-Aust. J. Anim. Sci**, Turkey, v.18, p 848-854, 2005.

EL-SAYED, A. M. **Tilapia Culture**. London: Cabi, 2006. 1v.

ESPOSTO, E. M. et al. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesq. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, v.27, p.144-148, 2007.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2010, p. 197.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2012, p.230.

FERREIRA, D.; BARCELLOS, G.L.J. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura; **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v.4, p.601-611, 2008.

FERREIRA, P. M. F. et al. Avaliação do consumo de oxigênio da tilápia do Nilo submetidas a diferentes estressores. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, Minas Gerais, v. 6, n. 1, p. 56-62, 2011.

FIGUEIREDO, H. C. P. LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 8-14, 2008.

FITZSIMMONS, K. Market stability: why tilapia supply and demand have avoided the boom and bust of other commodities. 4th International trade and technical conference and exposition os tilapia. Kuala Lumpur, Malasia, 2015. Acessado em: <http://infopesca.org/content/conferencia-internacional-de-tilapia>. Março de 2016.

FRANCO, S.S. et al. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.1765-1771, 2007.

GAMA, C. S. A criação de tilapia no estado do Amapá como fonte de risco ambiental. **Acta Amazonica**, Amapá, v. 38, p. 525-530, 2008.

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* “in vitro” e em coelhos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Paraná, v. 26, p. 69-77, 2004.

GEORGIADIS, M.P. et al. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. **Preventive Veterinary Medicine**, Califórnia, v.48, p.287-302, 2001

GHENGHESH, K. S. et al. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 169-173, 2001.

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

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura- Usos e Restrições, In: **Saúde Aviária e Doenças**, Ed. Andreatti Filho, R., p. 35-40, 2007.

HILDSORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v.22, p.73-78, 1995.

HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. Commensal hostbacterial relationships in the gut. **Science**, St. Louis, v.292, p.1115-1118, 2001.

JIN, L.Z. et al. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxinogenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, Canadá, v.66, p.4200-4204, 2000.

JORY, D.E et al. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte américa. **Panorama Acuicola**, Estados Unidos, v.5, p. 50-53, 2000.

KASHKOOLLI, O.B. et al. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Isfahan, v.74, p.315–318, 2011.

KIM, G. B. et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, China, v. 90, p.75–82, 2011.

KRELL, R. Value-added products from beekeeping: Chapter 5: Propolis. **FAO Agricultural Services Bulletin n.º. 124**. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 1996.

KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, São Paulo, v.61, p.367-369, 1997.

KOZIŃSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of fish diseases**, Tulawy, v.30, p.293-301, 2007.

KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. P. 287, 2000.

KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 15, n. 89, p. 18, 2005.

LEAL, C.A.G. Doenças e Enfermidades na Tilapicultura. In: XIII Seminário Nordeste de Pecuária - PECNORDESTE e a Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários. 2009. Fortaleza: Ceará. **Anais...** do PECNORDESTE, 2009.

- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. As principais espécies produzidas no Brasil. In: Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. Guaíba: **Agrolivros**, p.143-206, 2011.
- LUSTOSA, S. R. et al. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Recife, v.18, p. 447-454, 2008.
- MACFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microb. Ecol. Health Dis**, Estados Unidos, v. 12, p. 193-207, 2000.
- MAINARDES-PINTO, C.S.R. et al. Estudo comparativo do crescimento de machos de *Oreochromis niloticus* em diferentes períodos de cultivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.16, 19-27, 1989.
- MARCUCCI, M.C. Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v.26, p. 83–99, 1995.
- MAZZUCO, H. et al. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia Agrícola**, São Paulo, v.53, 1996.
- MCMULLIN, P. Produção Avícola sem Antibióticos: Riscos Potenciais de Contaminação e Detecção de Resíduos. **Poultry Health Services**, Dalton, Thirsk, North Yorkshire, U.K., p. 219- 226, 2004.
- MEURER, F.; HAYASHI, C. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de peixes – Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.6, p.127-138, 2003.
- MEURER, F. et al. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Maringá, v.9, 2008.
- MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*,) fingerlings. **Aquacult Res**, Pernambuco, v.40, p. 603-608, 2009.

MIORIN P.L. Composição química e atividade antibacteriana do mel e da própolis de *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* com *Staphylococcus aureus*. Tese de mestrado em microbiologia. ICB, São Paulo, p.150, 2003.

MOESCH, A. **Glicerol bruto, derivado da produção do biodiesel, em rações peletizadas para diferentes fases de tilápia do Nilo.** 2014. 112f. Dissertação (Mestrado) em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal do Paraná.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. Produção pesqueira e aquícola: **Estatística 2008 e 2009.** Brasília, pp. 30, 2010.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura.. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura.** Disponível em: Acesso em: 17 jan. 2015.

MOURA, L.P.P. et al. Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocitos por grama de fezes de Eimeria spp. em coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Nova Zelândia, v.27, p. 325-330, 1998.

NAVARRETE, P. et al. Effect of Thymus vulgaris essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, Chile,v.41, p.667-678, 2010

PACKER, J. F., LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**, João Pessoa, v.17, p. 102-107, 2007.

PARK, Y.K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. São Paulo, v.18, p.313-318, 1998.

PAVANELLI, G. C. et al. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnósticos e tratamentos.** Maringá: Nupleia, 1998. v.1.

PAVANELLI, G.C. et al. **Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Eduem, Maringá, 2008. v.1.

PINTO, A. C. D. V. A. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, v.34, p.159-163, 2004.

PODOLSKI, J. Situación actual de la fitoterapia. Propiedades biológicas de principios activos de origen vegetal contenidos em el propóleos. In: **CONGRESO INTERNACIONAL DE PROPÓLEOS.**, Argentina, p.32-33, 2000.

RADU, S. et al. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Malásia, v.81, p.261-266, 2003.

RINGO, E.; BIRKBECK, T. H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture research**, Stakkevollveien, v.30, p.73-93, 1999.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. Letters in **Applied Microbiology**, India, v.34, p.311-316, 2002.

SANTANA, E. S. et al. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.7, p.985-1009, 2011.

SANTIN, E. et al. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, São Paulo, v.10, p.236-244, 2001.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v.35, p.421-463, 2012.

SNIESZKO, S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. **Journal of Fish Biology**, Flórida, v.6, p. 197-208, 1974.

TORANZO, A.E. et al. Enfermidades Bacterianas y Víricas de Peces Marinos. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A. 2004 . **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo. 2004.

UCZAY, J. et al. Própolis em dietas para o jundiá= Propolis in diets for silver catfish. **Bioscience Journal**, Minas Gerais, v. 30, n. 6, 2014.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiol Res**, p.189-195, 2005.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: **Anais...** Congresso de Zootecnia, Vila Real, Portugal, Proceedings of the Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. p. 111-18. 2002.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR, Belgium, v.64, p.655–71, 2000.

WILLIAMS, M. J. Aquaculture and sustainable food security in the developing world. **Sustainable Aquaculture**, p.15-51, 1997.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a inclusão de níveis crescentes do extrato de própolis da região Oeste do Paraná como promotor de crescimento nas fases de larvicultura e alevinagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do extrato de própolis sobre os parâmetros de desempenho (peso final, comprimento total e padrão, fator de condição corporal), histologia e microbiologia intestinal para ambos os experimento e para o experimento um análise da composição química da carcaça, índice hepatossomático.

EXPERIMENTO I

Extrato de própolis como promotor de crescimento para alevinos de tilápias do Nilo
submetidos a alta densidade de estocagem

**Extrato de própolis como promotor de crescimento para alevinos de tilápias do Nilo
submetidos à alta densidade de estocagem**

**Propolis extract as a growth promoter for fingerlings of tilapia subjected to high density
storage**

Rogério Luiz Zilli¹ Marlise Lilian Dena dos Santos¹ Marco Antonio Bacellar Barreiros³

Fábio Meurer² Teresinha Mauerwerk¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a inclusão de níveis crescentes do extrato de própolis produzido na região Oeste do Paraná, como promotor de crescimento para alevinos de tilápia do Nilo, submetidos ao cultivo em alta densidade de estocagem. O presente estudo foi realizado na Universidade Federal do Paraná no Setor de Palotina, durante um período de 45 dias. Foram utilizados 600 alevinos de tilápia do Nilo ($\pm 1,0g$), distribuídos em 30 tanques de 60 litros cada com delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições. Os tanques foram dispostos em sistema de recirculação da água, com biofiltro central e aeração individual. Os níveis de inclusão testados foram de 10, 20, 30 e 40 mL/kg⁻¹ de extrato de própolis nas rações e uma ração controle. Ao final do período experimental, todos os alevinos de cada unidade experimental foram contados, pesados e medidos individualmente para a determinação dos parâmetros médios de peso final, comprimento total, comprimento padrão e fator de condição corporal. Três alevinos tiveram o hepatopâncreas e intestino extraídos para determinação do índice hepatossomático e análise histológica. Houve efeito quadrático ($p < 0,05$) dos tratamentos para o fator de condição corporal. A inclusão do extrato de própolis da região oeste do Paraná em rações para alevinos de tilápia do Nilo proporcionou um aumento na diversidade da microbiota intestinal.

Palavras-chave: alimentação, *Oreochromis niloticus*, crescimento, microbiologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the inclusion of increasing levels of propolis extract produced in western Paraná, as a growth promoter for tilapia Nile submitted to the cultivation for high density storage. This study was conducted at the Universidade Federal do Paraná in Palotina industry for a period of 45 days. 600 fingerlings of Nile tilapia were used (± 1.0 g), in 30 tanks of 60 liters each with a completely randomized design with five treatments and six replications. The tanks were arranged in recirculating water system with central and individual biofilter aeration. Tested inclusion levels were 10, 20, 30 and 40 mL / kg-1 propolis extract in diets and a control diet. At the end of the trial period, all fingerlings each experimental unit were counted, weighed and measured individually to determine the mean parameters of final weight, total length, standard length and body condition factor. Three fingerlings had the hepatopancreas and intestine extracted to determine the hepatosomatic index and histological analysis. There was a quadratic effect ($p < 0.05$) of the treatments for the factor of body condition. The inclusion of the western region of Paraná propolis extract in diets for fingerlings of Nile tilapia resulted in an increase in the diversity of the intestinal microbiota.

Key words: feeding, *Oreochromis niloticus*, , growth, microbiology.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da pressão quanto à intensidade da produção, os consequentes problemas com a qualidade da água podem levar a ocorrência com enfermidades, ocasionando relevantes prejuízos para a piscicultura (MACEDO & SIPAUBA-TAVARES., 2010). A tilápia é cultivada em todos os continentes, principalmente nas áreas tropicais, havendo catalogados pela FAO mais de 140 países produtores (FITZSIMMONS, 2015).

Em função destes problemas com enfermidades teve início da utilização de antibióticos como promotores de crescimento, proporcionando significativos resultados sobre o desempenho zootécnico e sanidade dos animais. Porém, com o passar do tempo o uso indiscriminado destes quimioterápicos produziu cepas microbianas com genes de resistência, diminuindo cada vez mais a eficácia do produto (VÁZQUEZ et al., 2005), além da possibilidade da poluição ambiental (BOYD & MASSAUNT, 1999).

A União Europeia restringiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento, principalmente para monogástricos (SANTANA et al, 2011), o que levou a busca por promotores de crescimento, partindo para o rumo dos produtos e de origem vegetal, que demonstram uma boa efetividade contra bactérias, além de não proporcionar o desenvolvimento de resistência a diversos modos de ação, sendo ainda biodegradáveis e de baixo custo de aquisição (DOTTA, 2013).

A própolis é um produto apícola, produzido a partir de resinas de origem vegetal, que pode ser utilizado como promotor de crescimento, obtendo destaque na produção aquícola, podendo substituir os produtos quimioterápicos (GARCIA et al., 2004). Os estudos sobre a utilização da própolis na alimentação peixes ainda são escassos (MEURER et al, 2009), principalmente nas fases iniciais, mas com boas perspectivas para o futuro. Desta forma, o

presente trabalho pode auxiliar no aumento do conhecimento sobre o uso deste produto na alimentação da tilápia do Nilo nas fases iniciais de criação.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a inclusão de níveis crescentes do extrato da própolis produzida na região Oeste do Paraná como promotor de crescimento na fase alevinagem da tilápia do Nilo submetidos a uma criação em alta densidade de estocagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado Universidade Federal do Paraná no Setor Palotina. O experimento teve duração de 45 dias, onde 600 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com cerca de 45 dias de idade e cerca de 1g de peso médio foram distribuídos em 30 aquários, em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições (0 – Controle, 10, 20, 30 e 40 mL de extrato de própolis kg⁻¹ de ração), sendo cada unidade experimental constituída por um aquário de 60 L com 20 alevinos cada.

Os aquários possuíam aeração constante, por meio de pedras microporosas ligadas a mini-compressores de ar e o manejo experimental consistiu de uma sifonagem diária pela manhã (7h00) e tarde (16h30min), com a remoção de cerca de 20% da água na primeira semana e 40% até o final do período experimental, além da troca de água também era removidas as fezes e eventuais restos de ração. A limpeza interna das paredes dos aquários foi realizada semanalmente para evitar o aparecimento de perifíton.

A própolis utilizada para a confecção do extrato foi proveniente de apicultores da região Oeste do Paraná. O processamento adotado para a fabricação do extrato foi à dissolução de 100g da própolis seca, em 1L de álcool de cereais, o qual foi armazenado em um local escuro por 30 dias. Posteriormente, filtrou-se o extrato alcoólico, o qual foi envasado e mantido refrigerado.

Para a fabricação da ração experimental (Tabela 2) os ingredientes foram moídos (0,5mm) e posteriormente misturados conforme a formulação. Para a adição do extrato alcoólico da própolis de cada tratamento dissolveu-se em 100mL de água destilada e posteriormente misturou-se a cada ração.

Após a adição do extrato da propolis a ração foi peletizada a ração e processou-se para a adequação do seu tamanho à boca dos alevinos conforme a metodologia descrita por MEURER et al. (2003). Os peixes foram arraçoados três vezes ao dia (8h00, 12h00 e 17h00) em um nível de 8% do peso vivo, semanalmente realizava-se a readequação da quantidade de ração fornecida.

Ao final do período experimental, todos os alevinos de cada unidade experimental foram contados, pesados e medidos individualmente para a determinação dos parâmetros médios de peso, comprimento total, comprimento padrão e fator de condição. Foram escolhidos aleatoriamente três peixes de cada unidade experimental para a coleta do hepatopâncreas e do intestino, para as análises do índice hepatossomático e a histologia, respectivamente.

Tabela 2 - Composição percentual e química da ração experimental base (matéria natural) continua.

Ingredientes	(%)
Farelo de soja	70,84
Milho	16,68
Óleo de soja	4,98
Suplemento mineral e vitamínico1	4,00
Fosfato bicálcico	2,77
Sal comum	0,50
Calcário calcítico	0,22
BHT	0,1
Total	100,00
Nutrientes	(%)
Energia digestível (kcal/kg) ³	3.000,00
Proteína bruta (%) ²	33,54
Proteína digestível (kcal/kg) ³	30,00
Extrato etéreo (%)	26,62

Tabela 3 - Composição percentual e química da ração experimental base (matéria natural) conclusão.

Fibra bruta (%) ²	4,51
Ácido linoléico (%) ²	3,52
Lisina (%) ²	2,01
Cálcio (%) ²	1,00
Fósforo disponível (%) ³	0,97
Metionina + cistina (%) ²	0,96

¹Níveis de garantia por quilograma do produto (Rovimix peixes): Vit. A, 500.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 5.000 mg; Vit. K3, 1.000 mg; Vit. B1, 1.500 mg; Vit. B2, 1.500 mg; Vit. B6, 1.500 mg; Vit. B12, 4.000 mg; Ác. Fólico, 500 mg; Pantotenato Ca, 4.000 mg; Vit. C, 15.000 mg; Biotina, 50 mg; Inositol, 10.000; Nicotinamida, 7.000; Colina, 40.000 mg; Co, 10mg; Cu, 500 mg; Fe, 5.000mg; I, 50 mg; Mn, 1500 mg; Se, 10 mg; Zn, 5.000 mg.

²Exigência nutricional baseada no NRC (1993) e Hayashi et al. (2002).

³ De acordo com Pezzato (2002).

Para avaliação histológica foram coletados fragmentos do intestino de três alevinos, as análises foram realizadas no Laboratório de Histopatologia da UFPR, Setor Palotina. O material biológico foi fixado em formol tamponado e posteriormente conservado em álcool 70%. Foram então desidratados em uma série ascendente de álcool 70% até o 100%, posteriormente diafanizados em xilol por 30 minutos, e incluídos em parafina, para a obtenção de cortes histológicos semisseriados. A microtomia foi executada de modo a obter cortes histológicos de 7µm.

Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). A fotodocumentação foi realizada no fotomicroscópio Olympus BX50 em objetiva de 4x, utilizando-se sistema de imagens computadorizado (Image Pro Plus – Versão 5.2-Media Cibernética).

De cada unidade experimental, quatro alevinos foram escolhidos aleatoriamente para a análise da diversidade bacteriana e determinação dos gêneros bacterianos presentes. Os peixes foram abatidos, em seguida realizou-se uma assepsia corporal e posteriormente foram moídos e homogeneizados. Do material homogeneizado, foram feitas diluições decimais em tubos com água destilada estéril (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Para a contagem de diversidade de bactérias totais utilizou-se o meio em ágar padrão de contagem em placas de Petri, utilizando 1mL das soluções de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e pura. Após o preparo das placas de Petri, as mesmas foram colocadas em uma estufa microbiológica, para incubação a 27°C por 48 horas. Após este período foram feitas leitura das placas por meio de contagem das colônias e determinação das ufc.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias) de acordo com os gêneros bacterianos e suas características de crescimento. Quanto à identificação foram utilizados kits API da Biomerieux. Para as *Enterobacterias* é usado o API_E, para *Estafilococos* o API_STAPH e para as outras o API_NE. Anteriormente para saber qual o kit a ser usado método de Gram e oxidase.

Os dados dos parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados diariamente (oxigênio e temperatura) e semanalmente (pH, condutividade, nitrogênio amoniacal, dureza e alcalinidade)

Os demais alevinos foram armazenados em sacos plásticos e mantidos congelados em freezer para posteriores análises da composição centesimal da carcaça (umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas) segundo metodologia de SILVA & QUEIROZ (2002).

Depois de calculados os valores de desempenho, sobrevivência, IHS, composição química da carcaça e histologia do intestino, submeteu-se os dados à análise de variância e análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, os parâmetros de qualidade de água do sistema mantiveram-se dentro da faixa de conforto para a tilápia do Nilo, conforme preconizado por KUBITZA, (2000), com valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, nitrito e

amônia de: $26,8 \pm 1,1$ °C; $5,3 \pm 2,0$ mg/L; $7,5 \pm 0,2$; $0,05 \pm 0,10$ mg/L; $0,04 \pm 0,02$ mg/L, respectivamente.

Em relação aos parâmetros de desempenho não foi verificado efeito significativo ($P < 0,05$) representados na (Tabela 3). Estes resultados podem ter sido influenciados pela composição química da própolis que é muito variada e complexa, estando relacionada com o período de coleta de resina, pela ecologia da flora presente (DOS SANTOS et al., 2003; PARK et al., 2002). O mesmo resultado encontrado por UCZAY et al. (2011), onde a adição de extrato etanólico de própolis não mostrou-se eficaz como um aditivo para o crescimento de carpa comum. CAMPAGNOLO et al. (2013) utilizou doses de um aditivo comercial micro encapsulado de óleos essenciais e também não encontrou resultados significativos em relação ao crescimento de alevinos tilápia do Nilo, resultado semelhante ao encontrado por UCZAY et al. (2014), onde foram adicionadas doses de extrato de própolis para juvenis de jundiás e o mesmo não mostrou-se eficaz em relação ao crescimento. SANTOS et al. (2013) acrescentando diferentes níveis de resíduo do processamento do extrato de própolis vermelha em ração comercial para alevinos de tilápia do Nilo, não observou efeitos significativos para o desempenho produtivo.

Resultados divergentes a esta pesquisa foram descritos por DENG et al. (2011) que observaram melhora nas taxas de crescimento, indicando que o extrato etanólico de própolis atuou como promotor de crescimento para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), resultado semelhante ao encontrado por MEURER, F. et al. (2009), fornecendo extrato de própolis marrom para alevinos de tilapia do Nilo, o mesmo proporcionou melhora no ganho de peso quando adicionado $2,22 \text{ mL/kg}^{-1}$ de ração.

Em relação ao fator de condição, o extrato da própolis provocou efeito quadrático para os alevinos de tilápia do Nilo (figura 01) apresentando um ponto de máxima em $21,96 \text{ mL/kg}$ de ração. O fator de condição é uma variável de extrema importância na avaliação do

desenvolvimento dos peixes, serve de estimativa no crescimento futuro dos animais. Este resultado de melhora da condição corporal indica que possivelmente os peixes tratados com extrato de própolis venham a apresentar melhores taxas de crescimento, sobrevivência, maior potencial reprodutivo, comparados a peixes não tratados com própolis (CHO, 2011).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por UCZAY et al. (2014), onde o melhor resultado de fator de condição ocorreu ao nível de 20 mL de inclusão de própolis na alimentação de jundiá. Diferindo SANTOS et al., (2013) avaliou a adição de diferentes níveis do resíduo de própolis vermelha numa ração comercial sobre o desempenho de alevinos de tilápia do Nilo e o mesmo não encontrou diferença em relação ao fator de condição dos animais.

POPE & KRUSE (2001) enfatizam que o fator de condição é entendido como um indicador das reservas energéticas dos tecidos, comprovando dessa forma que um peixe com condição relativamente melhor apresente taxas de crescimento superiores, bem como maior potencial reprodutivo e de sobrevivência que outro em pior condição, em situações ambientais comparáveis.

Figura 1 - Fator de condição corporal de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do paraná e submetidos ao desafio sanitário.

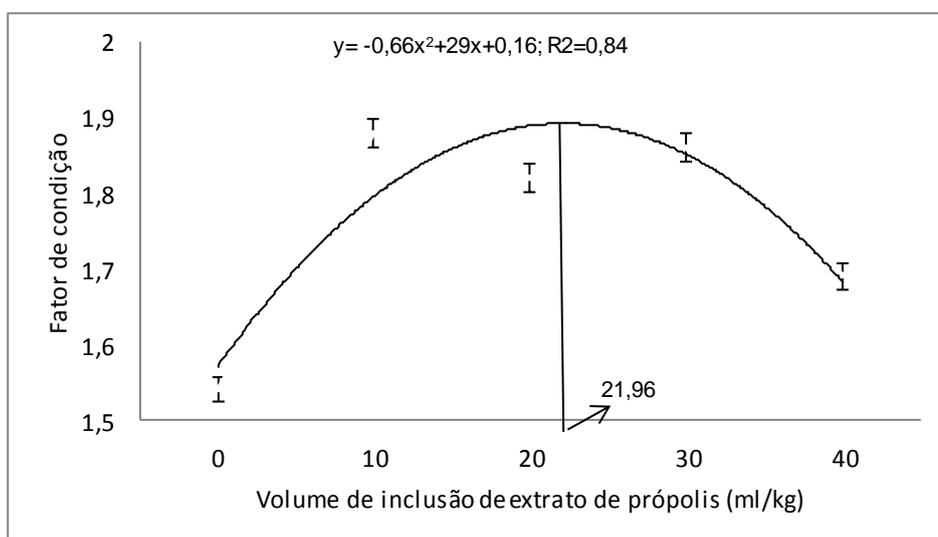


Tabela 4 - Parâmetros de desempenho e histológicos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do Paraná e submetidas à alta densidade de estocagem.

Parâmetro	Níveis de própolis por kg de ração				
	0 mL	10 mL	20 mL	30 ml	40 mL
Peso final (g) ^{ns}	7,69±1,28 ^a	7,76±1,00 ^a	8,72±3,08 ^a	8,33±1,81 ^a	9,20±1,35 ^a
Comprimento total (cm) ^{ns}	8,36±1,94 ^a	7,44±0,43 ^a	7,75±0,84 ^a	7,64±0,69 ^a	8,18±0,60 ^a
Comprimento padrão (cm) ^{ns}	5,89±0,38 ^a	5,86±0,36 ^a	6,15±0,70 ^a	6,07±0,59 ^a	6,46±0,49 ^a
Índice hepatossomático ^{ns}	2,12±0,39 ^a	2,37±0,23 ^a	2,09±0,28 ^a	2,36±0,33 ^a	1,91±0,68 ^a
Fator de condição corporal*	1,54±0,59 ^a	1,88±0,15 ^b	1,82±0,12 ^b	1,86±0,16 ^b	1,69±0,24 ^b
Altura dos vilos intestinais (µm) ^{ns}	14,55±4,87 ^a	12,76±3,04 ^a	11,84±3,52 ^a	14,77±5,73 ^a	13,25±4,84 ^a

^{ns}Não significativo

*Efeito quadrático ($Y = -0,66x^2 + 29,00x + 0,16 / R^2 = 0,85$)

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com SANTOS et al. (2010) que também não encontraram efeitos do extrato de própolis adicionado a dieta de alevinos de tilápia do Nilo para índice hepatossomático, comprimento padrão e comprimento total. Bem como os resultados apresentados por MEURER et al. (2009) que também não verificaram a influência de diferentes níveis de extrato de própolis sobre o comprimento final e comprimento padrão de alevinos de tilápia do Nilo. Em estudo com frangos de corte alimentados com dieta suplementadas com extrato de própolis, FRANCO et al. (2007) e ACIKGOZ et al. (2005) não observaram diferenças entre as dietas suplementadas e a dieta controle.

Os tratamentos com rações contendo o extrato de própolis apresentaram aumento na diversidade de bactérias, diferindo do tratamento controle, onde a diversidade de bactérias foi inferior, semelhante resultado encontrado por DE LA ROSA. (2011) utilizando óleos essenciais de orégano na dieta para tilápia do Nilo, a qual indica alterações na

diversidade bacteriana, mas não na concentração de bactéria do trato gastrointestinal. Houve predominância de alguns gêneros de bactérias gram-negativas (Figura 2) como as *Pseudomonas*, a família Enterobacteriaceae como *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia sp*, sendo as mesmas habitantes da flora intestinal normal e patogênicos oportunistas importantes, capazes de causar numerosas infecções (GASTALHO et al., 2014). A inclusão da própolis proporciona uma diminuição para estes agentes bacterianos quando comparados ao grupo controle, principalmente para o nível de 10 mL/Kg de inclusão, além de reduzir quantidade entre o gêneros acima descritos. É importante destacar que os tratamentos com a inclusão de 10 e 20 mL de extrato de própolis apresentaram uma diversidade bacteriana superior (21 e 20 cepas, respectivamente) que a contendo 30 mL (15 cepas). O maior equilíbrio entre as bactérias pode justificar a melhora no fator de condição corporal.

A inclusão do extrato da própolis parece manter um equilíbrio entre as bactérias, mesmo mantendo uma alta diversidade. Este resultado é o mesmo sugerido para os probióticos, onde são fornecidos organismos vivos visando manter o equilíbrio da flora microbiana intestinal, melhorando sua resistência contra eventuais patógenos, aumentando à capacidade de absorção de nutrientes e aumentando a competição entre as bactérias (RIBEIRO et al, 2008).

A atividade antibacteriana de quarenta e dois extratos de plantas brasileiras contra bactérias patogênicas para peixes (*Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas hydrophila*), os valores de Concentração Mínima Inibitória (demonstraram que os extratos de *Calyptanthes clusiifolia* e *Merremia tomentosa* inibiram o crescimento de *S. agalactiae*, enquanto os extratos metanólicos de *Cariniana legalis*, *Croton floribundus* e *Myrcia velutina* inibiram o crescimento de *A. hydrophila*. Os autores ainda enfatizam que *F. columnare* foi o patógeno mais suscetível, sendo inibida por trinta e um extratos, já o *S.*

agalactiae e *A. hydrophila* foram inibidos por cinco e quatro extratos de plantas, respectivamente (CASTRO et al., 2008).

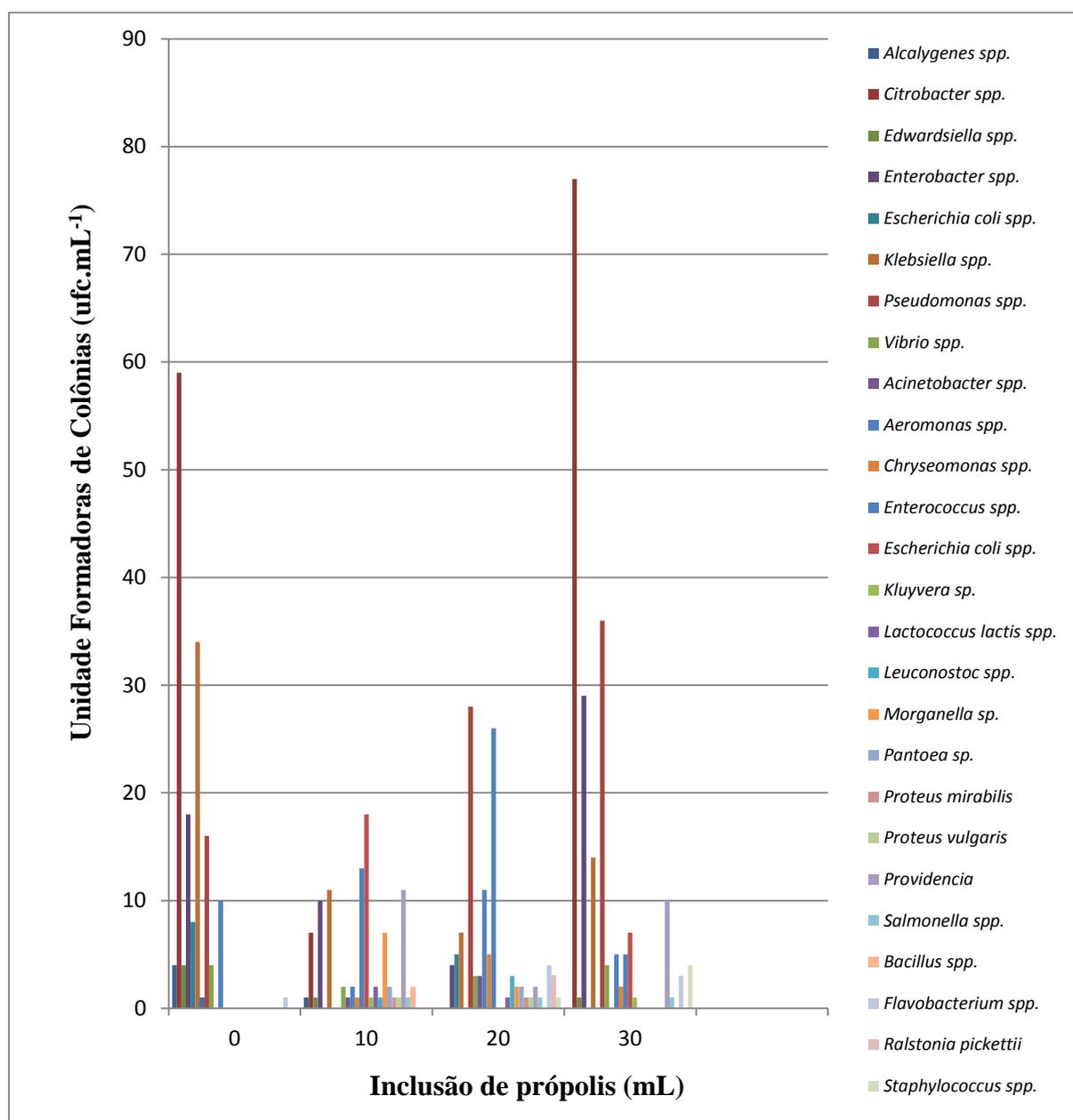
ANDRADE et al., (2012) avaliando atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *A. hydrophila* isoladas de peixes, enfatiza que as mesmas demonstram efeito bacteriostático contra os isolados de *A. hydrophila*. VARGAS et al., (2004) também afirma que a própolis possui atividade antimicrobiana “in vitro”, principalmente para bactérias Gram positivas. A própolis em dietas para tilapia do Nilo não apresentou efeito imunestimulante quando os peixes foram infectados com *A. hydrophila* (SANTOS., 2013).

Segundo KROL et al. (1993) o mecanismo de ação biológica do própolis é considerado complexo, sendo atribuído ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. Entretanto a proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (STEPANOVIC et al., 2003).

Os resultados encontrados para ação antibacteriana pode ter relação com a composição química da própolis, pois a mesma pode ser encontrada com uma composição variada e complexa (DOS SANTOS et al., 2003) e com a diversidade da flora de cada região onde as abelhas buscam a matéria prima (PARK et al., 2002).

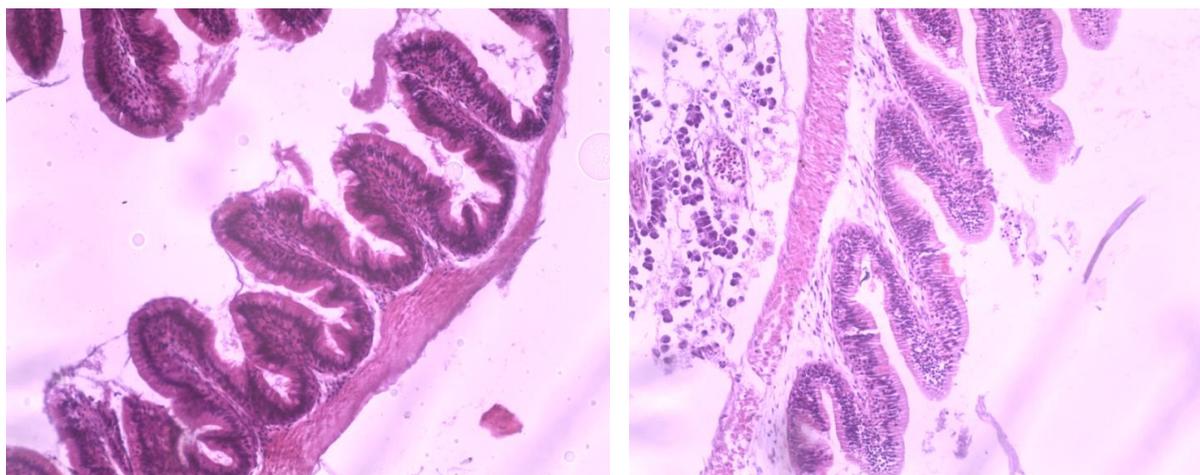
A inclusão de extrato de própolis em dietas para alevinos de tilápia proporciona alterações na microbiota intestinal, podendo melhorar do ponto de vista benéfico, pois quando adicionado doses mínimas de própolis na ração as bactérias mantiveram-se em equilíbrio, impedindo que ocorra prevalência de algumas bactérias, tornando o animal mais resistente.

Figura 2 - Quantidade e diversidade de bactérias do intestino das tilápias do Nilo.



O fornecimento de extrato de própolis do oeste do Paraná para alevinos de tilápia do Nilo não causou alterações na histologia do epitélio intestinal (Tabela 2). OETTING et al. (2006) sugeriu que os extratos vegetais podem melhorar a digestão dos animais tratados por meio de estímulo da atividade enzimática e da absorção de nitrogênio, mas também por alterações da histologia do epitélio intestinal, o mesmo não ocorreu para o presente estudo.

Figura 3 - Fotodocumentação dos vilos de intestino da tilápia do Nilo.



Os resultados encontrados no presente estudo não estão de acordo com os apresentados por SANTOS et al. (2010) que estudando alevinos de tilápia do Nilo encontraram efeito da própolis na altura dos vilos intestinais. A diferença de resultados pode ter ocorrido devido à diferença de composição de própolis e a idade dos peixes.

Os resultados das análises químicas de extrato etéreo, umidade, cinzas (Tabela 3) das carcaças para tilápia do Nilo, submetidas a dietas contendo níveis crescentes de inclusão do extrato de própolis não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A inclusão extrato de própolis proporcionou um aumento do conteúdo de proteína corporal, diferente resultado não encontrado por UCZAY et al., (2014) utilizando a própolis na dieta para alevinos de jundiá. A melhora no fator de condição, ou seja, no estado fisiológico dos alevinos pode ter influenciado na maior deposição de proteína corporal, pois os mesmos assimilam melhor os nutrientes. ZHENG et al. (2009) registraram um aumento significativo para a concentração de proteína no músculo de juvenis de bagre do canal alimentados com dietas contendo 0,05% de óleo essencial de orégano. SHALABY et al. (2006) para alevinos de tilápia, que alimentados com níveis diferentes de extrato de alho apresentaram aumento no conteúdo de proteína corporal até 3%, o que não foi registrado para a maior dose.

Tabela 5 - Análise da composição bromatológica das carcaças de alevinos de tilápias do Nilo submetidos à inclusão de níveis crescentes de extrato de própolis da região Oeste do Paraná na ração.

Parâmetros	Diets (% de inclusão de própolis)					CV (%)
	0%	10%	20%	30%	40%	
Extrato etéreo (%) ^{ns}	10,49 ^a	10,28 ^a	11,38 ^a	11,72 ^a	11,62 ^a	0,220
Proteína bruta (%) [*]	20,48 ^a	24,03 ^b	24,01 ^b	24,43 ^b	24,12 ^b	2,667
Umidade (%) ^{ns}	74,50 ^a	74,66 ^a	75,05 ^a	74,99 ^a	76,36 ^a	0,236
Matéria mineral (%) ^{ns}	1,53 ^a	1,41 ^a	1,34 ^a	1,37 ^a	1,70 ^a	0,711

CV= Coeficiente de Variação ^{ns} Não significativo *Efeito quadrático ($y = -0,0052x^2 + 0,2848x + 20,838R^2 = 0,89$).

Os valores encontrados para a proteína bruta, extrato etéreo, umidade e matéria mineral da carcaça foram semelhantes aos observados por OLIVEIRA et al. (2008) na avaliação química de filés de tilápia submetidos à sanitização. ALBUQUERQUE et al. (2014) utilizando *Bacillus* em dietas para alevinos de tilápia do Nilo tiveram valores inferiores ao do presente estudo. O aumento na proteína corporal dos animais representa uma melhor qualidade do pescado.

4. CONCLUSÃO

A inclusão do extrato de própolis em rações para alevinos de tilápia do Nilo proporcionou um aumento na diversidade da microbiota intestinal e melhora no fator de condição corporal, indicando uma melhora no desempenho produtivo. Referente à própolis promover o crescimento e diminuir a quantidade e a diversidade de bactéria intestinas da

tilápia do Nilo, onde a mesma era a hipótese inicial, não demonstrou excelentes resultados, porém os animais não foram submetidos a um desafio sanitário, onde os mesmos em outros estudos parecem responder melhor a inclusão de própolis na dieta. Em relação a quantidade de própolis recomenda-se a dose mínima de 10 mL/Kg de ração, devido a quantidade de matéria prima disponível e o seu valor agregado.

5. REFERÊNCIAS

- ACIKGZ, Z. et al. The effects of propolis supplementation on broiler performance and feed digestibility. **Archive Für Geflügelkunde**, Stuttgart, v. 69, p. 117–122, 2005.
- ANDRADE, N. P. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, p. 9-15, 2012.
- ALBUQUERQUE, D. M. et al. Bacillus em dietas para alevinos de tilápia do nilo, variedade gift= Bacillus in diets for fingerlings of nile tilapia, gift variety. **Bioscience Journal**, Minas Gerais, v. 31, n. 2, 2014.
- BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture Engineering**, Auburn, v.20, p.113-132, 1999.
- CAMPAGNOLO, R et al. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v. 14, 2013.
- CASTRO, S.B.R et al. Antibacterial activity of plant extracts from brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 756-760, 2008
- CHO, S.H. Effects of Putative Growth or Health-Enhancing Dietary Additives on Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Performance. **Journal Of The World Aquaculture Society**, Busan, v. 42, 2011.
- DE LA ROSA, M. G. N. **Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orřano en la dieta**. 2011. 98 f. Dissertação (Doutorado). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

DENG, J et al. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol Biochem**, v. 37, p. 959–967, 2011.

DOS SANTOS, C.R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, v.13, p. 71-74, 2003.

DOTTA, G. **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e Aloe barbadensis, suplementados na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2013. 124 f. Dissertação (Doutorado). Curso de pós-graduação em aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina.

FRANCO, S.S. et al. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.1765-1771, 2007.

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Sci Anim Sci**, Paraná, v. 26, p. 57-67, 2004.

GASTALHO, S. et al. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Portugal, v. 3, p. 29-45, 2014.

HAYASHI, C et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.823-828, 2002.

KROL, W. et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus. **Arzneimittel-Forschung**, Polônia, v. 43, p. 607-609, 1993.

KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. 287 páginas. 2000.

MACEDO, C. F; SIPAUBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Bol. Inst. Pesca**. São Paulo, v. 36, p. 149-163, 2010.

MEURER, F.; HAYASHI, C. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de peixes – Revisão. **273 Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Paraná, v.6, p.127-138, 2003.

MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*,) fingerlings. **Aquaculture Research**, Pernambuco, v. 40, p. 603-608, 2009.

NRC. **Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals**. Washington, D.C.: 1993. 114p.

OETTING, L.L et al. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Minas Gerais, v. 35, p. 1389-1397, 2006.

OLIVEIRA, N. M. S. et al. Avaliação físico-química de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos à sanitização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 28, p. 83-89, 2008.

PACKER, J. F; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev. bras. Farmacognosia*, Curitiba, vol. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARK, Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. Minas Gerais, v.31, p.1595-1604, 2002.

POPE, K. L. et al. Assessment of fish condition data. Statistical Analyses of Freshwater Fisheries Data. **American Fisheries Society Publication**, Alaska, v. 74, p. 51-56, 2001.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Probióticos na Aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, Minas Gerais, v. 6, p. 837-846, 2008.

SHALABY, A.M.; KHATTAB, Y.A.; ABDEL RAHMAN, A.M. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, p.172-201, 2006.

SANTANA, E. S. et al. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 985-1009, 2011.

SANTOS, E.L. **Aditivos naturais promotores de crescimento em dietas para tilápia do Nilo**. 2010. 73f. Tese (Doutorado), Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, Universidade Federal de Pernambuco.

SANTOS, E. L. et al. Resíduo do processamento do extrato de própolis vermelha em ração comercial para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Comunicata Scientiae**, São Paulo, v. 4, p. 179-185, 2013.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.

STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, Belgrade, v.158, p.353- 357, 2003.

UCZAY, J. et al. Propolis in diets for silver catfish (Teleostei, Pimelodidae). **Bioscience Journal**, São Paulo, v. 30, p. 1912-1918, 2014.

UFV - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 8.0. Viçosa, Minas Gerais, 2000.

VARGAS. A. C et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34, p.159-163, 2004.

VÁZQUEZ, J.A. et al. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**. Spain, v.245, p.149-161, 2005.

ZHENG, Z.L et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against *aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, China, v.292, p.214-218, 2009.

EXPERIMENTO II

II Efeito do extrato de própolis no desempenho e microbiologia intestinal de pós-larvas de tilápias do Nilo

Efeito do extrato de própolis da região oeste do Paraná no desempenho e microbiologia intestinal de pós-larvas de tilápias do Nilo

Effect of propolis West Paraná extract on performance and intestinal microbiology post-larvae of Nile tilapia

Rogério Luiz Zilli¹ Lilian Dena dos Santos² Fábio Meurer² Marco Antonio Bacellar Barreiros³ Marlise Teresinha Mauerwerk¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão do extrato da própolis produzida no desempenho, efetividade da reversão sexual e microbiologia intestinal de pós-larvas de tilápia do Nilo criadas em alta biomassa. O presente experimento foi realizado na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, durante 30 dias. Foram utilizadas 1.800 pós-larvas de tilápia do Nilo distribuídas em 30 tanques de 60L. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0, 10, 20, 30, 40 mL de extrato de própolis por kg de ração) e seis repetições. Ao final do período experimental, todos os alevinos de cada unidade experimental foram contados, pesados e medidos individualmente para a determinação dos parâmetros médios de peso final, comprimento total, comprimento padrão e fator de condição corporal. Três alevinos tiveram o intestino extraído para análise histológica e mais três alevinos para análise da microbiologia intestinal. A inclusão de extrato de própolis promoveu efeito ($p < 0,05$) sobre o fator de condição corporal, que apresentou um efeito quadrático ($Y = -0,0008x^2 + 0,0411x + 1,20$; $R^2 = 0,74$). A inclusão do extrato de própolis da região Oeste do Paraná em rações proporcionou um aumento na diversidade da microbiota

intestinal quando incluso extrato de própolis na ração para fase de reversão sexual da tilápia do Nilo.

Palavras-chave: pós-larva, *Oreochromis niloticus*, própolis, reversão sexual, microbiologia intestinal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of inclusion of propolis extract produced in performance, effectiveness of sex reversal and intestinal microbiology post-larvae of Nile tilapia reared in high biomass. This experiment was conducted at the Federal University of Paraná - Palotina Sector, for 30 days. 1,800 post-larvae of Nile tilapia were distributed in 30 tanks of 60L. The design was completely randomized with five treatments (0, 10, 20, 30, 40 ml of propolis extract per kg of feed) and six repetitions. At the end of the trial period, all fingerlings each experimental unit were counted, weighed and measured individually to determine the mean parameters of final weight, total length, standard length and body condition factor. Three fingerlings were extracted from the intestine for histology and three fingerlings for analysis of intestinal microbiology. The inclusion of propolis extract promoted effect ($p < 0.05$) on body condition factor, which showed a quadratic effect ($Y = -0,0008x^2 + 0,0411x + 1,20$; $R^2 = 0,74$). The inclusion of Paraná Western region propolis extract in feed resulted in an increase in the diversity of the intestinal microbiota when included propolis extract in the diet for sexual reversion of Nile tilapia. **Key words:** post-larvae, *Oreochromis niloticus*, propolis, sex reversal, intestinal microbiology.

1. INTRODUÇÃO

A fase inicial de criação de tilápia do Nilo é uma das mais importantes, pois esta irá definir a qualidade e desenvolvimento do animal nas fases subsequentes (MARENGONI et al, 2014). As etapas de criação ainda não estão bem definidas, sendo geralmente denominadas como larvicultura e alevinagem, onde ocorre a eclosão das larvas até a fase de alevinagem atingindo tamanho comercial (MEURER et al., 2005).

A reversão sexual da tilápia do Nilo é um processo onde se utiliza hormônios masculinizantes (17 α -metiltestosterona), com a finalidade de obter animais monossexo machos, sendo que os mesmos atingem maior crescimento em relação às fêmeas (TACHIBANA et al, 2004).

Nas fases iniciais também ocorrem os maiores surtos de doenças, pela baixa resistência a eventuais patógenos ou por não estarem adaptados a microbiota normal presente no meio. Em função destes problemas com enfermidades teve início da utilização de antibióticos como promotores de crescimento, proporcionando significativos resultados sobre o desempenho zootécnico e sanidade dos animais (GONZALES et al, 2012).

Porém com o passar do tempo o uso indiscriminado destes quimioterápicos produziu cepas com genes de resistência, diminuindo cada vez mais a eficácia do produto (VÁZQUEZ et al., 2005), além da possibilidade da poluição ambiental (BOYD & MASSAUNT, 1999). A partir disso, iniciou-se a busca por promotores de crescimento alternativos, é nesse ponto que a própolis se destaca como um produto de origem vegetal biodegradável que não promove resistência nas bactérias e de baixo custo de aquisição (DOTTA, 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a inclusão de níveis crescentes do extrato da própolis produzidos na região Oeste do Paraná como promotor de crescimento na fase de reversão sexual da tilápia do Nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal do Paraná no Setor Palotina, durante um período de 30 dias.

Foram utilizadas 1.800 pós-larvas de tilápia do Nilo, provenientes de coleta de ovos na boca, distribuídas num delineamento experimental completamente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições. Foi considerado como unidade experimental um aquário de 60 L contendo 60 larvas.

Os aquários foram dispostos em sistema de recirculação da água, com biofiltro central e em cada tanque foi instalado sistema de aeração com difusores acoplados a um compressor radial. A temperatura da água foi aferida diariamente pela manhã e à tarde. Os demais parâmetros, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água, foram mensurados semanalmente.

A própolis utilizada para a confecção do extrato foi obtida da produção de apiários. O processamento adotado para a fabricação do extrato foi a dissolução de 100g da referida própolis seca em 1L de álcool de cereais, o qual foi armazenado em um local escuro por 30 dias. Posteriormente, o extrato alcoólico foi filtrado, envasado e mantido sob-refrigeração.

As rações experimentais utilizadas eram isocalóricas, isocálcicas, isofosfóricas e isoprotéicas, com 38% de proteína digestível e 3.700 kcal/kg de energia digestível (Tabela 5). Para a fabricação das rações os alimentos (farelo de soja, milho, farinha de peixe) foram moídos em triturador martelo com peneira de 0,5mm e posteriormente misturados. Após homogeneização, foram adicionados 60mg do hormônio 17- α -metiltestosterona/kg em cada ração de acordo com o procedimento descrito por HAYASHI (1995).

Tabela 6 - Composição percentual e química da ração experimental base (matéria natural).

Ingredientes	(%)
Farinha de peixe	40,59
Farelo de soja	38,75
Milho	10,22
Óleo de soja	8,91
Suplemento mineral e vitamínico ¹	1,00
Sal comum	0,50
BHT	0,02
Total	100,00
Nutrientes	(%)
Energia digestível (kcal/kg) ³	3700,00
Proteína bruta (%) ²	42,83
Proteína digestível (kcal/kg) ³	38,60
Extrato etéreo (%) ²	17,07
Ácido linoléico (%) ²	5,33
Lisina (%) ²	3,36
Cálcio (%) ²	2,91
Fibra bruta (%) ²	2,09
Metionina + cistina (%) ²	1,85
Fósforo disponível(%) ³	1,50

¹Níveis de garantia por quilograma do produto (Rovimix peixes): Vit. A, 500.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 5.000 mg; Vit. K3, 1.000 mg; Vit. B1, 1.500 mg; Vit. B2, 1.500 mg; Vit. B6, 1.500 mg; Vit. B12, 4.000 mg; Ác. Fólico, 500 mg; Pantotenato Ca, 4.000 mg; Vit. C, 15.000 mg; Biotina, 50 mg; Inositol, 10.000; Nicotinamida, 7.000; Colina, 40.000 mg; Co, 10mg; Cu, 500 mg; Fe, 5.000mg; I, 50 mg; Mn, 1500 mg; Se, 10 mg; Zn, 5.000 mg.

²Exigência nutricional baseada no NRC (1993) e Hayashi et al. (2002).

³ De acordo com Pezzato (2002).

Foram considerados como tratamentos os níveis de inclusão do extrato de própolis, nas concentrações de 0 – Controle, 10, 20, 30 e 40 mL/kg de ração. Para a adição do extrato alcoólico da própolis de cada tratamento foi dissolvido em 100 mL de álcool etílico e

subsequentemente misturada a cada ração. As rações foram fornecidas à vontade quatro vezes ao dia (9h00, 11h30, 14h00 e 17h00).

Ao final do período experimental, todos os alevinos de cada unidade experimental foram contados, pesados e medidos individualmente para a determinação dos parâmetros finais médios de peso, comprimento total, comprimento padrão, biomassa, sobrevivência e fator de condição corporal (peso corporal/comprimento corporal³ x 100).

De cada unidade experimental, quatro alevinos foram escolhidos aleatoriamente para a análise da diversidade bacteriana e determinação dos gêneros bacterianos presentes. Os peixes foram abatidos e foi realizada uma assepsia corporal. Posteriormente os peixes foram moídos e homogeneizados. Do material homogeneizado, foram feitas diluições decimais em tubos com água destilada estéril (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Para a contagem de diversidade de bactérias totais foi utilizado o meio em ágar padrão de contagem em placas de Petri, utilizando as soluções de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e pura. Após o preparo das placas de Petri, as mesmas foram colocadas em uma estufa microbiológica, para incubação a 27°C por 48 horas. Após este período foram feitas leitura das placas por meio de contagem das colônias e determinação das ufc.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias) de acordo com os gêneros bacterianos e suas características de crescimento. Quanto à identificação foram utilizados kits API da Biomerieux. Para as *Enterobacterias* é usado o API_E, para *Estafilococos* o API_STAPH e para as outras o API_NE. Anteriormente para saber qual o kit a ser usado método de Gram e oxidase.

Depois de calculados os resultados de desempenho, efetividade de reversão sexual, diversidade de bactérias intestinais e histologia do intestino foram submetidos à análise de variância no programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água de cultivo foram: temperatura pela manhã e a tarde $26,11 \pm 0,02^\circ\text{C}$; $27,03 \pm 0,50^\circ\text{C}$, pH $7,99 \pm 0,02$, oxigênio dissolvido $5,70 \pm 0,19$ mg/L e condutividade elétrica $50,56 \pm 1,13$. Parâmetros estes que se mantiveram dentro dos valores recomendados para a espécie (BOYD, 1990; POPMA & PHELPS, 1998).

Em relação aos parâmetros de desempenho não foi verificado efeito significativo ($P < 0,05$) representados na (Tabela 6). Estes resultados podem ter sido influenciados pela composição química da própolis que é muito variada e complexa, estando relacionada com o período de coleta de resina, pela diversidade ecológica da flora presente (DOS SANTOS et al. 2003; PARK et al., 2002). O resultado deste estudo corroboram com UCZAY et al. (2011), onde a adição de extrato etanólico de própolis não atuou como promotor de crescimento para carpa comum. SANTOS et al. (2013) não verificaram diferenças significativas para o crescimento quando adicionado diferentes níveis de resíduo do processamento do extrato de própolis vermelha na dieta para tilápia do Nilo, mesmo resultado encontrado por UCZAY et al. (2014), fornecendo doses de extrato de própolis para juvenis de jundiás não observando diferenças significativas para o crescimento. A inclusão de um aditivo comercial de óleos essenciais para o desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo, não apresentaram diferenças significativas (CAMPAGNOLO et al. 2013).

Resultados que divergem a este estudo foram descritos por MEURER et al. (2009), onde a adição de extrato de própolis marrom para alevinos de tilapia do Nilo proporcionou melhora no desempenho produtivo dos mesmos. DENG et al. (2011) propôs que a truta arco-íris obteve maior taxa de crescimento quando adicionado extrato etanólico de própolis a sua dieta.

Tabela 7 - Parâmetros de desempenho e histológicos de pós-larvas de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de extrato de própolis do oeste do Paraná e submetidas ao desafio sanitário.

Parâmetro	Níveis de própolis por kg de ração				
	0 mL	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
Peso final (g) ^{ns}	0,44±0,05 ^a	0,42±0,02 ^a	0,44±0,04 ^a	0,40±0,05 ^a	0,43±0,06 ^a
Comprimento total (cm) ^{ns}	2,90±0,06 ^a	2,82±0,07 ^a	2,86±0,12 ^a	2,79±0,14 ^a	2,87±0,16 ^a
Comprimento padrão (cm) ^{ns}	2,27±0,06 ^a	2,21±0,05 ^a	2,26±0,07 ^a	2,19±0,10 ^a	2,27±0,14 ^a
Fator de condição corporal*	1,12±0,21 ^a	1,74±0,19 ^b	1,65±0,10 ^b	1,65±0,09 ^b	1,69±0,22 ^b
Altura dos vilos intestinais (µm) ^{ns}	14,0±2,10 ^a	12,77±2,7 ^a	13,50±1,9 ^a	12,74±1,8 ^a	13,26±3,8 ^a
Efetividade de reversão sexual (%) ^{ns}	97,0±1,50 ^a	98,0±0,50 ^a	97,5±1,01 ^a	96,5±1,03 ^a	97,0±1,06 ^a
Biomassa ^{ns}	13,25±3,4 ^a	13,77±3,08 ^a	12,31±1,95 ^a	13,03±3,85 ^a	12,81±3,24 ^a
Sobrevivência (%) ^{ns}	57,0±15,0 ^a	55,0±15,0 ^a	44,0±0,08 ^a	53,0±10,0 ^a	45,0±12,0 ^a

^{ns} Não significativo *Efeito quadrático ($Y = -0,0008x^2 + 0,0411x + 1,20$; $R^2 = 0,74$).

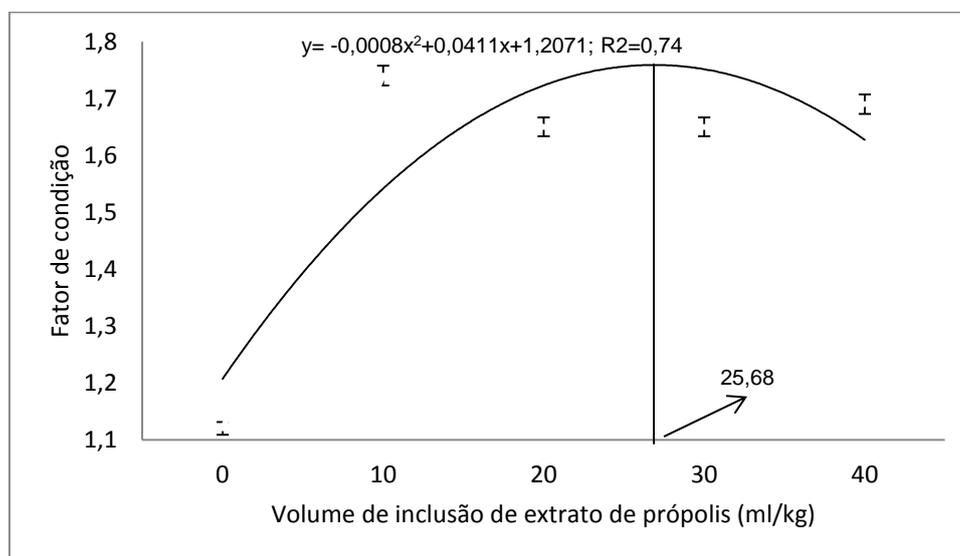
Em relação ao fator de condição, o extrato da própolis provocou efeito quadrático ($P < 0,05$) para os alevinos de tilápia do Nilo (figura 04) apresentando um ponto de máxima em 25,68 mL/kg de ração. A melhora no fator de condição corporal indica que possivelmente os peixes tratados com extrato de própolis venham a apresentar melhores taxas de crescimento, sobrevivência, maior potencial reprodutivo, comparados a peixes não tratados com própolis (CHO, 2011).

UCZAY et al. (2014), descreveram resultados semelhantes ao presente estudo, onde a inclusão de 20 mL de extrato de própolis na dieta para jundiá, proporcionou melhora no fator de condição. Diferindo SANTOS et al., (2013) avaliou a adição de diferentes níveis do

resíduo de própolis vermelha sobre o desempenho de alevinos de tilápia do Nilo e o mesmo não encontrou diferença em relação ao fator de condição dos animais.

POPE & KRUSE (2001) enfatizam que o fator de condição é entendido como um indicador das reservas energéticas dos tecidos, e dessa forma existe a expectativa de que um peixe com condição relativamente melhor apresente taxas de crescimento superiores, bem como maior potencial reprodutivo e de sobrevivência se comparado com um animal em condição relativamente pior, em situações semelhantes.

Figura 4 - Fator de condição corporal das tilápias do Nilo durante a reversão, alimentadas com níveis crescentes de extrato de própolis do Oeste do Paraná.



No presente estudo não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) para comprimento total, comprimento padrão, altura dos vilos intestinais, efetividade de reversão sexual, biomassa e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual alimentadas com níveis crescentes de extrato de própolis.

Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos resultados obtidos por SANTOS et al. (2010) que também não encontraram efeitos do própolis adicionado a dieta de alevinos de tilápia do Nilo para comprimento padrão e comprimento total. Da mesma forma que MEURER et al. (2009) não verificaram a influência de diferentes níveis de extrato de

própolis sobre o comprimento final e comprimento padrão de alevinos de tilápia do Nilo. Também não foram observadas diferenças significativas sobre a efetividade na reversão sexual, resultado semelhantes ao proposto por MAINARDES-PINTO et al., (2000) utilizando a dosagem de 60 mg de metiltestosterona, utilizando diferentes rações para tilápia do Nilo no período de masculinização, obtendo 98% de machos identificados. O sucesso no período de reversão sexual depende exclusivamente do acesso do animal ao hormônio masculinizante, portanto o ideal seria o aumento na frequência alimentar, pois ela promove um constante suprimento de hormônio no sangue, fazendo com que este hormônio permaneça na corrente sanguínea por mais tempo (MEURER, 2012). Para o presente estudo a frequência alimentar foi relativamente baixa se comparado a outros estudos, podendo ter influenciado na efetividade da reversão de pós-larvas de tilápia do Nilo.

Em relação à taxa de sobrevivência dos peixes, a mesma teve índice relativamente baixo, sendo que para esta fase vários fatores podem influenciar como: qualidade do vitelo, estado nutricional dos reprodutores, densidade de estocagem e a manipulação para avaliação de desempenho (CALADO et al., 2008).

Os tratamentos com rações contendo o extrato de própolis apresentaram aumento na diversidade de bactérias, diferindo do tratamento controle, onde a diversidade de bactérias foi inferior, semelhante resultado encontrado por DE LA ROSA., (2011) utilizando óleos essenciais de orégano na dieta na dieta para tilápia do Nilo, a qual indica alterações na diversidade bacteriana, mas não na concentração de bactéria do trato gastrointestinal. Houve predominância de alguns gêneros de bactérias gram-negativas (Figura 5). A microbiota intestinal das tilápias do tratamento controle apresentou menor variação, prevalecendo algumas espécies em maior quantidade como do gênero *citrobacter spp*, *klebsciella spp* e *enterobacter spp*. A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos organismos terrestres, é constituída predominantemente por bactérias gram-negativas

como as *Pseudomonas*, a família Enterobacteriaceae como *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia sp* GÓMEZ-GIL et al., (2000), sendo as mesmas habitantes da flora intestinal normal e patogênicos oportunistas importantes, capazes de causar numerosas infecções (GASTALHO et al., 2014).

A inclusão da própolis proporciona uma diminuição para estes agentes bacterianos quando comparados ao grupo controle, principalmente para o nível de 10 mL/Kg de inclusão, além de reduzir quantidade entre o gêneros acima descritos. É importante destacar que os tratamentos com a inclusão de 10 e 20 mL de extrato de própolis apresentaram uma diversidade bacteriana superior (12 e 11 cepas, respectivamente) que a contendo 30 e 40 mL (13 e 14 cepas, respectivamente).

A inclusão do extrato da própolis parece manter um equilíbrio entre as bactérias, mesmo mantendo uma alta diversidade. O maior equilíbrio entre as bactérias pode ter relação com a melhora no fator de condição corporal, pois este fator aumenta a higidez do animal, podendo proporcionar um melhor desempenho. Este resultado é o mesmo sugerido para os probióticos, onde são fornecidos organismos vivos visando manter o equilíbrio da flora microbiana intestinal, melhorando sua resistência contra eventuais patógenos, aumentando à capacidade de absorção de nutrientes e aumentando a competição entre as bactérias (RIBEIRO et al, 2008).

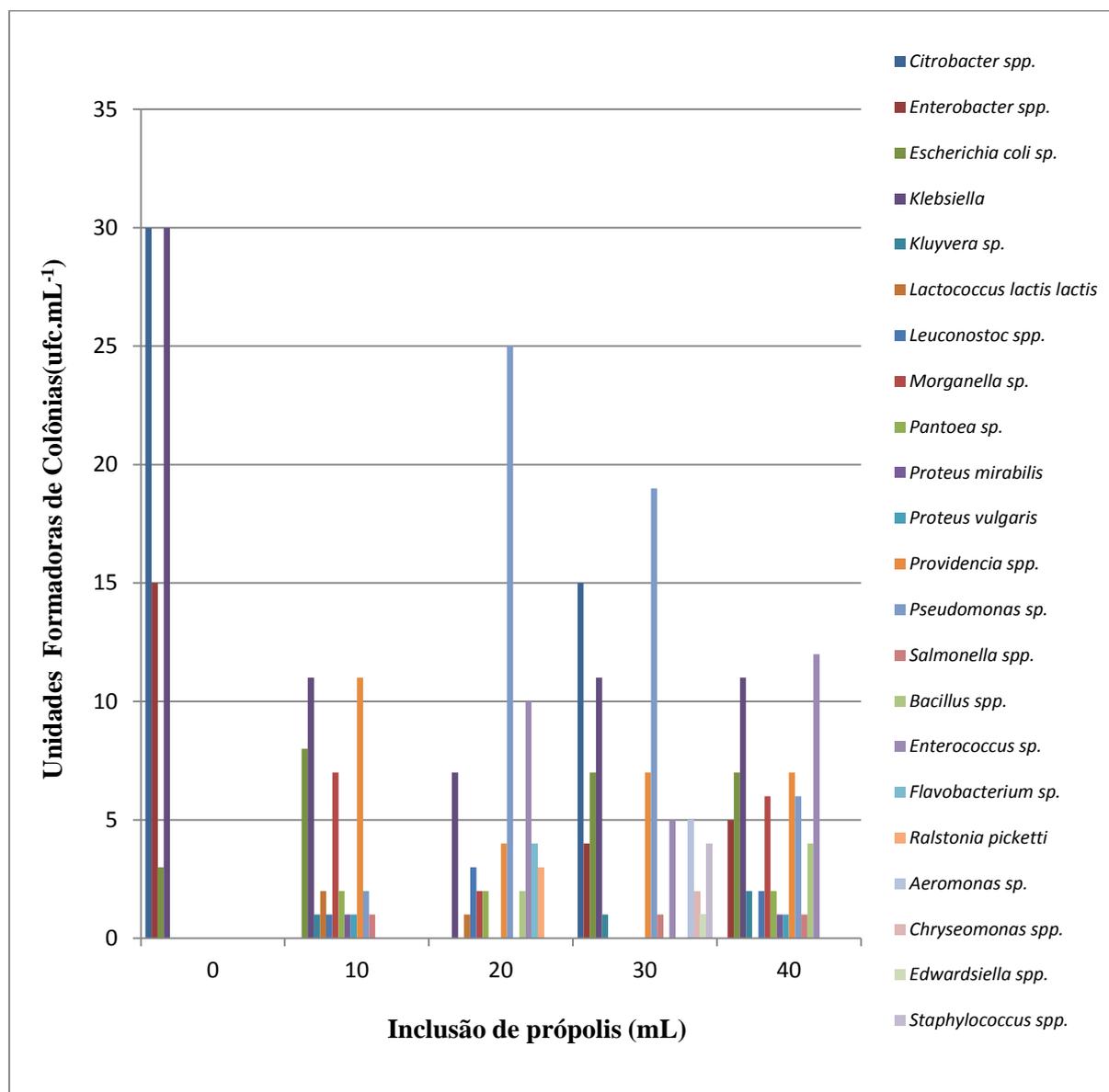
CASTRO et al. (2008) avaliaram a atividade antibacteriana de quarenta e dois extratos de plantas brasileiras contra bactérias patogênicas para peixes (*Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas hydrophila*), os valores de Concentração Mínima Inibitória (demonstraram que os extratos *Calyptranthes clusiifolia* e *Merremia tomentosa* inibiram o crescimento de *S. agalactiae*, apresentando um Concentração Mínima Inibitória de 1500 µg/mL, enquanto os extratos metanólicos de *Cariniana legalis*, *Croton floribundus* e *Myrcia velutina* inibiram o crescimento de *A. hydrophila*, com valores de Concentração

Mínima Inibitória que variaram de 187,5 - 375 µg/mL. O patógeno que se apresentou mais suscetível trinta e um extratos foi *F. columnare*, já o *S. agalactiae* foi mais sensível a cinco e *A. hydrophila* a extratos de plantas.

ANDRADE et al., (2012) avaliando atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis para *A. hydrophila* isoladas de peixes, onde produto demonstrou efeito bacteriostático contra os isolados de *A. hydrophila*. VARGAS et al., (2004) também afirma que a própolis possui atividade antimicrobiana “*in vitro*”, principalmente para bactérias Gram positivas. SANTOS (2013) obteve resultados diferentes, concluindo que a própolis não apresentou efeito imunoestimulante quando os peixes foram infectados com *A. hydrophila*.

Os resultados encontrados para ação antibacteriana pode ter relação com a composição química da própolis, pois a mesma pode ser encontrada com uma composição variada e complexa (DOS SANTOS et al., 2003) e com a diversidade da flora de cada região onde as abelhas buscam a matéria prima (PARK et al., 2002).

Figura 5 - O Gráfico representa a quantidade e a diversidade de bactérias do intestino das tilápias do Nilo.



A microbiota pode variar de acordo com o ambiente, escassez de algum nutriente, pelo uso de bactérias probióticas ou extratos vegetais (GATESOUPE, 2008). Para os tratamentos que houve a inclusão do extrato da própolis, ocorreu um aumento na diversidade das bactérias, parecendo haver um equilíbrio entre a microbiota intestinal do peixe.

De modo geral, a própolis como promotor de crescimento visa diminuir a população de microrganismos patogênicos no trato digestivo dos peixes, minimizando o número de células inflamatórias em decorrência de uma resposta imunológica menos intensa e,

consequentemente, a espessura da parede intestinal é menor, melhorando assim a utilização dos nutrientes (ZUANON et al., 1998). Portanto a inclusão de extrato da própolis como aditivo e promotor de crescimento auxilia no equilíbrio da flora intestinal das tilápias aumentando sua higidez para eventuais patógenos (DE MELO et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

A inclusão do extrato de própolis da região Oeste do Paraná em rações para pós-larvas de tilápia do Nilo proporcionou um aumento na diversidade da microbiota intestinal e melhora no fator de condição corporal, indicando uma melhora no desempenho produtivo. A própolis não teve efeito como promotor de o crescimento, porem os animais não foram submetidos a um desafio sanitário, onde os mesmos em outros estudos parecem responder melhor a inclusão de própolis na dieta. Em relação a quantidade de própolis recomenda-se a dose mínima de 10 mL/Kg de ração, devido a quantidade de própolis disponível. Outro fator importante é a formação do trato gastrointestinal com a microbiota não totalmente formada, podendo interferir não ação da própolis sobre as bactérias.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. P. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, p. 9-15, 2012.
- BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture Engineering**, Auburn, v.20, p.113-132, 1999.
- CALADO, L.L. et al. Densidades de incubação de ovos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema alternativo. **Ciência Animal**, São Paulo, v.18, p.75-80, 2008.
- CAMPAGNOLO, R et al. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v. 14, 2013.
- CASTRO, S.B.R et al. Antibacterial activity of plant extracts from brazil against fish pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 756-760, 2008
- CHO, S.H. Effects of Putative Growth or Health-Enhancing Dietary Additives on Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Performance. **Journal Of The World Aquaculture Society**, Busan, v. 42, 2011.
- DE LA ROSA, M. G. N. **Evaluaciñ preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orřano en la dieta**. 2011. 98 f. Dissertação (Doutorado). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- DE MELLO, H. et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, p. 724-730, 2013.
- DENG, J et al. Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol Biochem**, v. 37, p. 959–967, 2011.

DOS SANTOS, C.R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, v.13, p. 71-74, 2003.

DOTTA, G. **Efeito imunomodulador dos extratos de própolis e Aloe barbadensis, suplementados na dieta de tilápia do Nilo Oreochromis niloticus**. 2013. 124f. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em aquicultura. Universidade Federal Santa Catarina.

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, France, v.14, p.107-114, 2008.

GASTALHO, S. et al. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Portugal, v. 3, p. 29-45, 2014.

GOMEZ-GIL, B. et al. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, México, v. 191, p. 259-270, 2000.

GONZALES, E. et al. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal, **Revista UFG**, São Paulo, v. 1, p. 49-52, 2012.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R. P. et al. Curso de piscicultura: criação racional de tilápias. Universidade Federal de Maringá, cap. 1, p. 4, 1995.

HAYASHI, C et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.823-828, 2002.

MAINARDES-PINTO. C. S. R. M et al. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 29, p. 654-659, 2000.

MARENGONI, N. G; WILD, M. B. Sistemas de produção de pós-larvas de tilápia do Nilo. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 13, p. 265-276, 2014.

MEURER, F. et al. Fontes proteicas suplementadas com aminoácidos e minerais para a tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v.34, p.1-6, 2005.

MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*,) fingerlings. **Aquaculture Research**, Pernambuco, v. 40, p. 603-608, 2009.

MEURER, F et al. Feeding frequency on growth and male percentage during sexual reversion phase of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v. 13, n. 4, p. 1133-1142, 2012.

NRC. **Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals**. Washington, D.C.: 1993. 114p.

PARK, Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. Minas Gerais, v.31, p.1595-1604, 2002.

POPE, K. L; KRUSE. G. Assessment of fish condition data. Statistical Analyses of Freshwater Fisheries Data. **American Fisheries Society Publication**, v. 74, p. 51-56, 2001.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Probióticos na Aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, Minas Gerais, v. 6, p. 837-846, 2008.

SANTOS, E.L. **Aditivos naturais promotores de crescimento em dietas para tilápia do Nilo**. 2010. 73 f. Tese (Doutorado). Programa de doutorado Integrado em Zootecnia. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SANTOS, E. L. et al. Resíduo do processamento do extrato de própolis vermelha em ração comercial para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Comunicata Scientiae**, São Paulo, v. 4, p. 179-185, 2013.

TACHIBANA, L. et al. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, São Paulo, v. 26, p. 305-311, 2004.

UCZAY, J. et al. Propolis in diets for silver catfish (Teleostei, Pimelodidae). **Bioscience Journal**, São Paulo, v. 30, p. 1912-1918, 2014.

UFV - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 8.0. Viçosa, Minas Gerais, 2000.

VARGAS. A. C et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34, p.159-163, 2004.

VÁZQUEZ, J.A. et al. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, Spain, v.245, p.149-161, 2005.

ZUANON, J.A.S. et al. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 27, p. 999-1005, 1998.