

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ASPECTOS SANITÁRIOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA PARA TILÁPIAS DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

RICARDO MARQUES NOGUEIRA FILHO

Aracaju
Outubro – 2021

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ASPECTOS SANITÁRIOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA PARA TILÁPIAS DO
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Tese submetida à banca examinadora para à
obtenção do título de Doutor em Saúde e
Ambiente, na área de concentração de Saúde e
Ambiente.

RICARDO MARQUES NOGUEIRA FILHO

Rodrigo Yudi Fujimoto, D.Sc.
Orientador

Aracaju
Outubro – 2021

Sistema Integrado de Bibliotecas - SIB

N778a Nogueira Filho, Ricardo Marques
Aspectos sanitários da suplementação dietética com extratos de própolis verde e vermelha para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Ricardo Marques Nogueira Filho; orientação [de] Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto. - Aracaju: UNIT, 2021.

79 f. : il.

Tese (Doutor em Saúde e Ambiente na área de concentração de Ambiente, Desenvolvimento e Saúde) - Universidade Tiradentes.

Inclui bibliografia.

1. Alimento funcional. 2. Aditivo. 3. Imononutrição. I. Fujimoto, Rodrigo Yudi (orient.). II. Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 591.13:596/599

ASPECTOS SANITÁRIOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA PARA TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

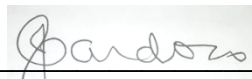
Ricardo Marques Nogueira Filho

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:



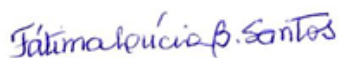
Rodrigo Yudi Fijimoto, D.Sc.
Orientador



Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Universidade Tiradentes



Maria Nogueira Marques, D.Sc.
Universidade Tiradentes



Fátima Lúcia de Brito dos Santos, D.Sc.
Universidade do Estado da Bahia



Cláucia Aparecida Honorato da Silva, D.Sc.
Universidade Federal da Grande Dourados

DEDICATÓRIA

A minha esposa Cinira Maria Cavalcante Tôrres e aos meus filhos Otávio Cavalcante Tôrres Nogueira e Beatriz Cavalcante Tôrres Nogueira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade e coragem para seguir em frente com os meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto, pela orientação. Obrigado por acreditar em mim e por todo incentivo nessa etapa importante da minha vida.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso, Profa. Dra. Maria Nogueira Marques e Profa. Dra. Fátima Lúcia de Brito dos Santos, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com essa tese.

A Universidade Tiradentes – UNIT e o ITP pela realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Embrapa Tabuleiros Costeiros pela realização do experimento e análises laboratoriais.

A Universidade do Estado da Bahia – UNEB pela liberação e apoio durante a realização do Doutorado, com a flexibilização da minha carga horária.

Ao Centro Universitário Rio São Francisco – UNIRIOS e ao Colégio Sete de Setembro pela liberação e apoio durante a realização do Doutorado, com a flexibilização da minha carga horária.

Aos meus colegas do LAQUA – Embrapa: Ricardo Coelho, Peterson Emmanuel Guimarães Paixão, Higo Andrade Abe, Joel Artur Rodrigues Dias, Juliana Oliveira Meneses, Fernanda Santos Cunha, Thaís Brito Reis Santos, Cindy Caroline Moura, Hugo Leandro dos Santos, Shirley Avila Meneses, Fabrício Sa de Santana.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a saúde de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com extratos de própolis verde e vermelha. Extratos hidroetanólicos das própolis verde e vermelha foram produzidos, respeitando a proporção metodológica preestabelecida de (1/12,5 m:v). Os extratos obtidos foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram realizados testes *in vitro* com o fungo *Saprolegnia parasítica*, as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, e o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*. Para os ensaios *in vitro*, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com as própolis verde e vermelha, com onze concentrações cada (50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097; e 0,048 mg.mL⁻¹) em triplicata. No experimento *in vivo*, foi utilizado um DIC em esquema fatorial (3x3) correspondendo à 3 concentrações do extrato de própolis verde e vermelha, sendo as concentrações correspondentes à 0,0, 1,5 e 3,0 g/kg de cada própolis. Foram utilizados para o teste *in vivo* alevinos de Tilápia, com peso médio de 1,11 ± 0,27 g e comprimento de 4,16 ± 0,43 cm e densidade de 50 peixes por unidade experimental, por 120 dias. Durante o experimento foi avaliado o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos e histológicos. Ao final do experimento foi realizado um teste de desafio com a bactéria patogênica *S. agalactiae*. Os dados obtidos foram submetidos às premissas de normalidade, homoscedasticidade e análise de variância (ANOVA). O rendimento do extrato hidroalcolólico da própolis verde (54,29%) foi superior ao da própolis vermelha (22,44%). A análise química dos extratos mostrou perfis químicos distintos entre as própolis verde e vermelha. Houve atividade antimicrobiana dos extratos de própolis nos patógenos de peixes analisados, sendo que a própolis verde foi mais eficiente contra o fungo e o *S. agalactiae*, enquanto a vermelha apresentou maior eficiência contra a *Aeromonas* e o protozoário. Quanto à suplementação na dieta, a adição das duas própolis não afetou o desempenho nos primeiros 30 dias e houve aumento da uniformidade do peso dos peixes. Com 60 dias a própolis verde não afetou o desempenho, somente a vermelha que provocou uma redução de ganho de peso. Porém, aos 90 dias, houve uma inversão, onde a adição de própolis verde diminuiu o ganho de peso, enquanto a vermelha manteve os parâmetros do controle. E ao final dos 120 dias apenas a adição de própolis verde reduziu o ganho de peso. Porém, com exceção do ganho de peso, nenhum outro parâmetro apresentou diferença significativa após 60 dias de alimentação. A adição de qualquer uma das própolis reduz a glicose, triglicerídeos e trombócitos, e aumentam o número de leucócitos e linfócitos. Em relação à histologia, apenas os tratamentos 1,5 e 3,0 g/kg de própolis vermelha isolada, respectivamente, apresentaram áreas de congestão no fígado. Já após o desafio com *S. agalactiae*, o tratamento com 1,5g de própolis vermelha apresentou a menor taxa de mortalidade. No desafio com a bactéria patogênica, os peixes alimentados com própolis tiveram aumento do número de leucócitos totais, neutrófilos, e redução de linfócitos. Os maiores valores de leucócitos totais foram observados nos tratamentos com 3,0 + 3,0 g/kg e 1,5 + 1,5 g/kg (própolis verde:própolis vermelha). E o maior valor de neutrófilos ocorreu com 3 g/kg de própolis verde isolada e com a mistura das duas nas concentrações de 3,0+3,0 g/kg. Peixes alimentados apenas com própolis verde mantiveram os trombócitos, monócitos e basófilos sem diferença significativa (p<0,05). Já o tratamento com 3g de própolis vermelha isolada (T2), apresentou redução no número de trombócitos. Foi observado uma maior atividade antioxidante no músculo dos peixes nos tratamentos com 3,0 + 1,5 g e 3,0 + 3,0 g, respectivamente. Os resultados mostraram que o uso de própolis vermelha isoladamente na concentração de 1,5 g/kg promoveu estímulo imunológico e maior resistência à infecção bacteriana sem afetar o desempenho zootécnico.

Palavras Chaves: Alimento funcional, Aditivo, Imunonutrição.

ABSTRACT

Sanitary aspects of dietary supplementation with green and red propolis to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

This study evaluated the growth and health of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* fed with extract of red and green propolis. It hydroethanolic extract was carried out according pre-determined methodology (1/1.25 m:v). Afterward, they were submitted to the *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) analysis. Therefore, in vitro tests with fungus *Saprolegnia parasitica*, parasite *Ichthyophthirius multifiliis* and bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* were carried out. An experiment occurred in completely randomized design with 11 concentrations of red and green propolis (50.0; 25.0; 12.5; 6.25; 3.125; 1.562; 0.781; 0.390; 0.195; 0.097; e 0.048 mg.mL⁻¹) in triplicate. For in vivo experiment, was also carried out in completely randomized design arranged in factorial (3x3) with 3 concentrations of red and green propolis (0, 1.5 and 3g/k of each propolis). Tilapia fingerlings, with live weight 1.11±0.27 g and length 4.16±0.43 cm having stocking density 50 fish per experimental unit during 120 days for the in vivo test. During the experiment, growth performance, hematological and histological parameters were evaluated. At the end of the experiment, a challenge test was performed with the pathogenic bacterium *S. agalactiae*. The data obtained were submitted to the assumptions of normality, homoscedasticity and then analysis of variance (ANOVA). Yield of the hydroalcoholic extract of green propolis (54.29%) was higher than that of red propolis (22.44%). Chemical analysis of extracts showed different chemical profiles between green and red propolis. There was antimicrobial activity of propolis extracts in the fish pathogens analyzed, and the green propolis was more efficient against the fungus and *S. agalactiae*, while the red one showed greater efficiency against *Aeromonas* and protozoan. For in vivo, adding two propolis did not affect performance in the first 30 days and there was an increase in fish weight uniformity. At 60 days, green propolis did not affect performance, only red propolis caused a reduction in weight gain. However, at 90 days, there was an inversion, where the addition of green propolis decreased weight gain, while red propolis maintained the control parameters. Within 120 days, only the addition of green propolis reduced weight gain. However, with the exception of weight gain, no other parameter showed a significant difference after 60 days of feeding. The addition of any propolis reduces glucose, triglycerides and thrombocytes, and increases the number of leukocytes and lymphocytes. Regarding histology, only the treatments 1.5 and 3.0 g/kg of isolated red propolis, respectively, showed areas of congestion in the liver. After the challenge with *S. agalactiae*, treatment with 1.5 g of red propolis had the lowest mortality rate. In the challenge with the pathogenic bacterium, the fish fed with propolis had an increase in the number of total leukocytes, neutrophils, and a reduction in lymphocytes. The highest values of total leukocytes were observed in treatments with 3.0 + 3.0 g/kg and 1.5 + 1.5 g/kg (green propolis:red propolis). The highest value of neutrophils occurred with 3g/kg of isolated green propolis and with the mixture of the two at concentrations of 3.0+3.0 g/kg. Fish fed only green propolis maintained thrombocytes, monocytes and basophils with no significant difference (p<0.05). The treatment with 3 g of isolated red propolis (T2) showed a reduction in the number of thrombocytes. Higher antioxidant activity was observed in fish muscle in treatments with 3.0 + 1.5 g and 3.0 + 3.0 g, respectively. The results showed that the use of red propolis alone at a concentration of 1.5 g/kg promoted immune stimulation and greater resistance to bacterial infection without affecting the growth performance.

Keywords: functional food, additive, immune nutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente linear utilizado durante a análise cromatográfica.....	32
Tabela 2. Delineamento casualizado dos tratamentos aplicados.....	36
Tabela 3. Concentração ($\mu\text{g/g}$) de formononetina, biochanina A e apigenina presentes na ração.....	45
Tabela 4. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetido a suplementação dietética com própolis após 30 dias.....	46
Tabela 5. Interação estatística entre própolis verde e vermelha para fator de condição de Fulton e uniformidade dos peixes alimentados após 30 dias.....	47
Tabela 6. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetido a suplementação dietética com própolis após 60 dias.....	48
Tabela 7. Interação estatística entre as própolis verde e vermelha para tilápias <i>Oreochromis niloticus</i> alimentadas por 60 dias.....	49
Tabela 8. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetido a suplementação dietética com própolis após 90 dias.....	50
Tabela 9. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetido a suplementação dietética com própolis após 120 dias.....	51
Tabela 10. Valores de glicose e triglicerídeo (g/dL) em tilápias submetidos a suplementação dietética com própolis.....	52
Tabela 11. Parâmetros bioquímicos sanguíneos da tilápia submetida a dieta contendo própolis por 120 dias.....	52
Tabela 12. Parâmetros eritrocitários sanguíneos da tilápia submetida a dieta contendo própolis por 120 dias.....	53
Tabela 13. Valores de trombócitos e leucócitos totais de tilápias do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i> alimentadas com diferentes níveis de própolis verde e vermelha durante 120 dias.....	54

Tabela 14. Patologias observadas no tecido hepático dos peixes suplementados com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha de acordo com metodologias adaptadas de Fishbien et al. (2015) e Zhang et al. (2018)55

Tabela 15. Valores de leucócitos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* desafiados por *Streptococcus agalactiae*.....56

Tabela 16. Valores de leucócitos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* desafiados por *Streptococcus agalactiae*.....57

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Própolis verde. Fonte: Nogueira Filho, 2020.....	26
Figura 02. Estrutura molecular dos principais componentes da própolis verde: pinocembrina (A) e artellina C. Fonte: FERREIRA; NEGRI, 2018.....	26
Figura 03. Própolis vermelha. Fonte: Nogueira Filho (2020)	27
Figura 04. Estrutura molecular da formononetina Fonte: SILVA et al. (2020)	28
Figura 05. Estrutura molecular da biochanina A. Fonte: OZA et al. (2018)	29
Figura 06. Estrutura molecular da apigenina. Fonte: KHAN et al. (2019)	30
Figura 07. Placa de Petri contendo o meio de cultura e o fungo <i>Saprolegnia parasítica</i> . Fonte: Nogueira Filho, 2020.....	33
Figura 08. Cromatograma dos padrões Apigenina, Formononetina e Biochanina A (A); cromatograma do extrato de própolis verde (B); cromatograma do extrato de própolis vermelha (C).....	41
Figura 09. Crescimento micelial do fungo <i>Saprolegnia parasítica</i> frente aos extratos de própolis verde e vermelha em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹) durante 96 horas. Diferentes letras entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal Wallis.....	42
Figura 10. Crescimento bacteriano (mm) em placas petri contendo TSA com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha frente a bactéria patogênica <i>Aeromonas hydrophila</i> após incubação de 24 horas em estufa microbiológica (30°C). O álcool estava em concentração de 80% e o controle havia apenas meio de cultura. Diferentes letras entre as colunas de mesma cor (verde ou vermelha) indicam diferença estatística pelo teste Kruskal wallis post hoc Dun (p<0.05)	43
Figura 11. Crescimento bacteriano (mm) em placas petri contendo TSA com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha frente a bactéria patogênica <i>Streptococcus agalactiae</i> após incubação de 24 horas em estufa microbiológica (30°C). O álcool estava na concentração de 80% e o controle havia apenas meio de cultura. Diferentes letras entre as colunas de mesma cor (verde ou vermelha) indicam diferença estatística pelo teste Kruskal wallis post hoc Dun (p<0.05)	43

Figura 12. Mortalidade (%) do protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* em diferentes concentrações de própolis verde e vermelha, álcool em concentração de 80%.....44

Figura 13. Fotomicrografia hepática de juvenis de tilápias *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética contendo própolis verde e vermelha. Foto A – Fígado com sinal clínico leve de congestão (T1- 1,5 g/Kg de própolis vermelha); Foto B – Fígado com sinal clínico grave de congestão (3,0 g/Kg de própolis vermelha)54

Figura 14. Mortalidade acumulada de tilápias submetidas a desafio agudo ao final de 96 horas com a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*. Legenda: T1 (0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T2 (0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T3 (1,5 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T4 (1,5 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T5 (1,5 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T6 (3,0 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T7 (3,0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T8 (3,0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha)55

Figura 15. Capacidade antioxidante total do músculo da tilápia durante o desafio agudo (96 horas) com a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*.....57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 AQUICULTURA	16
3.2 PISCICULTURA.....	17
3.3 DOENÇAS EM PEIXES	19
3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS	21
3.5 PRODUTOS NATURAIS	22
3.6 PRÓPOLIS	23
3.6.1 PRÓPOLIS VERDE	25
3.6.2 PRÓPOLIS VERMELHA.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 ENSAIO IN VITRO	32
4.1.1 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de própolis.....	33
4.1.2 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> dos extratos de própolis.....	34
4.1.3 Atividade antiparasitária <i>in vitro</i> dos extratos de própolis.....	34
4.2 ENSAIOS IN VIVO	35
4.2.1 Aspectos éticos	35
4.2.2 Animais	35
4.2.3 Preparação do extrato de própolis e ração para os peixes	35
4.2.4 Hematologia	37
4.2.5 Histopatologia.....	37
4.2.6 Teste de desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	38
4.2.7 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS.....	40
7 CONCLUSÃO	65
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
9 REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura aumentou nas últimas três décadas, impactando positivamente na geração de empregos, contribuindo para a produção de proteína animal de alta qualidade para a alimentação humana (MARQUES et al., 2020).

Dentre as espécies cultivadas, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca devido a sua facilidade de aquisição, é adequada para cultivos intensivos em reservatórios, tornando o Brasil o quarto maior produtor do mundo, com produção de 486 mil toneladas por ano, e crescimento anual de produção de 12,5%, sendo que a tilápia já corresponde a 60% da produção nacional de pescado (PEIXEBR, 2021).

Porém, com a intensificação dos cultivos criam-se, na maioria das vezes, ambientes inóspitos com condições estressantes para o animal, facilitando a entrada de agentes patogênicos e a rápida transmissão de infecções. Esses ambientes podem então comprometer a saúde, predispondo a doenças e morte dos animais. Na criação de tilápias, surtos de doenças estão sendo cada vez mais frequentes, com altas taxas de mortalidades, ocasionadas por vírus, parasitas e bactérias. E dentre as bacterioses, a estreptococose (*Streptococcus agalactiae*) se destaca por provocar altos índices de mortalidade e prejuízos econômicos (VERNER-JEFFREYS et. al., 2018).

Os quimioterápicos tem sido cada vez mais utilizados como forma de diminuir esses surtos patogênicos nos cultivos intensivos e superintensivos. Esses produtos usados de forma inadequada acabam impactando negativamente o ambiente e a saúde animal e humana devido a sua ecotoxicidade (VALLADÃO et al., 2015).

É comum nos ambientes de cultivo a utilização indiscriminada de antimicrobianos. No entanto, a utilização dessas substâncias tem sido criticada pela crescente resistência da sociedade à presença de resíduos de antibióticos na carne e ao aparecimento de cepas bacterianas cada vez mais resistentes a antibióticos (VERNER-JEFFREYS et. al., 2018). Assim, estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver estratégias para reduzir a utilização desses produtos nos sistemas de produção de peixes.

A forma mais promissora para controlar doenças nos sistemas de cultivo é por meio do fortalecimento do sistema imune dos peixes com a administração profilática de imunoestimulantes naturais (OSMUNDSEN et al., 2020) os quais podem ser administrados via ração. Assim, a busca por alimentos que garantam a nutrição e a saúde para os peixes, é indispensável para garantir o crescimento e desenvolvimento da espécie em cativeiro.

No entanto, a maioria das pesquisas em nutrição avalia somente as exigências nutricionais com base no desempenho produtivo, sem considerar a capacidade de resistência dos animais, quando expostos à patógenos ou agentes estressores (ROY et al., 2021). Estudos científicos demonstraram que os nutrientes presentes na dieta, bem como aditivos podem estimular o sistema imunológico dos peixes, e que as rações devem ser formuladas não somente com critérios sobre a exigência nutricional, mas também considerando a capacidade de promover a saúde (VALLADÃO et al., 2016).

Nesse sentido, os alimentos funcionais podem proporcionar benefícios na promoção da saúde e prevenção de doenças, independentes da função de nutriente essencial. Esses alimentos, são aditivos dietéticos com capacidade reconhecida de modular o sistema imunológico, amenizar o estresse e proteger os animais contra infecção por patógenos (RIBEIRO et al., 2019). Segundo Shahidi; Ambigaipalan (2015), várias substâncias podem ser utilizadas como imunoestimulantes, entre elas substâncias sintéticas (levamisol), compostos derivados de bactérias (lipopolissacarídeos) e componentes da própria dieta (minerais e vitaminas), além de substâncias naturais e fitoterápicas.

Recomenda-se que essas substâncias sejam suplementadas nas dietas em momentos críticos para os peixes, como classificação, transferência, biometria, transporte e na fase inicial de crescimento. Fatores como tipo de tratamento, concentração administrada e o tempo de administração da substância devem ser considerados para garantir a eficácia do imunoestimulante. (ALVES, 2017).

Nesse sentido, o uso de produtos naturais, como a própolis, merece ser estudada tanto na prevenção de enfermidades como sua seguridade de uso para o homem e o ambiente. Diversos componentes químicos foram identificados em amostras de própolis como: quercetina, ácido ferúlico e naringenina (POPOVA et al., 2017). Trabalhos publicados demonstraram a potencialidade biológica da variedade de própolis encontrada no Nordeste brasileiro, pois tem predominância de isoflavonas e outros compostos inexistentes em outras variedades, tais como a daidzeína, formononetina e biochanina A (DE PONTES et al., 2018).

A própolis tem sido utilizada como suplemento em várias produções de animais. Na lactação de carneiro, a própolis aumenta o ganho de peso (BONOMI et al., 2002); em cabras estimula o crescimento microbiano do rúmen e aumenta a digestibilidade dos carboidratos solúveis (JUNIOR et al., 2004); em frangos de corte impede distúrbios digestivos, melhora a conversão alimentar e estimula o sistema imunológico (SHALMANY & SHIVAZAD, 2006); em poedeiras, a própolis melhora a produção e imunidade (GALAL et al., 2008); em coelhos melhora

as condições de saúde, e reduz a mortalidade por insuficiência hepática e renal (NASSAR et al., 2013).

Assim como em outros animais, os extratos de própolis têm sido utilizados como suplementação em algumas espécies de peixes. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e antioxidante dos compostos da própolis melhora a saúde intestinal, melhorando a absorção e desempenho no crescimento (DENLI et al., 2005; DENG et al., 2011; BAE et al. 2012). Porém, apesar das evidências dos benefícios do uso da própolis na aquicultura, nenhum estudo com a própolis vermelha foi realizado com peixes até o momento. Portanto, considerando que a própolis vermelha e verde pode configurar uma importante alternativa terapêutica e uma fonte potencial de proteção a enfermidades para peixes, essas variedades foram escolhidas para os ensaios realizados nesse trabalho.

2 OBJETIVOS

Avaliar o crescimento e a saúde de tilápia do nilo alimentadas com extratos de própolis verde e vermelha.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente os extratos de própolis produzidos e as rações experimentais;
- Avaliar a eficácia in vitro dos extratos hidroetanólicos da própolis verde e vermelha em patógenos de peixes;
- Determinar as concentrações ideais das própolis verde e vermelha na suplementação de dietas para Tilápias na promoção de crescimento e saúde;
- Avaliar a resistência dos animais suplementados com as própolis estudadas frente a um agente patogênico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AQUICULTURA

A aquicultura é definida como a produção em cativeiro de organismos com habitat predominantemente aquático, em qualquer um de seus estágios de desenvolvimento (MARQUES et al., 2020), estando inclusos nesse contexto o cultivo de plantas aquáticas (algicultura), crustáceos (carcinicultura), moluscos (malacocultura), rãs (ranicultura) e peixes (piscicultura) (ODDSSON, 2020).

Diferentemente da pesca extrativa, que tem apresentado uma taxa de crescimento reduzido na última década, a aquicultura tem se tornado uma atividade em ascensão devido, principalmente, a segurança alimentar, mudanças nos padrões de alimentação da população que buscam uma dieta mais saudável, razões religiosas e socioeconômicas (MARQUES et al., 2020).

A aquicultura apresenta um papel relevante como produtora de alimentos, mas sua importância vai muito além, pois a atividade colabora para diminuição da pobreza, diminuição da pressão em estoques pesqueiros, mitigação em áreas de mineração, produção de biocompostos, entre outras aplicações (MELLO, et al., 2017).

A aquicultura brasileira está baseada no monocultivo, uma prática focada na produção em massa de uma única espécie dentro da propriedade, o que garantiu ao Brasil o quarto lugar na produção mundial de tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) e o 13º maior produtor mundial na aquicultura (FAO, 2020). O sucesso da tilápia decorre da boa adaptação às condições climáticas e aos diferentes sistemas de cultivo, facilidade de manejo, além da aceitação dos consumidores e produtores como uma alternativa de proteína animal (FILHO et al., 2020). Porém, monocultivos são potenciais fontes de disseminação de doenças em criações, promovem grande lançamento de efluentes e maior uso de medicamentos, aumentando os riscos de contaminação ambiental (XU et al., 2020).

O Brasil tem plenas condições de se tornar um grande produtor de pescado e, portanto, de alavancar o mercado doméstico, pois possui vasta extensão de Zona Econômica Exclusiva (ZEE) e de costa marítima com 8.500 km de extensão; 12% da água doce disponível do planeta; grande volume d'água represado em reservatórios e de água subterrânea; condições climáticas favoráveis; disponibilidade de mão de obra; características de ambiente propícias à produção intensiva em mar aberto ou na região costeira (maricultura); localização estratégica para escoamento da produção para o Cone Sul, Europa e EUA, e; grande mercado doméstico de

diferentes classes econômicas. Entretanto, os desafios tanto para a ampliação da produção da aquicultura quanto do volume de capturas ainda são muito grandes (VIDAL; XIMENES, 2019).

Com a intensificação e expansão dos sistemas de produção no Brasil, problemas relacionados à ocorrência de doenças têm aumentado, culminando na perda parcial ou total da produção. Assim, a atividade ainda depende de uma quantidade elevada de compostos químicos, principalmente para controlar organismos infecciosos. Esses compostos ajudam a aumentar a produtividade e a melhorar a sobrevivência de larvas de peixes, melhoram a eficiência alimentar, reduzem o estresse durante o transporte, auxiliam no controle de patógenos (ROY et al., 2021), porém, se utilizados de maneira inadequada apresentam problemas quanto a contaminação ambiental, resíduos na carne e possibilidade de seleção de patógenos resistentes. Esses produtos químicos são geralmente usados para tratar esses problemas, porém o uso de produtos naturais como uma alternativa ao tratamento quimioterápico vem ganhando cada vez mais força (VALLADÃO et al., 2016).

Assim produtos alternativos de menor impacto ambiental e maior seguridade de uso são desafios atuais para garantir a sustentabilidade de aquicultura. Produtos naturais para aplicação na aquicultura podem ajudar a minimizar os riscos e os efeitos adversos provocados pelos compostos sintéticos (OSMUNDSEN et al., 2020).

3.2 PISCICULTURA

Dentro da aquicultura, a piscicultura é a produção de peixes em cativeiro, vista como alternativa para redução da pobreza e conservação de espécies ameaçadas de extinção pela supressão pesqueira, assim como, garantia na oferta de suprimento de proteína de boa qualidade (ODDSSON, 2020). A piscicultura brasileira vem se desenvolvendo de maneira robusta nos últimos anos, com significativos avanços em termos de aumento da produção e profissionalização do setor. Esse crescimento está diretamente ligado à demanda do mercado doméstico, haja vista que das 579 mil toneladas produzidas pela piscicultura brasileira em 2019 apenas 6.542 toneladas, ou seja, 1,13% do total foram destinadas à exportação (IBGE, 2019).

A criação de peixes é realizada em todas as regiões brasileiras, em diferentes sistemas de criação (açudes, viveiros escavados e tanques-rede), e contempla uma elevada diversidade de espécies, bem como, diferentes graus de intensidade de produção. Destaca-se que essa atividade é relativamente complexa e nova no espaço rural. Por esse motivo, é imprescindível que os produtores possuam os conhecimentos técnicos básicos que são essenciais para obtenção de bons resultados neste ramo (SENAR, 2017). O mercado brasileiro de peixes é

complexo e diverso, haja vista seu enorme tamanho e a grande diversidade socioeconômica verificada entre as várias regiões do país (MARQUES et al., 2020). Soma-se a isso a grande diversidade de espécies cultivadas, sendo que mais de 25 destas são comercialmente produzidas na piscicultura do Brasil (HARVEY et al., 2017).

A criação de tilápias (tilapicultura) é relevante no cenário nacional visto que a maioria do cultivo continental de peixes é de tilápias. Os principais polos estão concentrados na produção em viveiros no Oeste do Paraná e na produção em tanques-rede nos reservatórios do Nordeste e Sudeste. Cabe destacar que no Nordeste, a produção de tilápia acontece ao longo do eixo do Rio São Francisco e no curso do Rio Jaguaribe (KUBITZA, 2015).

O cultivo de tilápia conseguiu se superar ao longo dos anos através do aumento na produção, oferecendo melhorias constantes na qualidade de seus produtos, conquistando o mercado nacional e mudando o cenário da piscicultura brasileira. Além de estabelecer uma cadeia produtiva competitiva agregando inclusive a participação de grandes empresas que ajudam a profissionalizar o setor (BARROSO et al., 2018).

De acordo com o Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira 2015 - 2020, a produção aquícola foi responsável por 392.492 toneladas de peixes em águas continentais, e o Nordeste foi a região mais significativa no país, com produção de 140.748 toneladas de pescado, com a tilápia (*Oreochromus niloticus*) se apresentando como a espécie de maior produção. A produção nacional de tilápia no ano de 2020 foi de 486 mil toneladas, representando 60% de toda produção piscícola do país (PEIXEBR, 2021). Apesar de não ser nativa, está presente em todos os estados, exceto Amazonas, Rondônia e Roraima, e sua produção vem se consolidando nos últimos anos (FILHO et al., 2020).

De acordo com Barroso et al. (2018), no período de 2005 a 2015, a produção de tilápia foi intensificada através do sistema de tanque-rede em águas públicas apresentando um crescimento 368%. O cultivo em tanques-rede consiste na utilização destes corpos d'água para instalação de estruturas que compõe o tanque, onde os peixes são confinados em altas densidades e alimentados com rações balanceadas (SCHULTER; FILHO, 2017).

O fornecimento de rações de qualidade no cultivo de peixes colabora para o desenvolvimento do animal, uma vez que influencia no ganho de peso, na conversão alimentar, no desempenho reprodutivo, na resistência ao manejo e à organismos patogênicos, além da qualidade e sobrevivência das pós-larvas e alevinos (DEVIC et al., 2018). Embora a tilápia seja relativamente resistente a enfermidades comparadas a outras espécies de peixes, muitos organismos patogênicos podem infectá-las. A presença de patógenos em peixes pode

desencadear problemas de saúde pública gerando impactos aos seres humanos e ocasionando grandes perdas econômicas para as pisciculturas intensivas (VERNER-JEFFREYS et. al., 2018).

3.3 DOENÇAS EM PEIXES

Nos sistemas produtivos piscícolas, com a intensificação de produção, o desequilíbrio entre o patógeno-hospedeiro e ambiente são frequentes, sendo então reportados vários tipos agentes patogênicos (fungos, parasitas, bactérias e vírus) infectando a produção de peixes, ocasionando inúmeros prejuízos econômicos (MILLER; HARBOTTLE, 2018). Em geral, para que sejam controladas ou eliminadas tais doenças da criação, são investidos grandes esforços financeiros, com o alto custo em produtos químicos, manejo e mão-de-obra especializada. Em função da elevada ocorrência de doenças, o uso de produtos quimioterápicos e antibióticos tem aumentado em sistemas intensivos de produção (DAWOOD et al., 2018).

O tratamento de doenças em animais de criação é necessário, pelo menos uma vez durante o ciclo produtivo, independente da espécie e do tipo de criação. A pressão dos patógenos sobre o hospedeiro é elevada em sistemas de produção intensiva, e às vezes é essencial o uso de drogas terapêuticas (VALLADÃO et al., 2015).

Os peixes cultivados são frequentemente expostos a parasitas, os quais podem infestar a superfície corporal ou órgãos internos destes animais. De acordo com a localização nos hospedeiros, os parasitas podem ser classificados em endoparasitas, que vivem no interior dos organismos; ectoparasitas, que se fixam na superfície dos hospedeiros e ainda os hemoparasitas, que vivem na corrente sanguínea (TAVARES-DIAS, 2018).

As parasitoses mais comuns são causadas pelos protozoários tricodinídeos, mixosporídeos, *Piscinoodinium pillulare*, *Ichthyophthirius multifiliis* e helmintos pertencentes à classe monogenea que se destacam como as doenças mais impactantes na piscicultura brasileira e mundial. No que diz respeito aos protozoários podemos destacar o *Ichthyophthirius multifiliis* que causa uma enfermidade conhecida mundialmente por “Ictio”, “White Spot” ou doença dos pontos brancos, responsável por perdas econômicas significativas na produção de peixes em todo o mundo (WANG et al., 2019).

Dentre as infecções fúngicas destaca-se o oomiceto (“fungo”) *Saprolegnia parasítica*, que pode infectar tanto os peixes (pele, brânquias) como os seus ovos. Em casos mais graves, este patógeno pode atingir a musculatura, e em hospedeiros de tamanho diminuto, a musculatura e órgãos internos vitais (PAVANELLI et al., 2008). Em altas infecções ocorrem falhas osmorregulatórias ocasionadas por destruição do tegumento, além de lesões causadas nas

brânquias que podem provocar a morte dos animais. Alguns autores afirmam que esta doença ocasiona perdas massivas levando muitos piscicultores a sérios prejuízos econômicos (TEDESCO et al., 2019).

As doenças bacterianas também são motivo de grande preocupação, tanto no Brasil como em todo o mundo, em função de provocarem a mortalidade e o comprometimento de estruturas dos peixes que inviabilizam a sua comercialização, resultando em grandes prejuízos econômicos. Entre as principais doenças causadas por bactérias em peixe, destacam-se os gêneros: *Streptococcus* e *Aeromonas* (LIN et al., 2019).

A estreptococose é uma doença que acomete diversos peixes de água doce e marinha por bactérias do gênero *Streptococcus*, especialmente das espécies *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S. ictaluri*. Acomete especialmente a tilápia (*Oreochromis spp.*) sendo considerada aqui no Brasil uma zoonose, sendo muito comum também em inúmeros países e de grande impacto econômico nas criações comerciais de Tilápia (WANG et al., 2020). Segundo Leira et al. (2016), uma vez que essa doença aconteça em uma fazenda ou em um local produtor de tilápia é muito difícil sua eliminação; pois, permanece sempre um foco de infecção desta bactéria.

As principais manifestações clínicas desencadeadas por esta doença são anorexia, letargia, petéquias hemorrágicas e hiperemia da região anal. As tilápias costumam apresentar também movimentos erráticos e natação desorientada, especialmente quando o peixe está morrendo (CNA BRASIL, 2017).

O impacto dessas enfermidades sobre o custo de produção da tilápia em tanques-rede, nas regiões Sudeste e Nordeste, variam entre R\$ 0,49 e 1,21/kg de peixe produzido vivo e, no Nordeste, entre R\$ 0,54 e 1,36/kg de peixe produzido vivo, dependendo da severidade e recorrência das enfermidades (KUBITZA, 2013). Estimativas mais atuais sugerem perdas econômicas de 10 bilhões de dólares/ano decorrente de surtos de doenças (TAVARES-DIAS, 2018).

As infecções por *Aeromonas* são comuns em diversas espécies de animais e inclusive nos seres humanos, mas em particular, tem maior importância para piscicultura, devido ao acometimento de uma variedade enorme de peixes em criação intensiva. (LEIRA, 2016). Dentre as espécies do gênero *Aeromonas* a mais frequente em tilápia e a *Aeromonas hydrophila*, este patógeno provoca a doença conhecida como septicemia hemorrágica, por isso é conhecida como peste vermelha, mas o termo mais apropriado empregado deve ser septicemia causada por *Aeromonas spp.* (NICHOLSON et al., 2020).

Atualmente, surtos ocasionados por doenças infecciosas originadas por patógenos oportunistas são responsáveis por quase 50% nas perdas de produção, causando um dos principais riscos à sustentabilidade e lucratividade da produção aquícola (ASSEFA; ABUNNA, 2018).

Esses parasitas e bactérias são comumente tratados com quimioterápicos e antimicrobianos, e seu uso inadequado é criticado devido ao impacto negativo no ambiente e nos peixes, estimulando assim, os pesquisadores a encontrar novas soluções para esses problemas sanitários. Devido ao grande número de mortalidades causadas por estes patógenos na aquicultura, é necessário o controle dessas doenças com o objetivo de diminuir a pressão sobre os hospedeiros, sendo assim, promissor o desenvolvimento de um número maior de produtos terapêuticos que causem menores impactos ao ambiente e ao homem (VALADÃO et al., 2015).

3.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O “International Live Sciences Institute”, define alimentos funcionais como “alimentos que, em virtude da presença de componentes fisiologicamente ativos, proporcionam um benefício à saúde além da nutrição básica (RIBEIRO et al., 2019). O desenvolvimento da aquicultura intensificou os sistemas produtivos, e isso resultou em uma maior exposição dos organismos aquáticos, inclusive os peixes, a fatores estressantes, a exemplo de alterações da qualidade da água, práticas de manejo intensivas, transporte e elevadas densidades. Estas situações estressantes, quando sem controle propiciam a infecção por patógenos, promovendo perdas concernentes a perdas de desempenho e alta taxa de mortalidade (AHMED et al., 2020).

Por conta desses problemas, observa-se que a nutrição e a alimentação dos animais, evidentemente, são protagonistas desse processo. Pois a nutrição animal tem desenvolvido estratégias, alimentos e formulações que auxiliam na melhoria do desenvolvimento do sistema imunológico dos animais, potencializando crescimento, redução de mortalidade, maior produção por área, diminuição da utilização de fármacos, e desperdício de recursos naturais (ALVES, 2017).

Dentre as estratégias nutricionais está o uso de nutracêuticos. O termo “Nutracêutico” refere-se aos alimentos ou ingredientes de ração que promovem melhorias para a saúde, abrangendo o tratamento de enfermidades e a sua prevenção. Atualmente passou a ser utilizado o termo “*Alimento Funcional*” para estes mesmos ingredientes ou alimentos. No território brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), definiu alimento funcional como:

todo aquele que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica". Portanto, por definição, os *alimentos* funcionais devem ser seguros (BRASIL, 1999, p. 1).

Na alimentação animal, o uso de alimento funcional ganhou destaque pois as rações além de promoverem crescimento também permitiram a promoção da saúde e prevenção de doença. Além disso, essas rações visam mais que somente o crescimento, considera-se também a melhoria da qualidade do produto, como por exemplo carne com alto teor de ômega-3, a cor do filé, e aumento da vida de prateleira. No processo de reprodução, as rações funcionais também interveem na melhora da quantidade e qualidade de óvulos e espermatozoides e no tamanho das larvas (ALVES, 2017).

É válido destacar que o emprego de alimentos funcionais também estão associados à saúde intestinal dos organismos aquáticos, uma vez que as estruturas intestinais e sua microbiota sofrem influência do alimento que é ingerido, favorecendo a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, melhorar o crescimento (AFONSO, 2018).

Nessa premissa, a oferta de um alimento que aumente o aproveitamento de nutrientes e melhore o sistema imunológico do organismo, prevenindo doenças tornou-se imprescindível. Assim, tanto a indústria alimentícia como os consumidores e a comunidade científica, tem buscado mais informações sobre as substâncias funcionais presentes nos alimentos, que podem auxiliar na promoção da saúde, visto que os alimentos funcionais fornecem a nutrição básica para promoção da saúde, não sendo utilizado para a cura de doenças, mas sim a prevenção (RIBEIRO et al., 2019).

3.5 PRODUTOS NATURAIS

Produtos naturais podem ser definidos como compostos orgânicos advindos da natureza, seja de plantas (fitoterápicos) e/ou animais (opoterápicos) (AZEVEDO et al., 2020; CHONG et al., 2020). Esses produtos apresentam diversas atividades biológicas, tornando os produtos naturais uma alternativa aos antibióticos, sem que ofereça riscos de desenvolvimento de resistência dos patógenos (TERKULA et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

A utilização de produtos naturais, em que seus compostos bioativos agem de forma sinérgica, podem proporcionar efeitos antiparasitários e antimicrobianos (fungicidas, bactericidas e antivirais) (DE FARIA et al., 2021; MENESES et al., 2021; NHU et al., 2019), além do mais

atuam no sistema imunológico, e podem promover um melhor desempenho zootécnico do animal (HOSEINIFAR et al., 2017; YOUSEFI et al., 2021).

A utilização de produtos naturais como alimentos funcionais na ração para peixes tem substituído componentes comumente mais caros, otimizando custos com alimentação (BALDISSERA et al., 2020) e melhorando a resistência a doenças. A alimentação dos peixes é uma questão crítica no sistema de aquicultura, pois representa cerca de 40-50% dos custos totais de produção (WU, 2017). Pesquisas recentes comprovam que o uso de produtos naturais para finalidades curativas e preventivas vem aumentando como alternativa aos convencionais quimioterápicos, permitindo a redução de impactos ambientais (ZENI et al., 2017). Essa busca por antimicrobianos naturais com baixa toxicidade, para mitigar o impacto ambiental ganhou grande proporção nos últimos anos. E dentre os produtos naturais, a própolis obtém destaque devido à sua importância farmacológica (BARBOSA et al., 2019). As atividades farmacológicas da própolis decorrem de sua constituição química, sendo esses constituintes os grandes responsáveis por seu efeito biológico (FISCHER et al., 2021).

O uso da própolis como tratamento terapêutico natural e como alimento vem ocorrendo desde 300 a.C, em muitas partes do mundo e seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (ALMUHAYAWI, 2020). É um produto natural (opoterápico) de característica resinosa que vem sendo amplamente estudada devido às suas atividades biológicas (SUNG et al., 2017).

3.6 PRÓPOLIS

A própolis é um termo apícola para as resinas colhidas de várias espécies de plantas pelas abelhas (*Apis mellífera* L.), e é considerada uma fonte promissora de compostos para a descoberta de novos fármacos (DO AMARAL DUARTE et al., 2017). Uma vez que os compostos de própolis são geralmente reconhecidos como substâncias seguras, eles eram frequentemente usados como ingredientes e/ou aditivos alimentares (ALMUHAYAWI, 2020). Em geral, a própolis, possui de 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos, vitaminas, entre outros (REIS et al., 2017; MELTEM, 2021).

Embora a própolis apresente componentes de origem animal, a maioria dos componentes responsáveis pelas atividades biológicas são derivados de plantas, e a composição da origem vegetal determina a composição química da própolis (FERNANDES et al., 2015).

A composição da própolis varia de colmeia para colmeia, de distrito para distrito, e depende da época de coleta, sazonalidade, iluminação, altitude, tipo de coletor e disponibilidade de alimento e atividade desenvolvida durante a exploração da própolis. As abelhas são oportunistas, reunindo o que elas precisam de fontes disponíveis. Assim, a composição química da própolis varia consideravelmente de região para região, junto com a vegetação (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018). A composição química da própolis é variada, com mais de 300 compostos diferentes, como flavonóides, ácidos fenólicos, ésteres, terpenóides, xantonas, ácidos graxos, cetonas, lactonas e esteróides (MELTEM, 2021).

Com base em análises comparativas (químicas e morfológicas) das plantas nas quais as abelhas possivelmente estariam coletando resina para fabricação da própolis, verificou-se que amostras de própolis do Brasil possuíam como fontes vegetais principais: *Araucaria* spp. (BANKOVA et al., 1996), *Baccharis* spp. (OLIVEIRA; BASTOS, 1998), *Dalbergia ecastophyllum* (TRUSHEVA et al., 2006), *Clusia* spp (CASTRO et al., 2009; ISHIDA et al., 2011) e *Mimosa tenuiflora* (FERREIRA et al., 2017). Muitos pesquisadores demonstraram a correspondência de algumas substâncias naturais da própolis com àquelas encontradas nas plantas, como por exemplo, a semelhança do perfil químico da própolis verde comparada com a composição da resina da planta *Baccharis dracunculifolia* (TEIXEIRA et al., 2005, SALATINO et al., 2005).

No Brasil existem mais de doze tipos de própolis, incluindo própolis verde, própolis vermelha, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela e a geoprópolis, as quais são diferenciadas pela cor, pelo odor e pela consistência (PARK et al., 2002, BERRETTA et al., 2017). Um décimo terceiro tipo de própolis foi adicionado em 2007, como sendo proveniente dos manguezais dos estados do Sergipe, Alagoas, Paraíba, Pernambuco e Bahia (DE MENDONÇA et al., 2015).

A composição química da própolis é muito complexa e altamente variável de acordo com sua origem botânica e fitogeográfica. Como consequência, os diferentes tipos de própolis são caracterizados por perfis químicos distintos (VELIKOVA et al., 2000; POPOVA et al., 2017). Os efeitos biológicos da própolis são exercidos pelos inúmeros compostos químicos identificados nas frações voláteis e não voláteis da própolis de diferentes origens botânicas e geográficas (GALEOTTI et al., 2018; KAMATOU et al., 2019). De todos esses compostos químicos presentes, certamente os flavonoides se destacam (LIMA, 2006). Os flavonoides e ácidos fenólicos são as principais classes de substâncias fenólicas, cujas relações estrutura-atividade antioxidante em sistemas aquosos ou lipofílicos têm sido extensivamente relatadas (SALATINO et al., 2011, BERRETTA et al., 2017).

Alguns estudos também destacaram o potencial da própolis como suplemento dietético e conservante de alimentos, devido às suas propriedades biológicas (MU et al., 2009; YANG et al., 2010). No entanto, a própolis é pouco solúvel em água e não pode ser usada como matéria prima, por isso deve ser purificada por extração com solventes para remover o material inerte e preservar a fração polifenólica (KARLA et al., 2017; POPOVA et al., 2017). A polaridade do solvente e a composição da própolis são dois grandes fatores capazes de influenciar a qualidade dos extratos da própolis (GALEOTTI et al., 2018).

Extratos de própolis são comumente obtidos por técnicas convencionais, como a extração etanólica. Após o processo de extração, a solução etanólica tem alto valor de mercado, sendo utilizada como forma farmacêutica final ou eventualmente incorporada em alimentos, bebidas, medicamentos ou cosméticos. O extrato etanólico consiste em uma fração rica em ácidos fenólicos e flavonóides (POPOVA et al., 2017). (KARLA et al., 2017; DE FRANCISCO et al., 2018; GALEOTTI et al., 2018).

Os extratos podem melhorar a saúde animal por meio de vários mecanismos, como supressão direta da proliferação de patógenos, alteração das populações microbianas intestinais e aumento das funções imunológicas (LIU et al., 2018), que poderia refletir, adicionalmente, em uma melhora de desempenho. Apesar desses efeitos, a aplicação da própolis no desempenho animal ainda é controversa devido aos seus efeitos altamente variáveis. Além disso, a literatura disponível sobre o uso de da própolis é insuficiente para definição de sua eficácia no desempenho produtivo, pois muitos destes estudos utilizam a própolis bruta, a qual provavelmente apresenta efeitos diferentes em relação aos dos extratos etanólico, além de muitos trabalhos não apresentarem as composições químicas das própolis utilizadas.

Dentre as própolis com efeitos benéficos registrados em homens e animais, destacam-se a própolis verde e a própolis vermelha.

3.6.1 PRÓPOLIS VERDE

Produzida no cerrado brasileiro a própolis verde é denominada “verde” por causa da sua origem botânica (superior a 90%) da espécie *Baccharis dracunculifolia*. As abelhas coletam tecidos jovens contendo clorofila, como brotos vegetais e folhas jovens, e as utilizam na colmeia para a elaboração da própolis de coloração esverdeada (CRUZ et al., 2021).



Figura 01. Própolis verde. Fonte: Nogueira Filho, 2020.

Rodrigues et al. (2020) estudaram a própolis coletada em 6 diferentes regiões de Franca (SP) e Passo (MG) e demonstraram que a própolis verde foi produzida principalmente em localidades onde a mata nativa, característica de Cerrado, era predominante. Nas demais áreas onde havia a interferência mais acentuada da atividade agrícola, com culturas de cana-de-açúcar, café e eucaliptos, a própolis produzida não poderia ser caracterizada como própolis verde.

A própolis verde brasileira é composta pelos seguintes biomarcadores: ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, naringenina, caempferol, isorhamnetina, sakurametina, pinocembrina, caempferina e artepellina C (ANDRADE et al., 2017; CHEN et al., 2018; SANTIAGO et al.; 2020)(Figura 02).

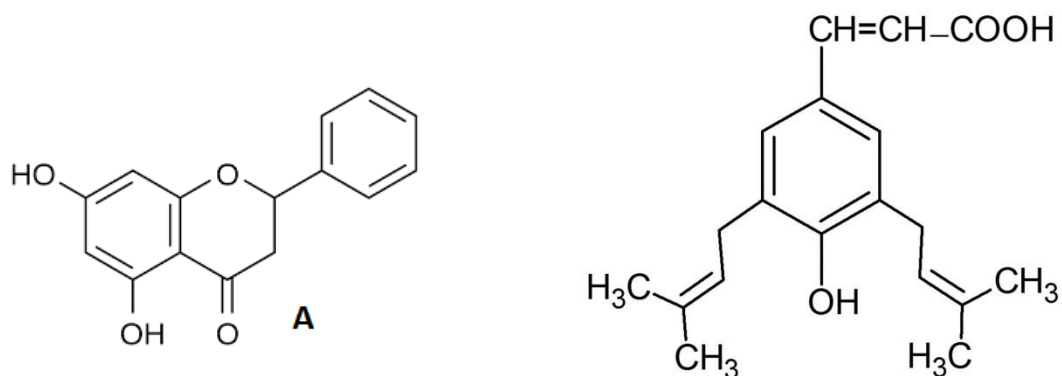


Figura 02. Estrutura molecular dos principais componentes da própolis verde: pinocembrina (A) e artepellina C. Fonte: FERREIRA; NEGRI, 2018.

Essa própolis apresenta atividades anti-inflamatórias, antidiabéticas e anti-Alzheimer (SHAHINOZZAMAN et al., 2018), bem como antimicrobiana (ZANCANELA et al., 2019), antioxidante (GALEOTTI et al., 2017), e gastroprotetora (DE ALMEIDA et al., 2020).

Segundo Morgado et al. (2018), a própolis verde contém uma quantidade significativa de artepellin C, um derivado do ácido cinâmico, que é responsável pelas diversas propriedades terapêuticas. Calegari et al. (2017) encontraram maior atividade antioxidante da própolis verde em amostras brasileiras coletadas em meses mais quentes, devido aos elevados teores de compostos fenólicos e flavonóides.

A própolis verde se destaca contendo moléculas bioativas com potencial uso na aquicultura (FARAG et al., 2021). Tem sido amplamente utilizada como promotor de crescimento (MEURER et al., 2009; ABBASS et al., 2012) e como antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano e imunoestimulante (EL-GUENDOUIZ et al., 2019; WOLSKA, K. et al., 2019; PETRUZZI et al., 2020; SILVA-BELTRÁN et al., 2020).

A própolis verde contém vitaminas (B1, B, C, E) e minerais essenciais (ferro, alumínio, manganês e silício), que melhoram os cofatores digestivos e a atividade enzimática. Essas propriedades podem contribuir para melhorar a digestão e a absorção de nutrientes com o consequente aumento do peso dos peixes (ABD-EL-RHMAN, 2009).

3.6.2 PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis vermelha é uma das 13 variedades da própolis brasileira, obtida a partir de exsudatos encontrados na superfície da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Fabaceae), o "rabo-de-bugio" (DEVEQUI-NUNES et al., 2018).



Figura 03. Própolis vermelha. Fonte: Nogueira Filho (2020).

No Brasil, esse tipo de própolis é encontrado ao longo das margens de rios nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia e Roraima (RUFATTO et al., 2017). A própolis vermelha pode ser encontrada também em países como Cuba, China, México e Venezuela (NETO et al., 2017). Esta espécie de própolis apresenta substâncias químicas em sua composição que diferem das encontradas em outros tipos de própolis, em particular quantidades elevadas de isoflavonóides, uma subdivisão de flavonóides destacando a própolis vermelha nas pesquisas de produtos naturais devidos as suas propriedades farmacológicas (BUENO-SILVA et al., 2017).

A composição química do extrato alcóolico da própolis vermelha apresenta predominância de flavonóides como a formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, pinocembrina, quercetina, rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksin, luteolina, dalbergina, que a diferem dos demais tipos da própolis brasileira tornando-a um produto de características e composição química particulares além de múltiplas atividades biológicas (DAUGSCH et al., 2008; ANDRADE et al., 2017).

A formononetina é uma isoflavona da família dos flavonoides, possui ação anti-inflamatória e antioxidante (GUO et al., 2017). É encontrada na própolis vermelha e em outras fontes naturais como legumes, trevo vermelho (*Trifolium pratense*) e erva chinesa (*Astragalus membranaceus*) (TAY et al., 2019) e possui estrutura semelhante à de estrogênios com afinidade por seus receptores podendo alterar o índice de proliferação celular (BUDRYN et al., 2018) (Figura 04).

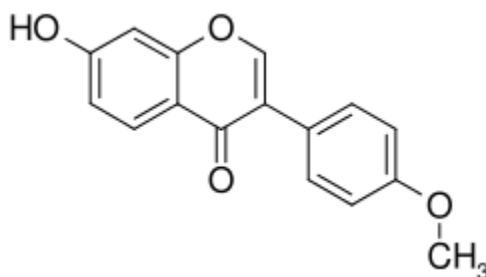


Figura 04. Estrutura molecular da formononetina. Fonte: SILVA et al. (2009).

A formononetina tem ainda a capacidade de inibir o funcionamento das enzimas quinases que são dependentes da ciclina e de várias outras proteínas reguladoras do ciclo celular, causando assim a interrupção do ciclo celular atuando como um anticâncer (BAILON-MOSCOSO et al., 2017).

Como antioxidante atua eliminando radicais livres, neutralizando ROS (espécies reativas de oxigênio), inibindo a peroxidação lipídica e outras patologias mediadas por radicais livres, diminuindo a disseminação da inflamação no organismo (DE MENDONÇA et al., 2020). No estudo de Chen et al. (2015), os autores encontraram evidências de que esta substância regulou a ação de mediadores proteicos citotóxicos em células neuronais após hipóxia, exercendo ação neuroprotetora. E Huh et al. (2011) mostraram indícios de sua ação na regulação de fatores de transcrição que favorecem o processo de cicatrização em ratos.

O uso da própolis vermelha com outros animais é algo que vem crescendo, com destaque para o uso em bezerros leiteiros, avaliando desempenho e sanidade (SLANZON et al., 2019; VIGAS et al., 2021), como antiparasitário em camundongos (SILVA et al., 2021), no metabolismo em ovinos (DA SILVA et al., 2021) e melhora hematológica, renal e hepática em cães (DE MELO et al., 2020). Porém, em peixes ainda não foi estudada.

Um dos flavonóides que também merece destaque e está presente na própolis vermelha é a biochanina A (4-metoxi-5,7-di-hidroxi isoflavona) (Figura 05). Esse flavonóide é encontrado também no trevo vermelho, soja, grão de bico e outras plantas (SARFRAZ et al., 2020).

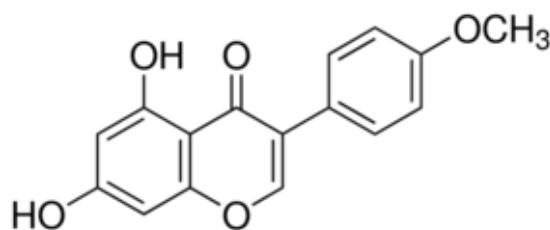


Figura 05. Estrutura molecular da biochanina A. Fonte: OZA et al. (2018).

Foi confirmado em ratos que a biochanina A apresenta efeito anticarcinogênico, inibindo o crescimento celular, ativando a apoptose de células cancerosas, bloqueando a angiogênese, interrompendo a metástase e o ciclo celular (CHEN et al., 2015). A biochanina A mostrou efeitos antiinflamatórios inibindo o NF-κB (fator nuclear potencializador de cadeias leves kappa de células B) e MAPK (proteína-quinases), e a liberação de mediadores inflamatórios como o TNF-α (fator de necrose tumoral – alfa), IL – 1 beta (interleucina), iNOS (óxido nítrico sintase, NO e PGE2 (prostaglandinas E2) (ZHANG; CHEN, 2015). Demonstrou também capacidade de proteção hepática contra lesões oxidativas, aumentando a expressão de enzimas cito-protetoras com OH-1 e NADPH (quinona oxidoreductase 1) (LIANG et al., 2019).

Além disso exibiu atividade sequestrante de radicais livre DPPH (2,2 – difenil-1-picril-

hidrazil) (JALALUDEEN et al., 2016). Foi observado em ratos um efeito antidiabético, pela melhora da expressão da visfatina que é uma proteína com efeito semelhante a insulina (SUNDARESAN et al., 2018).

Um polifenol que também está presente na própolis vermelha é a apigenina (Figura 06). É encontrada em muitas frutas, vegetais e ervas (WANG et al., 2017). A apigenina reduz a expressão de citocinas e sua secreção, atuando como antiinflamatório e inibem algumas enzimas, como ciclooxigenase, aldose redutase, xantenos oxidase, Ca^{+2} + ATPase, atuando com antioxidante (SHUKLA et al., 2019). Kim et al. (2020) sugerem que apigenina induz a apoptose bacteriana por meio da ativação de vias oxidativas celulares dependentes da produção e do acúmulo de RNS/ROS, atuando com bactericida. Alguns autores relataram também a sua atividade anticancerígena (SALMANI et al., 2017; KASHYAO et al., 2018; SHARMA et al., 2019; IMRAN et al., 2020).

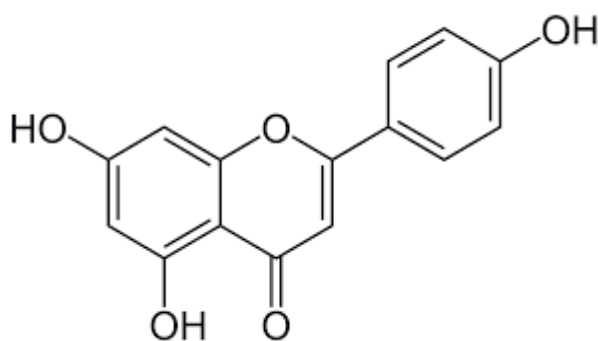


Figura 06. Estrutura molecular da apigenina. Fonte: KHAN et al. (2019).

Embora haja evidências dos benefícios do uso da própolis na aquicultura, nenhum estudo com a própolis vermelha foi realizado com peixes até o momento. Diante do exposto considerando as características bioativas da própolis verde e vermelha, existe a necessidade de alimentos funcionais para o aumento de produtividade piscícola, e a inclusão de própolis na dieta se torna uma alternativa interessante a ser avaliada contra os patógenos de peixes e sua suplementação para tilápias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e na Universidade Tiradentes (UNIT), no Estado de Sergipe.

As própolis verde e vermelha foram provenientes da região Nordeste do Brasil, adquiridas da empresa BEE S NATURAL PRODUCTS localizada na rua Antônio Baltazar, nº 09, no município de Barra de Santo Antônio (Latitude: 09° 24' 17" S Longitude: 35° 30' 26" W) no Estado de Alagoas, em março de 2019.

O experimento foi realizado em duas etapas; uma etapa in vitro e outra etapa in vivo.

Na etapa in vitro foram confeccionados extratos hidroalcoólicos das própolis verde e vermelha. A própolis bruta foi fragmentada em partículas menores com o auxílio de uma tesoura. Após obtenção do triturado, foram colocados em cada béquer 16,7g contendo 208 mL de álcool a 70%, respeitando a proporção metodológica preestabelecida (1/12,5) MAIA-ARAÚJO (2009). Os béqueres então foram levados ao banho de ultrassom, na frequência 34 kHz e potência de 600W, onde permaneceram por 1 hora.

Contabilizado o tempo proposto, as amostras foram retiradas e levadas para filtragem com auxílio do Erlenmeyer e papel de filtro comum a fim de impedir a passagem de partículas maiores. Na sequência, as amostras foram distribuídas em placas de Petri com peso conhecido e levadas a estufa de fluxo (45°C) por 72 h como preconizado por MAIA-ARAÚJO (2009). Com o material seco, foi feita a raspagem do material contido na placa de Petri e realizado o cálculo de rendimento através da relação entre a massa total do extrato e a massa inicial do material. Os extratos foram armazenados em frasco de vidro (âmbar) e acondicionados em geladeira a uma temperatura de (2 a 8°C).

Os extratos foram caracterizados através da identificação e quantificação dos flavonóides, para isso foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. O perfil cromatográfico foi realizado seguindo a metodologia de Silva et al (2015). Os extratos de própolis foram diluídos com metanol/água (50:50 v/v) na concentração de 400 µg/mL e submetidos a banho de ultrassom por 45 min. A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência que consiste em um equipamento: HPLC modelo Dionex Ultimate 3000 da marca Thermo scientific equipado com um controlador de sistema CBM-20A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna cromatográfica Hypersil GOLD com 100 mm de comprimento, 3,0 mm de diâmetro interno (C-18) e fase estacionária com granulometria de 3 µm, com detector de Rede de diodos (DAD).

O volume de injeção da amostra foi de 5 µL e a razão de eluição da fase móvel foi de 0,500 mL/min. Os solventes utilizados para a fase móvel foram: (A) ácido fórmico 0,5% (Neon, São Paulo, Brasil) em água ultrapura e (B) metanol (HPLC-grau, Panreac, Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado gradiente linear (Tabela 1), retornando as condições iniciais e finalizando a análise.

Tabela 1. Gradiente linear utilizado durante a análise cromatográfica.

Intervalo de Tempo (min)	% de A (solução de ácido fórmico + 0,5 % de água ultrapura)	% de B (metanol)
0-10	60	40
10-15	55-50	45-50
15-20	50-45	50-55
20-35	45	55
35-50	95-0	5-100
50-60	65-50	35-50

O detector foi ajustado entre 260 e 280 nm para adquirir o cromatograma e os compostos foram identificados através de co-injeções dos padrões comparando os tempos de retenção e os espectros de absorção no ultravioleta. Os padrões de flavonóides utilizados foram: formononetina, apigenina e biochanina A (padrão sigma) que foram diluídos com metanol até a concentração de 100 mg/mL (solução mãe). Para a análise quantitativa, as curvas de calibração de cada padrão foram preparadas em cinco concentrações diferentes: 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL. As curvas analíticas foram construídas utilizando-se o software LC Solution.

4.1 ENSAIO *IN VITRO*

Foram realizados ensaios *in vitro* com extrato da própolis verde e da própolis vermelha em três agentes patogênicos de peixes, um fungo *Saprolegnia parasítica*, duas bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* e um protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*. Uma amostra de cada extrato de própolis seco foi pesada (10 g) e ressuspensa em 100 mL de álcool a 80% (TUKMECHI et al., 2010), constituindo-se a solução estoque. Dessa solução foram realizadas as diluições experimentais.

4.1.1 Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de própolis

Para a realização desse ensaio *in vitro*, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado para cada extrato hidroalcolólico (verde ou vermelha) avaliando onze concentrações (50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097; e 0,048 mg/ mL) em triplicata. Nesse ensaio foi utilizado o fungo *Saprolegnia parasitica* isolado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e cultivado no Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros (MENEZES, 2020).

Fragmentos do fungo foram removidos de peixes naturalmente infectados, com auxílio de pinça e alça de platina e transferidos para placas de Petri de vidro contendo 20 mL de meio de cultura Ágar batata dextrose (BDA) e cultivados em 25 °C em câmara de germinação Tecnal TE-40. A identificação genética do fungo foi realizada segundo metodologia de Hulvey et al. (2007). Posteriormente, um disco de 9 mm de meio de cultura com o fungo foi inoculado no centro de placas de Petri com meio de cultura BDA contendo as concentrações desejadas dos extratos de própolis (Figura 07).



Figura 07. Placa de Petri contendo o meio de cultura e o fungo *Saprolegnia parasitica*.
Fonte: Nogueira Filho, 2020.

O crescimento micelial então foi observado a cada 24 h durante 96 horas e avaliado pela medida dos diâmetros perpendiculares, com um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools (adaptado de CORRÊA et al., 2013).

4.1.2 Atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos de própolis

Para os testes *in vitro* com os extratos foram usadas as bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. As bactérias são provenientes do banco de cepas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, isoladas de tilápias com sinais clínicos de bacteriose. Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso para cada extrato hidroalcólico de própolis (verde ou vermelha) em onze concentrações (50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097; e 0,048 mg/ mL) em triplicata, para cada uma das bactérias, além de dois controles, um com álcool 80% e outro apenas com meio de cultura.

Previamente, as bactérias foram crescidas em meio de cultura ágar infusão cérebro coração (BHI AGAR) por 24 horas a 30°C. Após o crescimento bacteriano, foram seccionados discos de ágar (9mm) dos meios BHI contendo as bactérias (*A. hydrophila* e *S. agalactiae*) e estes foram alocados em novas placas Petri (posicionados ao centro, 1 disco por placa). Estas novas placas continham meio de cultura Triptona Soya Agar (TSA) misturado com as respectivas concentrações dos extratos de própolis. Após o posicionamento dos discos de ágar contendo as bactérias, essas novas placas (TSA + extrato) foram incubadas por 24 horas a 30°C para avaliar o crescimento bacteriano ao redor dos discos. Todas as medidas foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital de inox 150 mm LEE tools.

4.1.3 Atividade antiparasitária *in vitro* dos extratos de própolis

Seguindo os delineamentos anteriores, também foram avaliadas onze concentrações de cada própolis (50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195; 0,097; e 0,048 mg/ mL) em triplicata, contra o parasita de peixe *Ichthyophthirius multifiliis*. Este foi coletado de peixes infectados no estágio de trofontes. Os protozoários foram alocados em pequenas placas de Petri, na densidade de 5 parasitas por placa, e posteriormente foram colocadas as concentrações dos extratos de própolis utilizados no experimento.

Durante 4 horas, a cada hora, foi verificada a mortalidade dos parasitas (imobilidade e falta de replicação celular) e confirmada pelo teste de viabilidade por coloração dos protozoários com sondas fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (IP) (Molecular Probes®). A visualização foi realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i), de forma que parasitas intactos e viáveis emitem fluorescência verde, enquanto células mortas ou danificadas emitem

fluorescência vermelha de acordo com Nizio et al. (2018). A partir desses dados foram calculadas as porcentagens de células inviáveis.

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa obedeceu às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA-UNIT), sendo aprovado com o parecer nº 010719 no dia 22 de agosto de 2019. Em cada biometria, os animais foram anestesiados em banho de imersão em solução de eugenol (60mg/L). Quando necessária a eutanásia, os animais foram anestesiados (banho de imersão eugenol 60mg/L) seguida de seção medular conforme resolução normativa 37 CONCEA.

4.2.2 Animais

Os peixes utilizados no experimento foram produzidos na Piscicultura LIMA, Caiçara II, localizada no município de Paulo Afonso – BA, sendo todos revertidos sexualmente para machos, e foram aclimatados em caixas de água de 500 litros até o início do experimento. Foram utilizados no experimento *in vivo*, alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*), com 4 semanas de idade, peso médio de $1,11 \pm 0,27$ g e comprimento de $4,16 \pm 0,43$ cm, mantidos em densidade de estocagem de 50 peixes por caixa de água de 500 litros.

4.2.3 Preparação do extrato de própolis e ração para os peixes

Os extratos hidroetanólicos das própolis foram produzidos conforme metodologia já descrita. O pó obtido através da extração foi diluído em álcool a 80% de acordo com TUKMECHI et al. (2010) e aspergido sobre a ração nas concentrações de 0,0; 1,5 e 3,0 g de cada própolis/kg de ração, seguindo um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3X3 (3 concentrações da própolis verde X 3 concentrações própolis vermelha) em triplicata (Tabela 2).

Tabela 2. Delineamento casualizado dos tratamentos aplicados.

Tratamento	Própolis verde (g)	Própolis vermelha (g)
T0	0,0	0,0
T1	0,0	1,5
T2	0,0	3,0
T3	1,5	0,0
T4	1,5	1,5
T5	1,5	3,0
T6	3,0	0,0
T7	3,0	1,5
T8	3,0	3,0

Foi utilizado no experimento ração comercial em pó com 56% de Proteína bruta (PB) até a 3ª semana, ração extrusada com 42% de PB da 4ª a 9ª semana e ração extrusada com 32% de PB extrusada (5mm) até o final do experimento seguindo recomendações de manejo alimentar do fabricante da ração. A dieta controle não continha suplementação. A composição química em formononetina, apigenina e biochanina A das rações foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência conforme metodologia já mencionada.

Os peixes foram distribuídos em 27 caixas de 500 litros de capacidade em sistema de recirculação de água. E alimentados duas vezes por dia durante 120 dias, seguindo a taxa de alimentação de 10% do peso vivo por dia. A qualidade da água foi monitorada diariamente utilizando uma sonda multiparâmetro (YSI550 profissional plus) e foram avaliadas a temperatura, pH, condutividade, amônia e oxigênio dissolvido.

O desempenho zootécnico e o consumo de ração foram avaliados mensalmente utilizando as equações:

GCT – ganho de comprimento total (comprimento total final – comprimento inicial);

GCP – ganho de comprimento padrão (comprimento padrão final – comprimento padrão inicial);

GPM – ganho de peso médio (peso médio final – peso médio inicial);

GBM – ganho de biomassa (biomassa final – biomassa inicial);

CAA – conversão alimentar aparente (consumo de ração/ganho em biomassa);

TCE – taxa de crescimento específico $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})/\text{dias de alimentação}]*100$;

S – sobrevivência [(número inicial de indivíduos/número final de indivíduos)*100];

Kf – fator de condição de Fulton [(peso final/comprimento total final³)*100] e UNI – uniformidade em peso do lote de peixes foi calculada de acordo com Furuya et al.(1998).

4.2.4 Hematologia

Para avaliar os parâmetros hematológicos foi retirado 1 mL de sangue de 5 peixes de cada repetição ao fim do experimento. Os peixes foram anestesiados com eugenol (60 mg. L⁻¹) e então o sangue foi coletado por meio de punção dos vasos caudais com seringas contendo EDTA (10%). Alíquotas foram utilizadas para determinar o número total de eritrócitos (cél x 10⁶ µL⁻¹), por contagem em câmara de Neubauer (GARCIA-NAVARRO, 2005), o porcentual de hematócito, pelo método de microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971), a concentração de hemoglobina (g.dL⁻¹) pelo método de cianometahemoglobina em analisador bioquímico Prestige IQ 50, concentração de glicose (mg.dL⁻¹) utilizando medidor automático Prestige IQ 50, e os níveis plasmáticos de proteínas totais (g.dL⁻¹) utilizando o refratômetro (Quimis®). Também foram confeccionadas extensões sanguíneas, coradas por May-Gruwald-Giemsa, segundo método de Rosenfeld (1947), para realização da contagem indireta de leucócitos, trombócitos totais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004); e contagem diferencial de leucócitos (RANZANI-PAIVA, 1995).

Com os resultados obtidos, foram calculados os índices hematimétricos (VALLADA, 1999): volume corpuscular médio (VCM = Ht x 100/nº eritrócitos = fl), hemoglobina corpuscular média (HCM = taxa Hb x 10/nº eritrócitos = pg) e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM = taxa HCM x 100/Ht = g.dL⁻¹).

4.2.5 Histopatologia

Foi realizada a avaliação histopatológica do fígado dos peixes. Para tanto, foram utilizados cinco animais (n=5) de cada tratamento ao final do experimento. Os peixes foram anestesiados e eutanasiados por secção medular para posteriormente, fragmentos do fígado serem retirados e então fixados em formaldeído 10%, lavados e conservados em álcool 70%. A seguir foi realizada a inclusão do material em parafina histológica. Após a inclusão foram realizados cortes histológicos de 5 µm com auxílio de navalha descartável em micrótomo semi-automático (Slee medical® Cut 5062).

Os cortes histológicos foram submetidos às colorações de hematoxilina/eosina (HE). Estes procedimentos estão de acordo com os preconizados por Behmer et al. (1976). As lâminas histológicas foram avaliadas de acordo com o grau de severidade histopatológica (sem sinal clínico, sinal clínico leve, sinal clínico moderado e sinal clínico grave) de acordo com a metodologia de Fishbien et al. (2015) e Zhang et al. (2018).

4.2.6 Teste de desafio com *Streptococcus agalactiae*

Após o ensaio in vivo de desempenho zootécnico onde as tilápias foram alimentadas com as rações testes por 120 dias, foi realizado um desafio experimental com a bactéria patogênica isolada especificamente de tilápias. O *Streptococcus agalactiae* foi isolado de tilápias doentes coletadas de pisciculturas em tanques redes no município de Paulo Afonso-BA. O isolado foi armazenado e mantido congelado (-70°C) em glicerol a 15% e 85% de caldo (Merck) no banco de cepas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, até o uso. Após 120 dias de suplementação, os peixes de cada suplementação foram realocados em aquários de 70 L em sistema estático e mantidos a temperatura de 28°C durante o experimento de desafio. A concentração da bactéria foi de 9.10^{10} UFC.mL⁻¹, sendo injetado 20µL intraperitonealmente nos peixes. Além disso, peixes do tratamento sem suplementação com própolis, compuseram dois controles, ou seja, peixes que foram injetados com solução salina estéril e peixes que não foram injetados.

Durante 96 horas de experimento, os peixes mortos foram retirados diariamente do aquário e a mortalidade foi observada e anotada. Os peixes sobreviventes foram submetidos a análise hematológica e histológica, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, cada peixe foi submetido ao procedimento de anestesia e eutanásia (secção medular) e posteriormente coletados pedaços de músculo para avaliação da atividade antioxidante por meio da redução do complexo fosfomolibdênio (PITRO et al., 1999). Todas as amostras passaram por leitura em espectrofotômetro UV-Vis (695 nm) usando ácido ascórbico (200 µg. mL⁻¹) como solução padrão (ácido ascórbico representa 100% da atividade antioxidante).

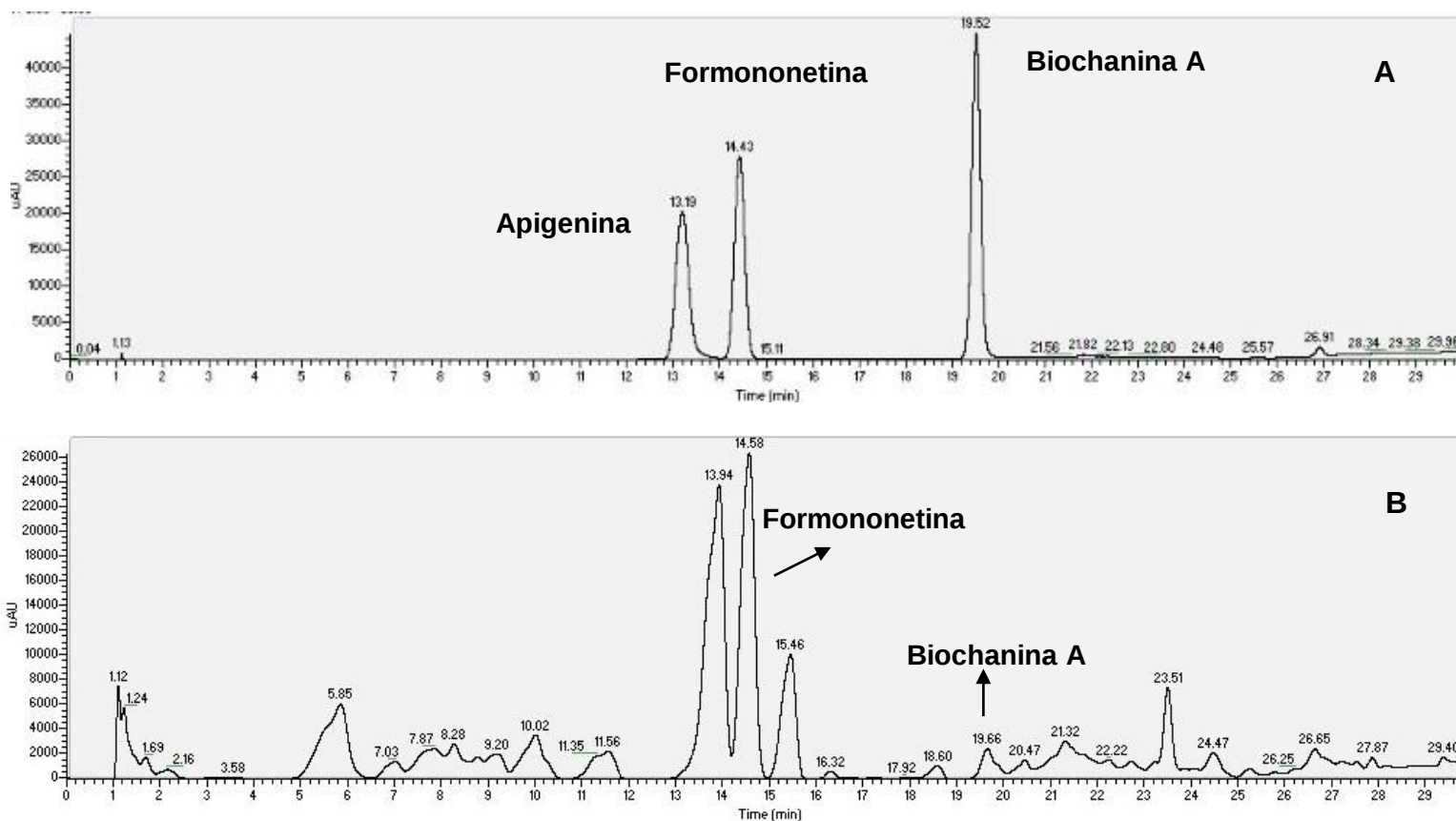
4.2.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos as premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade de Levene. Posteriormente, os dados do ensaio in vitro e ensaio in vivo foram

submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p=0,05$) para a comparação entre as médias, ou Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn ($p=0,05$) para a comparação dos postos. A análise estatística foi avaliada com nível de significância $p=0,05$ usando os programas (PAST e BioESTAT).

5 RESULTADOS

O rendimento da extração hidroalcolólica de própolis verde e vermelha foi de 54,29 % e 22,44 %, respectivamente. Os tempos de retenção dos padrões apigenina, formononetina e Biochanina A, foram 13,39, 14,61 e 19,68 minutos, respectivamente (Figura 08). As concentrações de formononetina foram de 74,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no extrato de própolis verde e 213,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no extrato de própolis vermelha. Para a biochanina A, apenas a própolis vermelha apresentou a concentração de 7,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto a verde estava abaixo dos valores de detecção. A apigenina não foi detectada nos extratos de própolis, pois, estavam com concentração abaixo do limite de detecção.



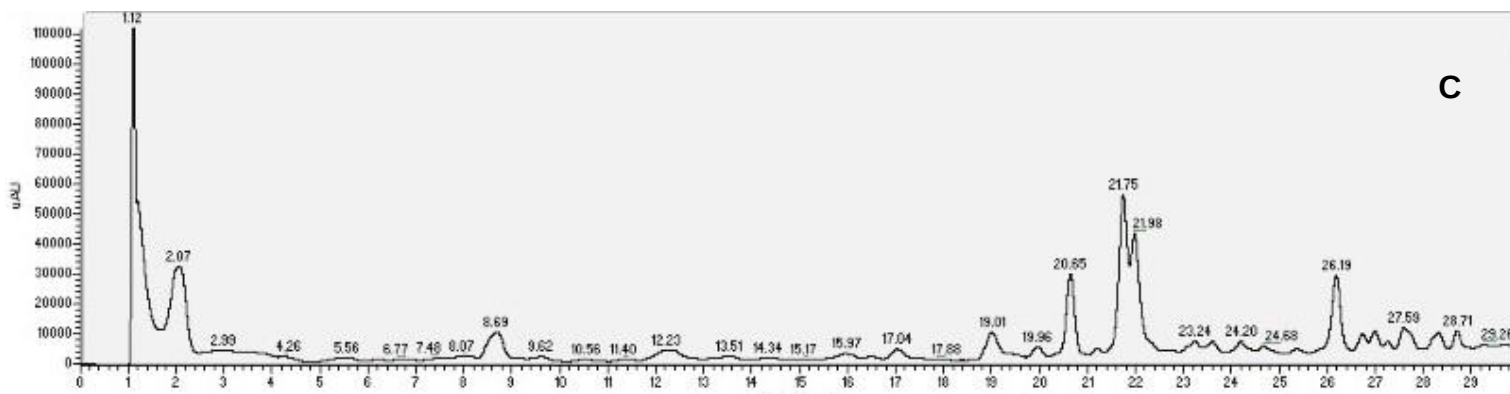


Figura 08. Cromatograma dos padrões de Apigenina, Formononetina e Biochanina A (A); cromatograma do extrato de própolis vermelha (B); cromatograma do extrato de própolis verde (C).

Embora não tenha sido possível a identificação dos compostos presentes na própolis verde, observou-se picos nos tempos de retenção de 20,65; 21,75; 21,98 e 26,19 min, sendo então componentes distintos daqueles observados na própolis vermelha.

Com relação aos ensaios in vitro, os extratos de própolis verde e vermelha promoveram inibição significativa do crescimento micelial nas concentrações a partir de 0,391 mg.mL⁻¹. A própolis verde em comparação com a vermelha, na concentração de 0,195 mg.mL⁻¹ apresentou menores valores de crescimento micelial. O álcool não influenciou no crescimento do fungo (*Saprolegnia parasítica*) (Figura 09).

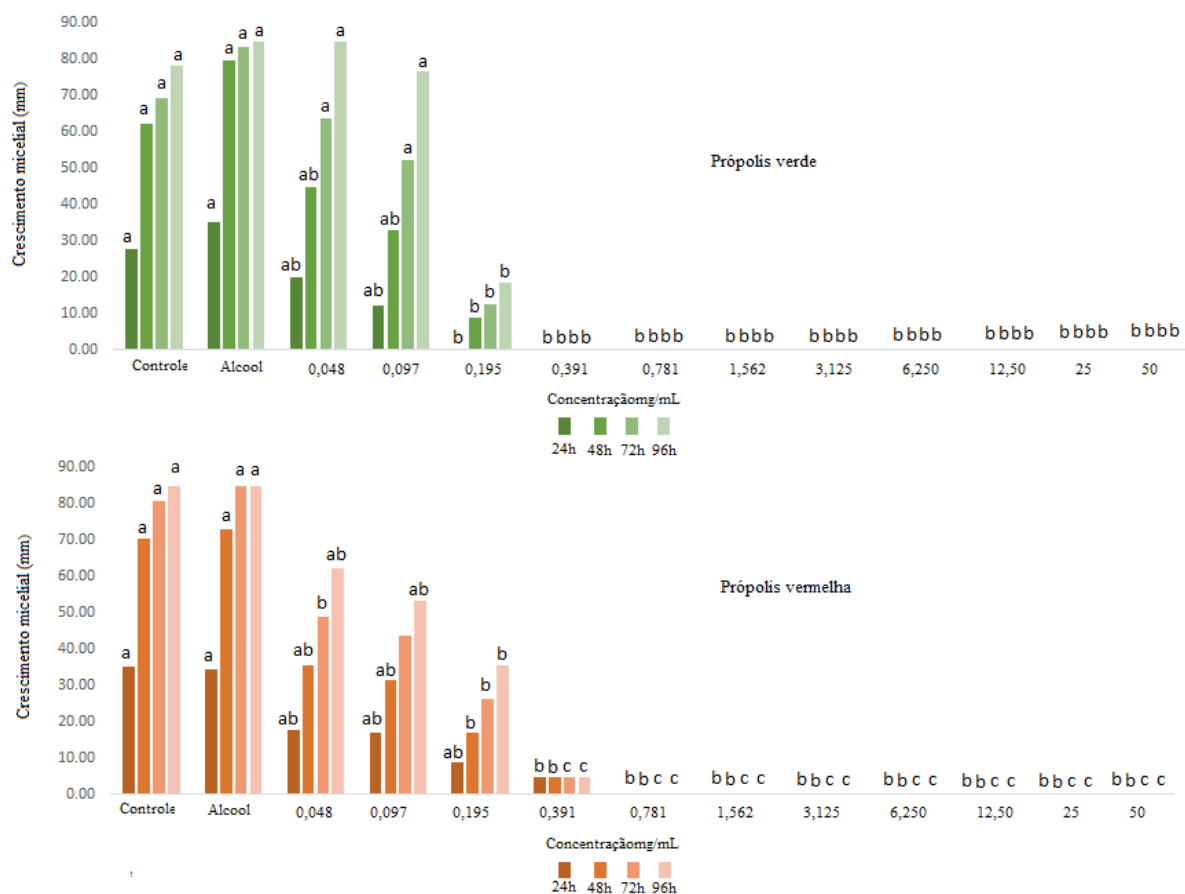


Figura 09. Crescimento micelial do fungo *Saprolegnia parasitica* frente aos extratos de própolis verde e vermelha em diferentes concentrações ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 96 horas. Diferentes letras entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal. Wallis.

No ensaio in vitro com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, a própolis verde inibiu o crescimento bacteriano até a concentração $1,56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, já a própolis vermelha inibiu o crescimento bacteriano em concentrações mais baixas até $0,195 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 10). Para a bactéria *Streptococcus agalactiae*, observou-se o contrário, onde a própolis verde promoveu inibição do crescimento do patógeno até a concentração de $0,097 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo uma concentração mais baixa se comparada a própolis vermelha que apresentou crescimento bacteriano na concentração de $0,781 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 11).

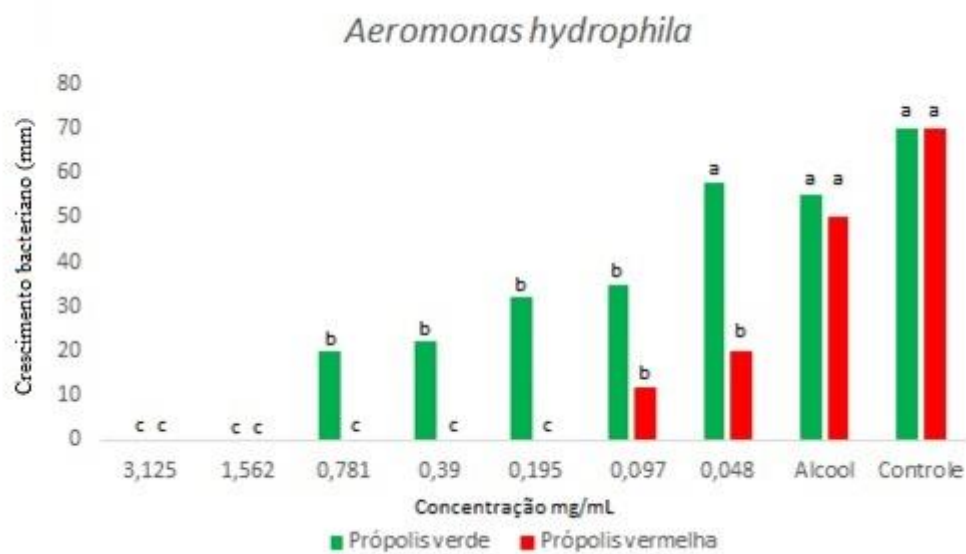


Figura 10. Crescimento bacteriano (mm) em placas petri contendo TSA com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha frente a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila* após incubação de 24 horas em estufa microbiológica (30°C). O álcool estava em concentração de 80% e o controle havia apenas meio de cultura. Diferentes letras entre as colunas de mesma cor (verde ou vermelha) indicam diferença estatística pelo teste Kruskal wallis post hoc Dunn ($p < 0.05$).

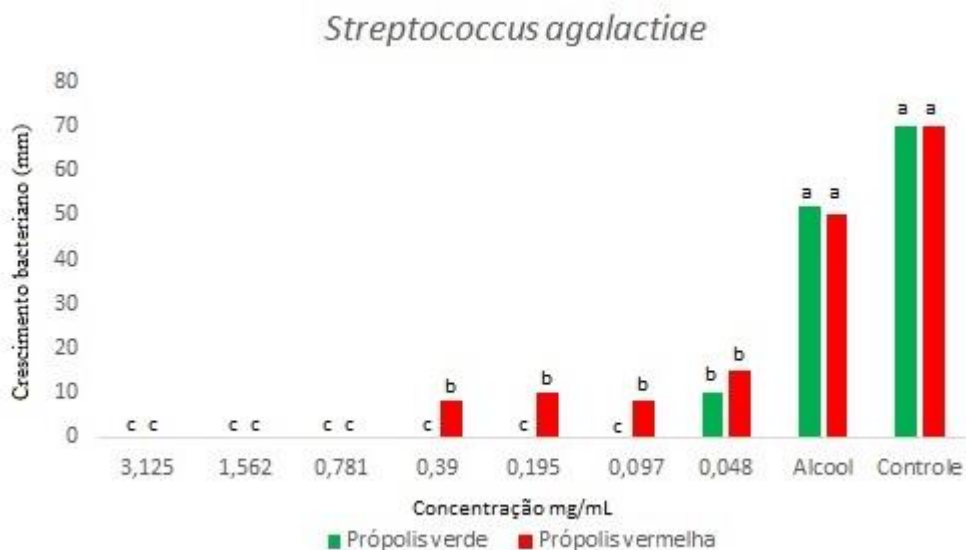


Figura 11. Crescimento bacteriano (mm) em placas petri contendo TSA com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha frente a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae* após incubação de 24 horas em estufa microbiológica (30°C). O álcool estava na concentração de 80% e o controle havia apenas meio de cultura. Diferentes letras entre as colunas de mesma cor (verde ou vermelha) indicam diferença estatística pelo teste Kruskal wallis e post hoc Dunn ($p < 0.05$).

Nos ensaios in vitro com o parasita *Ichthyophthirius multifiliis*, durante as 4 horas de observação, o parasita permaneceu imóvel, comportamento anormal para o parasita, com cor normal e ausência de divisão celular em todos os tratamentos com própolis. As concentrações de 50 a 0,390 mg.mL⁻¹ dos extratos de própolis verde apresentaram 100% de eficiência, provocando danos observáveis na membrana plasmática do parasita, causando sua inviabilidade e consequentemente a morte dos parasitos. Porém, partir da concentração 0,195 mg.mL⁻¹, o extrato de própolis verde não foi capaz de inviabilizar todos os protozoários apresentando eficácia de 50%. Já a própolis vermelha apresentou 100% de eficiência em todas as concentrações experimentais. No álcool e no controle não foi observado mortalidade do parasita (Figura 12).

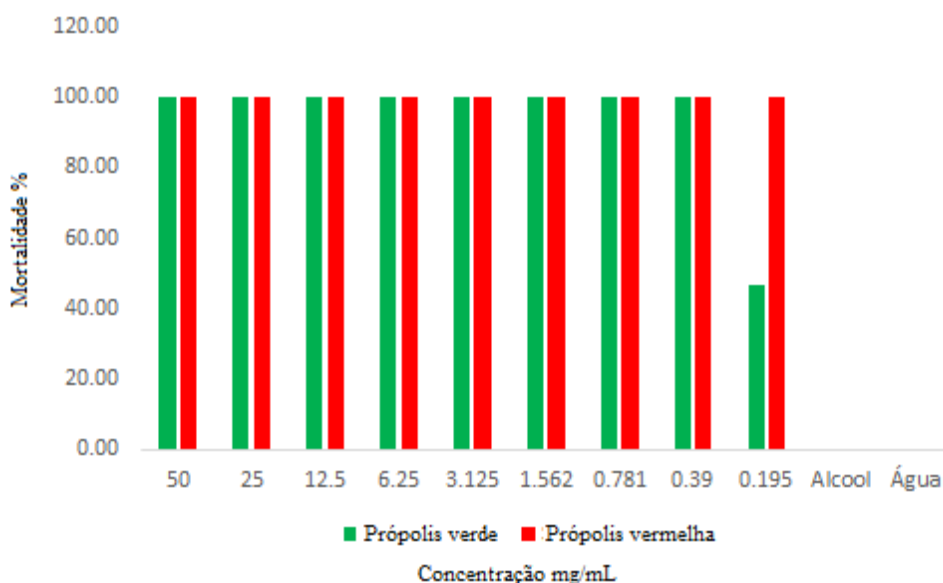


Figura 12. Mortalidade (%) do protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* em diferentes concentrações de própolis verde e vermelha, álcool em concentração de 80%.

No ensaio in vivo, a concentração dos compostos marcadores identificados e sua quantificação nas rações experimentais T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8 estão descritos na tabela 3. Nota-se que nas rações que foram adicionadas somente a própolis verde (T3 e T6) não foi detectada a biochanina A. A apigenina não foi quantificada em nenhuma das rações testes.

Tabela 3. Concentração (µg/g) de formononetina, biochanina A e apigenina presentes na ração.

Compostos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Formononetina	5,83	8,78	1,96	6,21	10,41	2,34	9,48	12,68
Biochanina A	0,37	0,82	*<LD	0,27	0,69	*<LD	0,36	0,95
Apigenina	*<LD	*<LD	*<LD	*<LD	*<LD	*<LD	*<LD	*<LD

*abaixo do limite de detecção (<LD). Legenda: T1 (0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T2 (0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T3 (1,5 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T4 (1,5 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T5 (1,5 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T6 (3,0 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T7 (3,0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T8 (3,0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha)

Durante o ensaio in vivo, as rações com adição de própolis não afetaram os parâmetros de qualidade de água durante o experimento, mantendo os níveis de oxigênio dissolvido em $4,44 \pm 0,96 \text{ mg.L}^{-1}$, pH em $5,45 \pm 1,10$, temperatura em $25,89 \pm 0,46 \text{ }^{\circ}\text{C}$, condutividade elétrica em $967,22 \pm 1,50 \text{ }\mu\text{S/cm}$ e amônia tóxica em $0,05 \pm 0,0091 \text{ mg.L}^{-1}$.

Nos primeiros 30 dias de alimentação, as suplementações, independentemente do tipo da própolis (verde ou vermelha; não houve interação estatística) não afetaram os parâmetros de desempenho zootécnico ($p>0,05$) de ganho em comprimento (total e padrão), ganho de peso, ganho em biomassa, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico e sobrevivência (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética com própolis após 30 dias.

	Própolis verde (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	2.76±0.15a	2.64±0.08a	2.63±0.12a
GPM	4.47±0.49a	4.07±0.23a	4.18±0.37a
GBM	202.45±14.34a	195.11±16.83a	194.11±14.41a
CR	150±00a	150±00a	150±00a
CAA	0.74±0.05a	0.77±0.06a	0.78±0.06a
TCE	5.36±0.28a	5.12±0.15a	5.19±0.24a
S	90.89±5.82a	93.78±3.71a	92.44±4.60a
	Própolis vermelha (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	2.73±0.10a	2.66±0.10a	2.65±0.10a
GPM	4.38±0.34a	4.18±0.30a	4.16±0.52a
GBM	204.22±18.96a	191.89±12.93a	195.56±11.45a
CR	150±00a	150±00a	150±00a
CAA	0.74±0.07a	0.79±0.05a	0.77±0.05a
TCE	5.32±0.21a	5.19±0.19a	5.17±0.31a
S	91.78±5.20a	91.56±2.63a	93.78±6.00a

Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$), GC – ganho de comprimento (cm), GPM – ganho de peso médio (g), GBM – ganho de biomassa (g), CR- consumo de ração, CAA – conversão alimentar aparente, TCE – taxa de crescimento específico, S - sobrevivência.

Porém, observou-se interação estatística entre os tipos de própolis para o fator de condição e uniformidade do lote (tabela 5), onde se observou uma diminuição do fator de condição de Fulton quando se adicionou as própolis verde e vermelha ($p<0,05$), sendo que a maior redução do fator de condição foi com a alimentação dos peixes com rações contendo somente a própolis verde na concentração de 1,5g/kg (Tabela 5).

Já na uniformidade em peso do lote observou-se resultados controversos com a adição isolada ou conjunta das própolis verde e vermelha, sendo que a adição crescente de cada uma das própolis, isoladamente, proporciona uma redução da uniformidade. Porém, a alimentação conjunta com 3,0 g/kg de própolis verde e vermelha promoveu a maior uniformidade do lote (Tabela 5).

Tabela 5. Interação estatística entre própolis verde e vermelha para fator de condição de Fulton e uniformidade em peso dos peixes alimentados após 30 dias.

midade em peso dos peixes alimentados após 30 dias:					
Fator de condição Fulton					
Verde					Valor de p
	0.0 g	1.5 g	3.0 g		
Vermelha	0.0 g	1.78±00.03Aa	1.60±00.06Bb	1.70±00.60Aab	0.01945
	1.5 g	1.66±00.06Ba	1.64±00.04Ba	1.68±00.07Aa	
	3.0 g	1.68±00.07Ba	1.77±00.03Aa	1.71±00.06Aa	
Uniformidade					
Verde					Valor de p
	0.0 g	1.5 g	3.0 g		
Vermelha	0.0 g	41.24±04.98Aa	42.77±05.29Aa	28.84±10.89Cb	0.01932
	1.5 g	41.88±07.08Aa	45.21±04.97Aa	41.78±05.83Ba	
	3.0 g	38.76±02.67Ab	35.79±01.85Bb	50.37±02.43Aa	

Diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05)

Os resultados de desempenho aos 60 dias do ensaio in vivo com a suplementação dos extratos das própolis verde e vermelha com a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* são apresentados na tabela 6. Não houve interação entre a própolis vermelha e verde ao final de 60 dias de suplementação dietética. No entanto, a alimentação somente com própolis vermelha em níveis crescentes causou perda de desempenho zootécnico com redução do ganho em comprimento, ganho de peso, ganho de biomassa e piora na conversão alimentar aparente.

Tabela 6. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética com própolis após 60 dias.

	Própolis verde (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	5.96±0.32a	5.85±0.21a	5.76±0.24a
GPM	13.22±1.70a	12.88±0.99a	12.42±0.80a
GBM	555.01±61.25a	581.39±50.21a	536.89±69.85a
CAA	1.70±0.21a	1.62±0.15a	1.77±0.22a
TCE	2.02±0.15a	2.08±0.09a	2.01±0.06a
Kf	1.70±0.04a	1.70±0.04a	1.71±0.22a
UNI	41.27±11.59a	44.08±10.94a	38.37±8.07a
S	86.89±2.33a	90.44±4.19a	88.89±5.97 ^a
	Própolis vermelha (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	6.02±0.20a	5.79±0.16ab	5.66±0.19b
GPM	13.45±1.06a	12.67±0.46ab	12.02±0.81b
GBM	593.06±78.84a	522.00±23.87b	560.13±30.60b
CAA	1.53±0.13a	1.71±0.17b	1.67±0.08b
TCE	2.06±0.09a	2.04±0.07a	1.99±0.09a
Kf	1.68±0.03a	1.71±0.04a	1.72±0.06a
UNI	38.05±10.50a	42.43±10.19a	43.25±10.29a
S	90.67±5.81a	85.56±1.83a	90.01±3.53a

Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), GCT – ganho de comprimento total (cm), GCP – ganho de comprimento padrão (cm), GPM – ganho de peso médio (g), GBM – ganho de biomassa (g), CR- consumo de ração, CAA – conversão alimentar aparente, TCE – taxa de crescimento específico, S - sobrevivência.

Em relação ao consumo de ração, este apresentou interação estatística entre as própolis (verde e vermelha) após 60 dias de alimentação (tabela 7). Os níveis crescentes de própolis vermelha reduzem o consumo, enquanto o aumento da verde promove o contrário. No entanto, a mistura contendo 1,5g/Kg de cada própolis (verde e vermelha) não afetou o consumo de ração, mantendo-se similar ao controle.

Tabela 7. Interação estatística entre as própolis verde e vermelha para tilápias *Oreochromis niloticus* alimentadas por 60 dias.

Consumo de ração (g)					Valor de p
Vermelha					
	0,0 g	1,5 g	3,0 g		
Verde	0,0 g	891,00±8,02Ba	858,33±3,00Bb	778,33±9,50Bc	0.0001
	1,5 g	932,00±6,08Aa	884,33±7,51Ab	936,33±6,66Aa	
	3,0 g	936,33±6,66Aa	847,00±11,53Bb	932,67±5,51Aa	

Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (ANOVA-two way).

Os resultados de desempenho aos 90 dias do ensaio in vivo com a suplementação dos extratos das própolis verde e vermelha com a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* são apresentados na tabela 8, não apresentando interação estatística entre as própolis. Após 90 dias de experimento, a alimentação com níveis crescentes de própolis verde diminuiu o ganho de peso, apesar de um maior consumo de ração, mas mantiveram os demais fatores de desempenho zootécnico sem diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sem suplementação com própolis. Já a própolis vermelha apresentou um aumento no consumo de ração, mas isso não influenciou negativamente no ganho de peso, contrariamente ao que observado para própolis verde.

Tabela 8 - Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética com própolis após 90 dias.

	Própolis verde (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	7,54±0,50a	7,64±0,15a	7,46±0,30a
GPM	25,14±1,85a	24,55±1,55ab	24,10±1,01b
GBM	1112±134a	1104±100a	1098±132a
CR	1700±14b	1700±37b	1924±30a
CAA	1,50±0,21a	1,65±0,05a	1,68±0,14a
TCE	2,38±0,07a	2,53±0,05a	2,29±0,05a
Kf	1,70±0,05a	1,70±0,05a	1,71±0,06a
UNI	40,08±13,46a	40,27±11,15a	42,12±6,75a
S	86,67±5,24a	90,00±3,29a	88,89±5,97a
	Própolis vermelha (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	7,37±0,26a	7,51±0,23a	7,39±0,34a
GPM	24,89±1,55a	24,02±1,88a	24,00±1,71a
GBM	1134±150a	1098±112a	1077±127a
CR	1700±14b	1849±17a	1810±28a
CAA	1,56±0,18a	1,70±0,06a	1,70±0,13a
TCE	2,30±0,07a	2,57±0,06a	2,60±0,07a
Kf	1,68±0,05a	1,68±0,05a	1,67±0,07a
UNI	42,17±12,14a	41,25±12,33a	42,87±6,14a
S	90.67±5.81a	85.56±1.83a	90.01±3.53a

GC – Ganho em comprimento, GP – ganho em peso, GB – ganho em biomassa, CAA – conversão alimentar aparente, TCE – taxa de crescimento específico, Kf – fator de condição de Fulton, UNI – uniformidade, S - sobrevivência. Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05).

Os resultados de desempenho zootécnico aos 120 dias de ensaio in vivo com a suplementação dos extratos das própolis verde e vermelha com a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* são apresentados na tabela 9. O padrão observado aos 90 dias se repetiu aos 120 dias para a própolis verde, em que a inclusão de própolis verde reduziu o ganho de peso (tabela 9), mas não afetou os demais parâmetros. Com a própolis vermelha não houve alteração do desempenho zootécnico após 120 dias de alimentação independente da concentração de própolis vermelha utilizada (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética com própolis após 120 dias.

	Própolis verde (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	8,97±0,32a	8,84±0,11a	8,76±0,20a
GPM	38,18±2,82a	36,57±1,70ab	35,23±2,04b
GBM	1644±120a	1644±52,67a	1507±241a
CR	2511,67±3,06a	2500,67±2,08a	2495,00±3,00a
CAA	1,53±0,11a	1,52±0,05a	1,71±0,30a
TCE	2,97±0,06a	2,93±0,03a	2,90±0,04a
Kf	1,70±0,05a	1,68±0,05a	1,75±0,07a
UNI	45,12±09,50a	42,13±11,04a	39,11±7,45a
S	86,67±5,24a	90,00±3,29a	85,33±9,56a
	Própolis vermelha (g/Kg)		
	0,0	1,5	3,0
GC	8,97±0,32a	8,61±0,39a	8,76±0,57a
GPM	38,07±2,82a	36,17±4,33a	39,77±4,52a
GBM	1644±120a	1560±143a	1622±151a
CR	2511,67±3,06a	2498,67±4,93a	2498,67±19,01a
CAA	1,53±0,12a	1,62±0,15a	1,55±0,15a
TCE	2,97±0,06a	2,92±0,10a	3,00±0,09a
Kf	1,70±0,06a	1,69±0,05a	1,70±0,04a
UNI	44,01±10,12a	45,48±15,01a	38,11±8,88a
S	86,67±5,24a	86,67±2,50a	82,00±1,63a

GC – Ganho em comprimento, GP – ganho em peso, GB – ganho em biomassa, CAA – conversão alimentar aparente, TCE – taxa de crescimento específico, Kf – fator de condição de Fulton, UNI – uniformidade, S - sobrevivência. Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05).

Houve efeito de interação entre as própolis, apresentando diferença significativa, na concentração de glicose e triglicerídeos. A inclusão da própolis vermelha isoladamente provocou uma redução glicêmica de 37,44 g/dL para 27,56 g/dL, porém esse efeito foi atenuado quando as duas própolis foram inseridas em conjunto na dieta (Tabela 10).

Quanto aos triglicerídeos, observou-se que a inclusão de própolis verde provocou uma dislipidemia de 127 g/dL para 81,00 g/dL. A inclusão de 3 g/kg própolis vermelha em conjunto com 3 g/kg de própolis verde ocasionou o aumento de 92,33 g/dL para 123,00 g/dL desse parâmetro (Tabela 10). Nas concentrações de hemoglobina, proteínas totais, colesterol e

parâmetros eritrocitários não apresentaram interação e nem diferença estatística (Tabelas 11 e 12).

Tabela 10. Valores de glicose e triglicerídeo (g/dL) em tilápias submetidos a suplementação dietética com própolis.

Glicose				
		Própolis vermelha (g)		
		0,0	1,5	3,0
Própolis verde (g)	0,0	37,44±1,98Aa	28,44±0,31Ab	27,56±4,23Ab
	1,5	30,00±1,44Ba	33,11±0,16Aa	30,56±1,37Aa
	3,0	27,11±2,00Ba	28,33±3,27Aa	29,33±1,41Aa
Triglicerídeo				
		Própolis vermelha (g)		
		0,0	1,5	3,0
Própolis verde (g)	0,0	127,00±11,22Aa	130,33±8,57Aa	92,33±3,68Aa
	1,5	81,67±4,92Ba	109,33±3,85Aa	82,00±8,83Aa
	3,0	81,00±2,45Ba	116,00±8,84Aa	123,00±34,24Aa

Diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0.05)

Tabela 11. Parâmetros bioquímicos sanguíneos da tilápia submetida a dieta contendo própolis por 120 dias.

	Própolis verde (g)			Própolis vermelha (g)		
	0,0	1,5	3,0	0,0	1,5	3,0
Hg	15,32±1,31	16,89±2,00	14,38±1,37	15,32±1,31	12,69±1,24	13,80±1,41
PPT	5,40±0,09	5,74±0,86	5,42±0,06	5,40±0,09	5,68±0,06	5,37±0,32
CHOL	179,67±2,88	163,67±3,48	162,00±4,72	179,67±2,88	135,22±12,73	157,78±22,15

Hg – hemoglobina (g/dL), PPT – proteína plasmática total (g/dL), CHOL – colesterol (g/dL).

Tabela 12. Parâmetros eritrocitários sanguíneos da tilápia submetida a dieta contendo própolis por 120 dias.

	Própolis verde (g)			Própolis vermelha (g)		
	0,0	1,5	3,0	0,0	1,5	3,0
Er	2,53±0,35	2,17±0,22	2,51±0,24	2,53±0,35	2,17±0,29	2,47±0,39
Ht	41,11±1,37	45,00±1,19	49,00±0,82	41,11±1,37	40,22±2,57	46,89±5,59
VCM	0,81±0,20	1,03±0,26	0,98±0,17	0,81±0,20	0,92±0,44	0,95±0,72
HCM	0,30±0,16	0,39±0,34	0,29±0,28	0,30±0,16	0,29±0,21	0,28±0,18
CHCM	37,27±2,94	37,54±5,18	29,34±2,86	37,27±2,94	31,56±5,28	29,43±1,11

Er – eritrócitos (cel x 10⁶), Ht – hematócrito (%), VCM – volume corpuscular médio (fL), HCM - hemoglobina corpuscular média (pg), CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média (%).

No trombograma e leucograma, observou-se que a inclusão apenas de própolis verde na dieta, proporcionou redução do número de trombócitos de 0,48 para 0,12 x 10⁴ cel/μL, aumento no número de leucócitos de 3,77 para 9,37 (10⁴ cel/μL) e aumento de linfócitos de 0,85 para 1,87 (10⁴ cel/μL). A adição apenas de própolis vermelha na dieta também diminuiu a quantidade de trombócitos de 0,48 para 0,18 (10⁴ cel/μL), enquanto os leucócitos e os linfócitos, aumentaram de 3,77 para 8,9 e 0,85 para 1,50 (10⁴ cel/μL), respectivamente. Porém, quando as duas própolis foram inseridas em conjunto na dieta na proporção (1,5 g de própolis verde com 1,5 g de própolis vermelha, ou 3,0 g de própolis verde com 3,0 g de própolis vermelha) o resultado foi um aumento de leucócitos e linfócitos em relação aos demais tratamentos.

Os neutrófilos sofreram alteração significativa (p<0,05) para alimentação conjunta das própolis, com os maiores valores de neutrófilos observados nas concentrações de 1,5g/kg de própolis verde e vermelha (1,63 x 10⁴ cel/μL) e 3,0 g/kg de própolis vermelha e 1,5g/kg de própolis verde (1,53 x 10⁴ cel/μL) (Tabela 13).

Tabela 13. Valores de trombócitos e leucócitos totais de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas com diferentes níveis de própolis verde e vermelha durante 120 dias.

	VERMELHA 0,0 g/kg	VERMELHA 1,5 g/kg	VERMELHA 3,0 g/kg
Trombócitos (10^5 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,48 $\pm$ 0,21Aa	0,18 $\pm$ 0,05Ab	0,20 $\pm$ 0,06Ab
VERDE 1,5 g/kg	0,22 $\pm$ 0,02Ba	0,22 $\pm$ 0,02Aa	0,11 $\pm$ 0,02Bb
VERDE 3,0 g/kg	0,12 $\pm$ 0,01Cb	0,10 $\pm$ 0,01Bb	0,15 $\pm$ 0,02Ba
Leucócitos (10^6 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,38 $\pm$ 0,89Bb	0,36 $\pm$ 0,96Bb	0,89 $\pm$ 1,67Ba
VERDE 1,5 g/kg	0,44 $\pm$ 0,99Bc	1,00 $\pm$ 0,48Ab	1,55 $\pm$ 1,16Aa
VERDE 3,0 g/kg	0,94 $\pm$ 1,46Aa	1,14 $\pm$ 2,69Aa	0,53 $\pm$ 1,09Bb
Linfócitos (10^5 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,85 $\pm$ 0,46Bb	1,50 $\pm$ 0,35Ba	1,60 $\pm$ 0,12Ba
VERDE 1,5 g/kg	1,64 $\pm$ 0,17Aa	1,99 $\pm$ 0,15Aa	1,80 $\pm$ 0,75ABa
VERDE 3,0 g/kg	1,87 $\pm$ 0,31Aa	1,46 $\pm$ 0,75Aba	2,17 $\pm$ 0,21Aa
Neutrófilo (10^4 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,36 $\pm$ 0,05Ba	0,31 $\pm$ 0,23Ba	0,76 $\pm$ 0,69Aa
VERDE 1,5 g/kg	2,32 $\pm$ 0,20Aa	1,63 $\pm$ 0,65Aa	1,53 $\pm$ 0,73Aa
VERDE 3,0 g/kg	0,24 $\pm$ 0,08Bb	0,56 $\pm$ 0,47Ba	0,35 $\pm$ 0,22Bab

Diferentes letras maiúsculas nas colunas (própolis vermelha) e minúsculas nas linhas (própolis verde) indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Ao final do experimento, de acordo com a análise histológica do fígado das tilápias, os animais suplementados apenas com própolis vermelha (1,5 e 3,0 g/Kg) apresentaram áreas de congestão (Figura 13A; 13B; Tabela 14), sendo que o tratamento com 3,0 g/kg de própolis vermelha apresentou o maior grau de severidade.

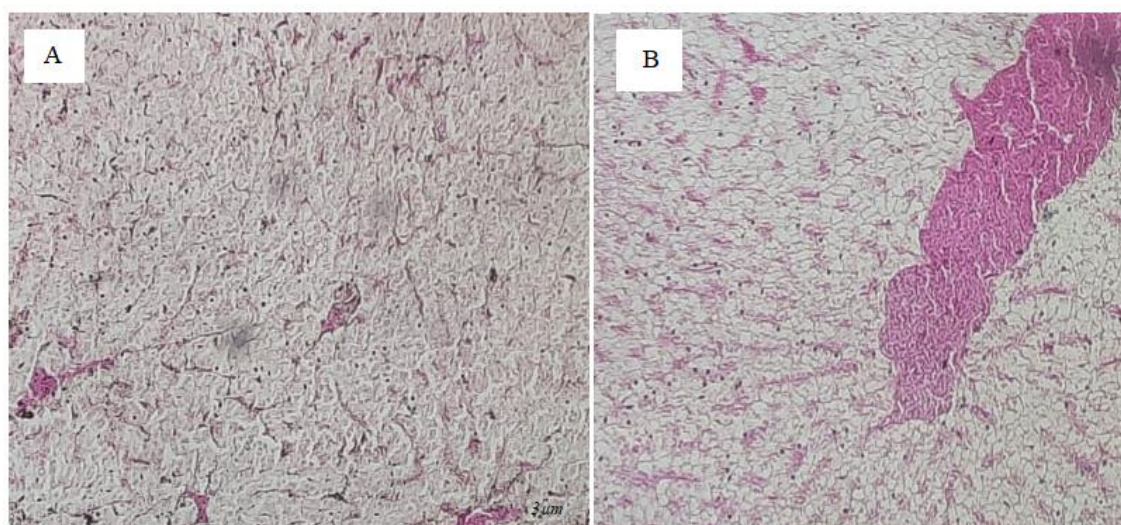


Figura 13. Fotomicrografia hepática de juvenis de tilápias *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética contendo própolis verde e vermelha. Foto A – Fígado com sinal clínico leve de congestão (T1- 1,5 g/Kg de própolis vermelha); Foto B – Fígado com sinal clínico grave de congestão (3,0 g/Kg de própolis vermelha).

Tabela 14. Patologias observadas no tecido hepático dos peixes suplementados com diferentes concentrações de própolis verde e vermelha de acordo com metodologias adaptadas de Fishbien et al. (2015) e Zhang et al. (2018).

Patologias	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Desarranjo cordonal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Congestão	-	+	+++	-	-	-	-	-	-
Picnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vacuolização	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) sem sinal clínico, (+) sinal clínico leve, (++) sinal clínico moderado, (+++) sinal clínico grave.

Para o desafio experimental com a bactéria patogênica, observou-se que os peixes que não receberam a suplementação apresentaram mortalidade de 100%. A adição de própolis independentemente da concentração promoveu maior sobrevivência dos peixes em comparação ao grupo controle. Mas observou-se que a menor mortalidade acumulada (27,78%) ocorreu nos peixes suplementados com a própolis vermelha na proporção de 1,5 g/kg de ração (Figura 14).

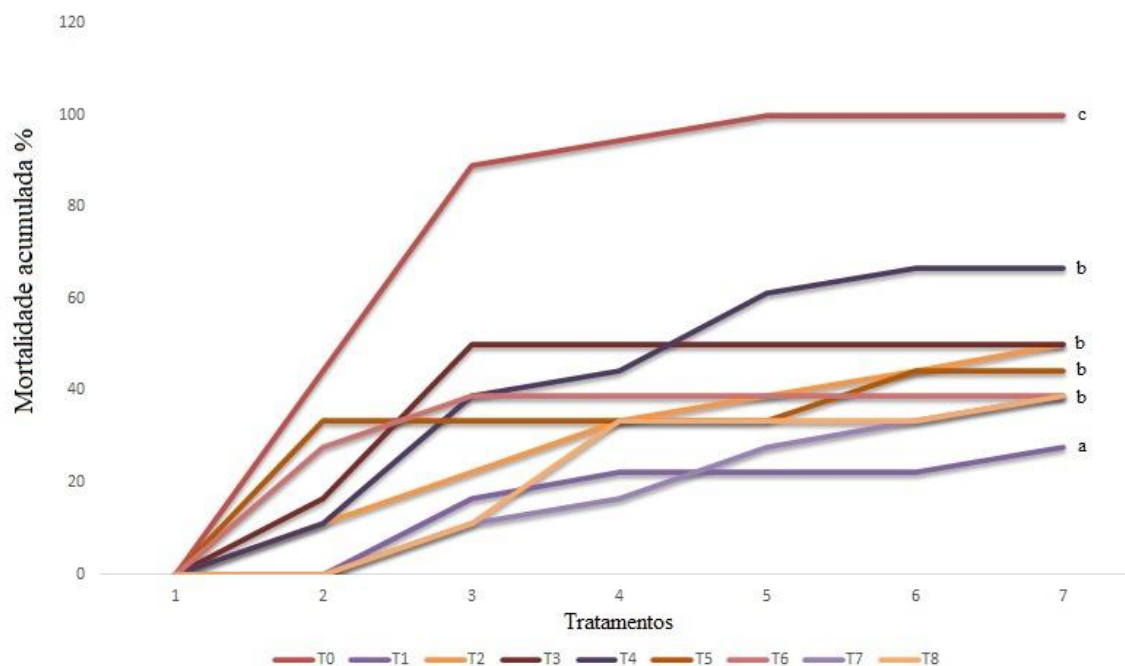


Figura 14. Mortalidade acumulada de tilápias submetidas a desafio agudo ao final de 96 horas com a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*. Legenda: T1 (0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T2 (0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T3 (1,5 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T4 (1,5 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T5 (1,5 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha); T6 (3,0 g de própolis verde + 0 g de própolis vermelha); T7 (3,0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha); T8 (3,0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha).

Ao final do desafio, apenas leucócitos, linfócitos e neutrófilos apresentaram interação estatística entre as própolis (Tabela 15). Os leucócitos totais e neutrófilos aumentaram em relação ao controle para a alimentação contendo própolis. Para os leucócitos totais os maiores valores foram observados para alimentação conjunta de propolis vermelha e verde nas concentrações de 3,0 g/kg de propolis verde e vermelha ($16,13 \times 10^6$ cel/ μ L), 1,5 g/kg de própolis verde e vermelha ($15,97 \times 10^6$ cel/ μ L). Já para os neutrófilos, os maiores valores foram observados na alimentação isolada com 3,0 g/kg de própolis verde ($0,72 \times 10^5$ cel/ μ L) e na alimentação conjunta com 3,0 g/kg da vermelha e própolis verde.

Resultado oposto foi observado para linfócitos, com redução de seus valores com a adição da própolis. As maiores reduções foram observadas nos animais alimentados com o maior nível de própolis vermelha independente da concentração da própolis verde, e com a alimentação isolada de 1,5g/kg de propolis verde (Tabela 15).

Tabela 15. Valores de leucócitos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* desafiados por *Streptococcus agalactiae*.

	VERMELHA 0,0 g/kg	VERMELHA 1,5 g/kg	VERMELHA 3,0 g/kg
Leucócitos totais (10^6 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,61 $\pm$ 0,17Ba	0,78 $\pm$ 0,74Ba	0,51 $\pm$ 0,01Ba
VERDE 1,5 g/kg	1,55 $\pm$ 2,45Aa	1,58 $\pm$ 0,12Aa	1,36 $\pm$ 0,01Aa
VERDE 3,0 g/kg	1,38 $\pm$ 0,29Ab	1,07 $\pm$ 0,08Ab	1,61 $\pm$ 0,19Aa
Linfócitos (10^5 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	1,62 $\pm$ 0,24Aa	0,74 $\pm$ 0,06Ab	0,84 $\pm$ 0,04Ab
VERDE 1,5 g/kg	0,57 $\pm$ 0,10Bb	0,76 $\pm$ 0,05Aa	0,64 $\pm$ 0,05Bb
VERDE 3,0 g/kg	0,70 $\pm$ 0,08Ba	0,83 $\pm$ 0,05Aa	0,66 $\pm$ 0,04Bb
Neutrófilos (10^5 cel/ μ L)			
VERDE 0,0 g/kg	0,28 $\pm$ 0,07Cb	0,60 $\pm$ 0,16Aa	0,33 $\pm$ 0,11Bb
VERDE 1,5 g/kg	0,52 $\pm$ 0,05Ba	0,45 $\pm$ 0,05Aa	0,60 $\pm$ 0,13Aa
VERDE 3,0 g/kg	0,72 $\pm$ 0,11Aa	0,23 $\pm$ 0,08Bb	0,60 $\pm$ 0,11Aa

Diferentes letras maiúsculas nas colunas (própolis vermelha) e minúsculas nas linhas (própolis verde) indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Durante o desafio com *Streptococcus agalactiae*, os peixes suplementados apenas com própolis verde não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de trombócitos, monócitos e basófilos (Tabela 16). Contudo, foi observado uma diminuição do número de trombócitos quando se utilizou 3,0 g de própolis vermelha isolada na ração.

Tabela 16. Valores de leucócitos de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* desafiados por *Streptococcus agalactiae*.

	VERDE (g/kg)			VERMELHA (g/kg)		
	0,0	1,5	3,0	0,0	1,5	3,0
Trom	3,53±1,09a	3,48±1,34a	3,60±1,20a	3,54±0,46a	4,59±0,77a	2,49±0,73b
Mon	4,32±1,24a	3,58±1,06a	5,29±3,77a	5,15±0,97a	3,94±0,55a	3,88±1,54a
Bas	0,63±0,60a	0,29±0,22a	0,66±0,73a	0,44±0,36a	0,38±0,27a	1,06±0,77a

Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Trom- trombócitos 10^5 cel/ μ L; Mon- monócitos 10^5 cel/ μ L; Bas- basófilo 10^5 cel/ μ L

O resultado da análise antioxidante do músculo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* durante o desafio com *Streptococcus agalactiae* está apresentada na figura 15, sendo que uma maior atividade antioxidante foi observada nos tratamentos T7 (3,0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha) e T8 (3,0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha). Os tratamentos T1 (0 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha), T2 (0 g de própolis verde + 3,0 g de própolis vermelha) e T4 (1,5 g de própolis verde + 1,5 g de própolis vermelha) apresentaram atividade antioxidante igual ao controle.

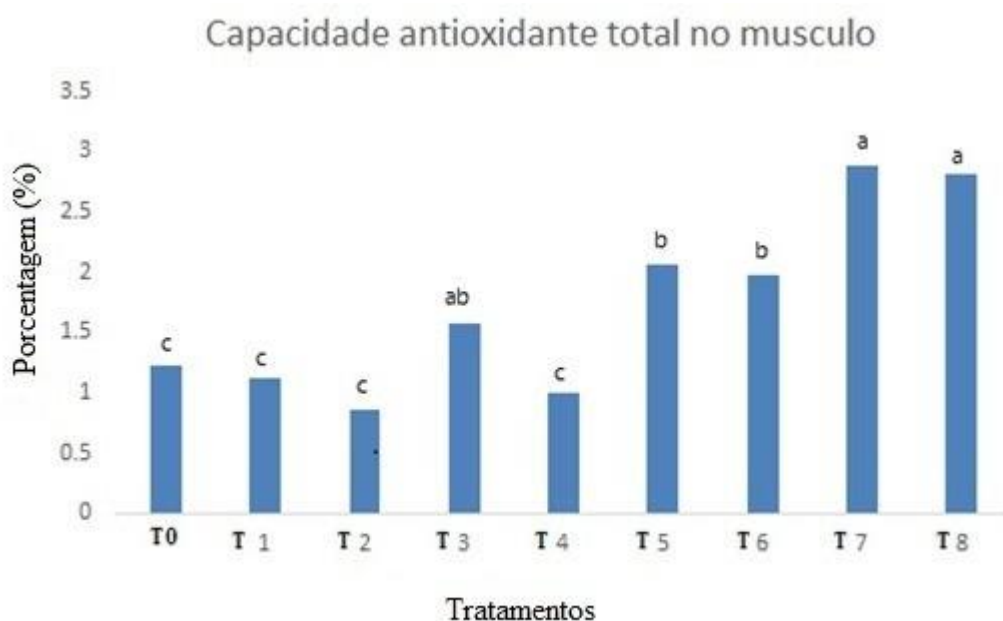


Figura 15. Capacidade antioxidante total do músculo da tilápia durante o desafio agudo (96 horas) com a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos sobre a obtenção de extratos de própolis vêm sendo realizado a fim de otimizar cada vez mais a extração dos compostos ativos. No presente estudo, o rendimento do extrato hidroalcolólico de própolis verde foi superior (54,29%) ao da vermelha (22,44%) e maior que os valores obtidos por Cavalcante et al. (2011), Saito et al. (2020) e Silva et al. (2021) que apresentaram rendimento de extratos alcoólicos de propolis de 41,43%, 36,8% e 53,5%, respectivamente com processos de maceração simples, e proporção propolis:alcohol semelhante ao presente trabalho (1,09:12,5 (m/v)).

Assim como o extrato de própolis verde, o extrato de própolis vermelha (22,44%) obteve rendimento maior que Santos (2018), Prata (2018) e Filho (2019), utilizando a mesma metodologia (16,9%, 17,46% e 17,46%, respectivamente). As diferenças no rendimento de extração estão relacionadas a diversos fatores como o solvente extrator, metodologia de extração, época de colheita, espécies de abelhas (no caso do Brasil, incluindo também o grau de “africanização” com *Apis mellifera*) e flora regional (SALATINO et al., 2005; PICCINELLI et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2019). De acordo com Costa (2020), a cera contida na propolis também é um fator que influencia diretamente tanto no rendimento do extrato quanto na quantidade de componentes extraídos.

No presente estudo, a análise química dos extratos mostrou que os dois tipos de própolis apresentaram perfis químicos distintos e ao comparar os picos obtidos com os padrões químicos (Figura 08 – A) foi possível observar que o extrato de própolis verde não apresentou os flavonóides apigenina e biochanina A (Figura 08 – B). Isso decorre do fato de que os principais constituintes da própolis verde são ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, naringerina, caempferol, isormnetina, sakurametina, pinocembrina, caempferina e artepellina C (SHIMIZU et al., 2011; SZLISZKA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2020; MOISE et al., 2020; XU et al., 2020). No entanto, esses padrões dos marcadores para própolis verde não foram possíveis de adquirir, o que impediu a identificação desses compostos, mas comparando os cromatogramas já publicados (Veiga et al., 2017; Andrade et al., 2017; Xu et al., 2020), os picos nos tempos de retenção de 20 min a 36 min, poderiam corresponder a esses compostos.

A formononetina foi o principal composto químico identificado no extrato de própolis vermelha (Figura 08- C), seguido de outros dois compostos não identificados, mas que quando comparados os cromatogramas encontrados no presente trabalho com o perfil cromatográfico desenvolvido por Aldana-Mejía et al. (2021) com metodologia semelhante, pode-se inferir que provavelmente sejam a isoliquiritigenina e vestitol. Este resultado é similar aos encontrados por

Machado et al. (2016) e Mendonça et al. (2015) em extratos etanólicos de própolis vermelha provenientes do nordeste brasileiro apontando formononetina como componente químico majoritário.

O outro composto identificado no extrato da própolis vermelha foi a biochanina A, que junto com a formononetina são considerados biomarcadores da própolis vermelha (HANSKI et al., 2014; KONG et al., 2015; GAUR et al., 2016; RUFATTO et al., 2018; CCANA-CCAPATINTA et al., 2020).

Nota-se que a não presença da biochanina A na propolis verde, e apigenina nas propolis verde e vermelha, podem ser decorrentes de fatores como época do ano, localização, solvente utilizado (LUSTOSA et al., 2008). Contudo, essa diferença no perfil químicos dos extratos das propolis verde e vermelha afetaram de forma diferente nos ensaios in vitro e in vivo.

A redução na utilização de antimicrobianos em sistemas de cultivo intensivos de produção de peixes é importante, pois o uso indiscriminado pode gerar o surgimento de microorganismos resistentes aos medicamentos e deixar resíduos de antibióticos nos peixes e no meio ambiente (ESIOBU et al., 2002; BELEM-COSTA & CYRINO, 2006). No presente estudo, os extratos de própolis verde e vermelha demonstraram atividade antimicrobiana in vitro satisfatórias e promissoras. Dentre as diversas propriedades da própolis, tem se destacado sua ação antibacteriana (ORSI et al., 2012; BITTENCOURT 2008; ALDEMAN, 2005; SILICI et al., 2000), antifúngica (PONTIN et al. 2008) e antiprotozoária (ORSI et al., 2012; SZLISZKA et al., 2011), as quais foram verificadas no presente experimento. Segundo Park et. al. (2002), estas propriedades da própolis, estão relacionadas à sua composição química.

Apesar de não possuir formononetina, nem biochanina A em sua composição, o extrato de própolis verde foi mais eficiente contra o fungo *Saprolegnia parasitica*. Um dos constituintes da própolis verde, já identificados como um antifúngico muito eficiente é a pinocembrina, que segundo estudos foi comprovado a eficiência no controle de doenças causadas por fungos filamentosos ou leveduras (SAWAYA et al., 2002; SILICI; KOC, 2006). Quando comparado com a literatura, os picos do cromatograma da propolis verde no presente estudo, nos tempos de retenção nos minutos 19 e 21 poderiam corresponder a pinocembrina 5-metil-eter (GARDANA et al., 2007) e pinocembrina (AFROUZAN et al. 2018) respectivamente, que explicariam o efeito fungicida encontrado com esse extrato.

Nos ensaios com as bactérias, foi observado que o extrato de própolis vermelha, foi mais eficiente para *Aeromonas hydrophila*, enquanto que o extrato verde foi melhor para *Streptococcus agalactiae*. Foi identificado e quantificado nos extratos de própolis verde e vermelha, a formononetina nas concentrações de 74,55µg/mL e 213,23 µg/mL, respectivamente. Este

componente isoflavonoide (formononetina) é comumente citado na literatura científica por seus efeitos antifúngicos (NEVES et al., 2016), antibacteriano (KONG et al., 2015) e antiprotozoário (KHAN et al., 2000). A atividade antibacteriana dos flavonóides decorre da ação inibitória da enzima DNA topoisomerase, que interfere na replicação de DNA, e consequentemente na expressão e recombinação de genes (WANG et al., 2010).

Krol et al. (1993) também sugerem que a atividade antibacteriana da própolis é decorrente do efeito sinérgico de várias substâncias presentes no extrato. A maior eficácia do extrato de propolis vermelha sobre a bactéria *A. hydrophila* estaria relacionada a um possível sinergismo entre a formononetina e a biochanina A, já que o extrato de própolis verde possui apenas formononetina e não apresentou melhores efeitos que a propolis vermelha sobre essa bactéria gram negativa, demonstrando assim esse efeito sinérgico.

A própolis vermelha apesar de apresentar menor efeito do que a propolis verde sobre a bactéria *Streptococcus agalactiae*, apresentou um efeito bacteriostático até a concentração de 0,097 mg.ml⁻¹. O melhor efeito da propolis verde sobre essa bactéria gram positiva pode ser devido a presença dos compostos não identificados (tempos de retenção maiores) que estão presentes nessa propolis e não na vermelha.

Tal efeito converge para a maioria dos relatos científicos que apontam atividade antibacteriana da própolis em bactérias gram positivas (SILICI; KUTLUCA, 2005; SEIDEL et al., 2008; ORSI et al., 2012), com ação mais limitada contra as bactérias gram negativas (VARGAS et al., 2004; FERNANDES JR et al., 2006; SFORCIN, 2009), sendo então esse efeito do extrato da propolis vermelha sobre a bactéria gram negativa *A. hydrophila* um importante fato a ser destacado.

Em relação aos protozoários, o eficiente efeito da própolis para o controle de protozoários já foi reportado na literatura (FREITAS et al., 2006; SHAABAN et al., 2020). Os componentes flavonoides atuam nesses protozoários causando ruptura da membrana celular e desregulação osmótica, resultando na morte do parasita. A própolis vermelha foi mais eficiente contra o parasita nesse estudo possivelmente por sua maior concentração de formononetina. De acordo com Mutai et al. 2017, a formononetina é uma substância efetiva para o controle de protozoários. Destaca-se que para o parasita de peixe *Ichthyophthirius multifiliis*, os resultados do presente estudo são os primeiros relatos com a própolis vermelha.

Em relação ao desempenho, observou-se que a mudança de ração sugerida pelo fabricante, dos 30 a 60 dias de alimentação, influenciou negativamente o efeito das própolis sobre o desempenho dos peixes. A própolis vermelha promoveu uma redução de palatabilidade na ração nessa fase de crescimento, reduzindo o consumo de ração, e consequentemente o

desempenho. Segundo Pereira-da-Silva & Pezzato (2000), o paladar é apontado como o encarregado pela seleção final, determinando o consumo ou a negação de um alimento, ou até mesmo limitando a quantidade a ser ingerida.

O inverso foi observado com a própolis verde, onde foi observado um aumento do consumo de ração, que possibilitou a manutenção do desempenho nesse período inicial de até 60 dias. Alguns flavonoides podem apresentar o efeito de estimulante alimentar, a exemplo da Caempferina (Van Loon et al., 2002; Panche et al., 2016) o que provavelmente explicaria o maior consumo alimentar dos peixes no presente estudo para a própolis verde.

Com a última troca de ração a partir de 90 dias, não foi observado efeito sobre o consumo de ração demonstrando que o possível efeito sobre a palatabilidade pode ser decorrente da formulação da ração e de cada fase de vida dos peixes. A partir desse período de alimentação de 90 dias, observou-se uma redução de ganho de peso nos animais alimentados com a própolis verde em qualquer concentração avaliada.

Essa redução de desempenho já foi observada por Orsi (2012), que trabalhou com pó de própolis bruta adicionada na ração. No seu estudo ele observou que o crescimento da tilápia foi inversamente proporcional a concentração de própolis. Meurer et al., (2009), também observou redução no ganho de peso e na taxa de conversão alimentar em tilápias com concentração de própolis marrom de 3,65 g/kg de ração. A presença de cera em sua composição foi o fator determinante no desempenho, pois dificulta a ação de enzimas digestivas (SANTOS et al., 2003), porém, neste estudo, esse fato pode ser descartado pois foi utilizado o extrato etanólico, e a cera foi retirada no processo de filtração. O efeito da própolis verde sobre o desempenho precisa ser melhor estudado, para elucidar a causa da redução do ganho de peso.

Ao contrário dos resultados observados neste estudo para própolis verde, tilápias alimentadas com dietas de 10g de extrato etanólico por kg de ração, mostraram aumento de desempenho no estudo de Azza-El-Rhman (2009), que sugerem que pode haver diferença na forma de processar a própolis, bem como diferença na composição química das própolis estudadas, ou mesmo a quantidade de própolis utilizada no presente trabalho que foi menor que a relatada na literatura.

A diferença na composição química é consequência direta do período de coleta da resina, da diversidade ecológica da flora, da sazonalidade e até mesmo da variabilidade genética das abelhas (LUSTOSA et al., 2008). Essas variáveis justificariam essas diferenças entre vários trabalhos descritos na literatura, porém poucos apresentam a composição química para possível comparação e discussão sobre qual(is) composto(s) mais influencia(m) no desempenho dos animais.

Apesar da controvérsia quanto aos efeitos positivos e negativos sobre o desempenho, observou-se que a adição de própolis reduz a glicemia e os triglicerídeos sanguíneos, o que pode estar influenciando no metabolismo energético, impedindo um aumento de desempenho produtivo. Na literatura científica já foi reportado que a formononetina promove a redução de glicose em peixes (DUTRA et al., 2021; OZA et al 2018). Essa redução ocorreu neste estudo tanto para os peixes que receberam alimento contendo própolis vermelha quanto verde. Segvic-Bubic et al. (2013) também encontraram este mesmo resultado com redução dos valores de glicose para Sea Bass europeu (*Dicentrarchus labrax*) com dietas contendo própolis verde.

Outro fator que se deve levar em consideração é o fato do peixe estar utilizando a glicose plasmática, reduzindo seus valores no sangue. Foi observado em ratos um efeito antidiabético ocasionado pela biochanina A, pela melhora da expressão da visfatina que é uma proteína com efeito semelhante a insulina (SUNDARESAN et al., 2018). Mesmo apresentando uma pequena quantidade ($7,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$), seu efeito pode ter sido potencializado com o acréscimo da formononetina. Oza et al. (2019), trabalhando com ratos diabéticos tipo 2, observou que a formononetina reduziu os valores de triglicerídeos e glicemia durante os seus experimentos. Esse efeito causado pela formononetina e pela biochanina A poderiam explicar as reduções desses dois parâmetros no presente estudo, mas novos estudos seriam necessários para elucidar o efeito que cada propolis produz nesse metabolismo energético e que resultou em diferenças no desempenho.

Pelo eritrograma, apesar da pequena redução no ganho de peso, foi possível observar que os extratos de própolis não causaram prejuízos hemodinâmicos para os peixes durante o experimento. Além disso, os resultados hematológicos para as dietas experimentais contendo as misturas das própolis nas proporções de 1,5 g (verde) e 1,5 g (vermelha) ou 3,0 g (verde) e 3,0 g (vermelha), apresentaram manutenção do perfil hematológico, o que pode sugerir possíveis efeitos benéficos. Com relação aos leucócitos e trombócitos, a adição de qualquer própolis na dieta diminuiu o número de trombócitos mas aumentou o número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos.

Suplementos dietéticos, como a própolis, podem estimular a ação de mecanismos de defesa inespecíficos e respostas imunológicas em peixes (SHAKYA et al., 2017). El-Asely et al. (2014), observaram em seu estudo que a suplementação com própolis na dieta da tilápia do Nilo, mostrou efeito positivo sobre o sistema imune e parâmetros bioquímicos, resultando em proteção contra *Aeromonas hydrophyla*. Muzzolon (2018), afirmou no seu trabalho com pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que 1,5 % de própolis na dieta por 60 dias, pode trazer benefícios para a saúde dos animais, sem comprometer os parâmetros bioquímicos sanguíneos. Dotta et al. (2015),

misturaram extratos de própolis com *A. barbadensis*, na proporção de 0,5 % e 1,0 %, respectivamente, na suplementação dietética da tilápia por 15 dias e obtiveram redução do número de parasitas das brânquias sem alterar o quadro hematológico, porém, acima de 21 dias, essa dieta influenciou negativamente os resultados. Possivelmente devido ao estresse do manejo e/ou acúmulo de produtos residuais.

No ensaio de desafio com a bactéria *Streptococcus agalactiae*, foi observado uma taxa de mortalidade de 27,78 % no tratamento T1 (1,5 g de própolis vermelha). Esses resultados mostraram que, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da própolis vermelha, melhoram a saúde dos peixes. A presença dos flavonóides (formononetina e biochanina A) na dieta dos peixes na proporção de 5,83 µg/g e 0,82 µg/g, respectivamente, ocasionou uma imunoproteção ao desafio com o patógeno do peixe. De La Cruz Cervantes et al. (2018) afirmaram que mesmo em doses baixas, os extratos de própolis melhoram a resistência a doenças, melhorando a saúde de algumas espécies de peixes, caracterizando-a como um aditivo funcional natural.

Trabalhos anteriores mostraram também que essa imunomodulação não necessariamente está ligada somente ao aumento no número de células de defesa, como observado no presente trabalho, mas sim a eficiência do sistema imunológico em enfrentar o patógeno, sendo já reportado aumento da atividade lisozimática e a melhora da capacidade fagocítica dos leucócitos (ABD-EL-RHAM et al., 2009; TALAS et al., 2009; TUKMECHI et al., 2014). Células como neutrófilo e monócitos, são as principais células de defesa do sistema inato, e atuam diretamente na fagocitose de corpos invasores (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Assim tanto o aumento na quantidade de neutrófilos no sangue dos peixes desse estudo, como a hipótese de melhora de efetividade dessas células corroborariam com os resultados do desafio que mostraram melhor resistência à infecção por bactéria patogênica nos animais alimentados com própolis.

Essa resistência a infecção bacteriana também poderia ser atribuída ao potencial antioxidante das própolis, capaz de promover proteção a células fagocitárias como o neutrófilo durante a liberação de radicais livres para inativação dos patógenos. A própolis atua eliminando radicais livres, neutralizando as espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo a peroxidação lipídica (DE MENDONÇA et al., 2020). Tanto a própolis vermelha quanto a verde possuem compostos flavonoides (formononetina e Caempferina) com alta capacidade antioxidante (Zhao et al., 2016; Farag et al., 2021), fato este corroborado com os maiores níveis de capacidade antioxidante no músculo referente aos mais elevados níveis de própolis. Porém, os melhores resultados do desafio não foram obtidos nos peixes que apresentaram maior capacidade antioxidante muscular, o que reforça a ideia da melhora na eficiência fagocítica e atividade

lisoenzimática dos peixes. Porém, essa ação antioxidantes frente ao desafio à infecção deve ser melhor estudado em perspectivas futuras.

A exposição de peixes a compostos químicos pode induzir mudanças nos órgãos vitais desses organismos (ABDEL-KHALEK et al., 2020). A avaliação histológica de órgãos-alvo pode expressar diferentes mudanças decorrentes de condições ambientais. Essas análises podem identificar os órgãos mais afetados e a sensibilidade em relação à toxicidade (AMÉRICO-PINHEIRO, 2020). A avaliação histológica realizada no fígado das tilápias mostrou áreas de congestão quando se utilizou a dieta contendo apenas própolis vermelha. Na literatura já é citado que altas concentrações de própolis na alimentação podem apresentar efeitos tóxicos (FARAG et al., 2021). No entanto, com as misturas das própolis esse problema foi atenuado e durante o desafio houve redução da mortalidade com manutenção da integridade do fígado. Esse efeito hepato-protetor já é relatado para a própolis verde em ratos e relacionado ao seu composto pinocembrina (CHEN et al., 2008; ZHU et al., 2011).

Assim, a suplementação com a própolis vermelha mostrou, sem perda de desempenho, propriedades imunoestimulantes, que promoveram maior resistência a infecções, o que a torna uma possibilidade ambientalmente correta e fisiologicamente viável na suplementação em rações para a tilápia do Nilo. Estudos relacionados à viabilidade econômica de sua utilização na produção merecem ser futuramente abordados para determinar seu uso aplicado na cadeia produtiva. E o uso da própolis verde juntamente com a própolis vermelha pode ser uma opção para reduzir os efeitos causados no fígado advindos do uso da própolis vermelha.

7 CONCLUSÃO

As própolis verde e vermelha apresentaram efeitos antimicrobianos sobre os patógenos de peixes. Recomenda-se o uso de própolis vermelha na proporção 1,5 g/kg para promover o estímulo imunológico e maior resistência a infecção bacteriana sem afetar o desempenho zootécnico. O uso conjunto com 1,5 g/kg de propolis verde pode ser uma alternativa para mitigar o efeito deletério no fígado causado pela própolis vermelha, porém avaliação do custo deve ser considerada para tal aplicação.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente estudo foi possível observar que os extratos de própolis são compostos naturais, que podem ser utilizados contra patógenos de peixes, tendo como destaque a própolis vermelha, devido ao seu desempenho para as principais doenças que acometem os cultivos intensivos de peixes.

O uso de produtos químicos para combater enfermidades em cultivos de peixes é uma prática comum em diversos países, inclusive no Brasil. O uso da propolis como composto natural, se mostrou eficiente para permitir a substituição do uso de quimioterápicos pela aplicação da propolis na dieta de forma profilática, que reduziria a contaminação dos peixes e dos corpos de águas, além de evitar a seleção de patógenos resistentes.

A questão relevante para aplicação prática na cadeia produtiva é o custo da própolis. Estudos econômicos devem ser realizados para avaliar a viabilidade de uso, porém uma vez os custos sendo reduzidos pelo aumento de produção da propolis, o uso é indicado para a criação da tilápia em cativeiro.

Esse trabalho mostrou a possibilidade do uso da própolis, como um aditivo nutricional para tilápia do nilo, com possibilidades de expansão para outras espécies de peixes, ajudando a alavancar a aquicultura nacional, bem como a aquicultura mundial, com produtos naturais que permeiem o desenvolvimento sustentável da atividade.

9 REFERÊNCIAS

- ABBASS, A. A.; EL-ASELY, A. M.; KANDIEL, M. M. Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2012; 12(4), 851-859.
- 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*, 2009; 27(3), 454-459.
- ACAR, Ü. Effects of diet supplemented with ethanolic extract of propolis on growth performance, hematological and serum biochemical parameters and disease resistance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 2018; 495, 339-344.
- AHMED, I.; RESHI, Q. M.; FAZIO, F. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquaculture International*, 2020; 1-31.
- ALDANA-MEJÍA, J. A.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021; 198, 114029.
- ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020; 27(11), 3079.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 2017; 101, 129-138.
- ASSEFA, A.; ABUNNA, F. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*, 2018.
- BAE, J. Y.; PARK, G. H.; LEE, J. Y.; OKORIE, O. E.; BAI, S. C. Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel. *Anguilla japonica*. *Aquac. Int.*, 2012; 20(3): 513–523.
- BAILON-MOSCOSO, N.; CEVALLOS-SOLORZANO, G.; CARLOS ROMERO-BENAVIDES, J.; ISABEL RAMIREZ ORELLANA, M. Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies. *Current genomics*, 2017; 18(2), 106-131.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; ZEPPENFELD, C. C.; VELHO, M. C.; KLEIN, B.; ABBAD, L. B.; BALDISSEROTTO, B. Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. *Aquaculture*, 2020; 516, 734635.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 2005; 100(1-2), 114-117.

BARBOSA, V. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. *Biotechnology progress*, 2019, v. 35, n. 6, p. e 2888.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: 1976; EDART.

BONOMI, A.; BONOMI, B.; QUARANTELLI, A.; SABBIONI, A.; SUPERCHI, P. L'impiego della propoli nell'alimentazione delle anatre da carne. *Riv. Sci. Aliment.*, 2002; 31(1): 15–28.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

CALEGARI, M. A.; PRASNIEWSKI, A.; SILVA, C. D.; SADO, R. Y.; MAIA, F.; TONIAL, L.; OLDONI, T. L. Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2017; 89, 45-55.

CAVALCANTE, D. R. R.; OLIVEIRA, P. S. D.; GÓIS, S. M.; SOARES, A. F.; CARDOSO, J. C.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. D. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 2011; 77, 278-284.

CCANA-CCAPATINTA, G. V.; MEJÍA, J. A. A.; TANIMOTO, M. H.; GROPPPO, M.; CARVALHO, J. CASD.; BASTOS, J. K. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e *Symphonia globulifera* Lf: As fontes botânicas de isoflavonóides e benzofenonas na própolis vermelha brasileira. *Molecules*, 2020; 25 (9), 2060.

CHEN, C. S.; WU, C. H.; LAI, Y. C.; LEE, W. S.; CHEN, H. M.; CHEN, R. J.; WANG, Y. J. NF- κ B-activated tissue transglutaminase is involved in ethanol-induced hepatic injury and the possible role of propolis in preventing fibrogenesis. *Toxicology*, 2008; 246(2-3), 148-157.

CHEN, J.; GE, B.; WANG, Y.; YE, Y.; ZENG, S.; HUANG, Z. Biochanin A promotes proliferation that involves a feedback loop of microRNA-375 and estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015; 35(2), 639-646.

CHEN, W. F.; CHEN, C. H.; CHEN, N. F.; SUNG, C. S.; WEN, Z. H. Neuroprotective effects of direct intrathecal administration of granulocyte colony-stimulating factor in rats with spinal cord injury. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2015; 21(9), 698-707.

CHEN, Y. W.; YE, S. R.; TING, C.; YU, Y. H. Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *Journal of food and drug analysis*, 2018; 26(2), 761-768.

COOPER, R. A. Inhibition of biofilms by glucose oxidase, lactoperoxidase and guaiacol: the active antibacterial component in an enzyme alginogel. *International wound journal*, 2013; 10(6), 630-637.

CORRÊA, B. F.; STOHL, F. E.; ROBALDO, R. B.; PEREIRA, D. I. B. Efeito *in vitro* de químicos no crescimento micelial de *Saprolegnia* spp. *Ciência Rural*; 2013; 43(6):1021-1024.

COSTA, D. J. L. Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2020.

CRUZ, A. I. C.; DA CRUZ COSTA, M.; MAFRA, J. F.; FERREIRA, M. A.; MIRANDA, F. M.; COSTA, J. A.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. A sodium alginate bilayer coating incorporated with green propolis extract as a powerful tool to extend *Colossoma macropomum* fillet shelf-life. *Food Chemistry*, 2021; 355, 129610.

DA SILVA, Y. A.; DE ALMEIDA, V. V. S.; OLIVEIRA, A. C.; FONSECA, R. S.; DOS SANTOS, P.; DO SACRAMENTO RIBEIRO, J.; DE LIMA JÚNIOR, D. M. Can roughage: concentrate ratio affect the action of red propolis extract on sheep metabolism? *Tropical Animal Health and Production*, 2021; 53(5), 1-10.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*. 2007; 5(4):435-441.

DAWOOD, M. A.; ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-LATIF, H. M. Lycopene reduces the impacts of aquatic environmental pollutants and physical stressors in fish. *Reviews in Aquaculture*, 2020; 12(4), 2511-2526.

DAWOOD, M. A.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M. Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 2018; 10(4), 950-974.

DE ALMEIDA-JUNIOR, S.; PEREIRA, D. V.; FERREIRA, T. M.; DE FREITAS, R. A.; SILVA, C. C.; SANTOS, M. F. C.; FURTADO, R. A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of kaempferide from the Brazilian green propolis. *Research, Society and Development*, 2020; 9(10), e1259108232-e1259108232.

DE CASTRO NIZIO, D. A.; FUJIMOTO, R. Y.; MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F.; FRANÇA, C. C. S.; DA COSTA SOUSA, N.; BLANK, A. F. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. *Parasitology research*, 2018; 117(1), 97-105.

DE MELO, M. R. R.; JUNIOR, A. C. O. G. L.; OLIVEIRA, K. P.; DO NASCIMENTO, T. G.; ESCODRO, P. B.; NOTOMI, M. K. Influence of Brazilian red propolis polymeric nanoparticles in haematology, renal, and hepatic evaluations in dogs. *Research, Society and Development*, 2020; 9(11), e70391110531-e70391110531.

DE MENDONÇA, M. A.; RIBEIRO, A. R.; LIMA, A. K. D.; BEZERRA, G. B.; PINHEIRO, M. S.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L.; CARDOSO, J. C. Red propolis and its dyslipidemic regulator

formononetin: evaluation of antioxidant activity and gastroprotective effects in rat model of gastric ulcer. *Nutrients*, 2020; 12(10), 2951.

DE PONTES, M. L. C.; VASCONCELOS, I. R. A.; DE MELO, M. D. F. F.; PESSÔA, H. D. L. F. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. *Acta Brasiliensis*, 2018; 2(1), 34-39.

DE SOUZA SILVA, T.; SILVA, J. M.; BRAUN, G. H.; MEJIA, J. A.; CCAPATINTA, G. V.; CONCEIÇÃO SANTOS, M. F.; AMBRÓSIO, S. Green and red Brazilian propolis: antimicrobial potential and anti-virulence against ATCC and clinically isolated multidrug-resistant bacteria. *Chemistry & Biodiversity*. 2021.

DENG, J. M.; NA, Q. C.; BI, B. L.; WANG, Q. J.; KONG, L. F.; TAO, L. L.; ZHANG, X. Effect of ethanolic extract of própolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 2011; 37(4): 959–967.

DENLI, M.; CANKAYA, S.; SILICI, S.; OKAN, F.; ULUOCAK, A. N. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2005; 18(6): 848–854.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. D. A.; REBOUÇAS SILVA, J.; DA SILVA, D. F.; DA ROCHA, J. L. C.; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, 2018; 13(12), e0207676.

DEVIC, E.; LESCHEN, W.; MURRAY, F.; LITTLE, D. C. Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Aquaculture nutrition*, 2018; 24(1), 416-423.

DOTTA, G.; BRUM, A.; JERONIMO, G. T.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation with propolis and Aloe barbadensis extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2015; 24, 66-71.

DOTTA, G.; DE ANDRADE, J. I. A.; GONÇALVES, E. L. T.; BRUM, A.; MATTOS, J. J.; MARASCHIN, M.; MARTINS, M. L. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and Aloe barbadensis. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014; 39(2), 280-284.

EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 2014; 40(2), 500-506.

EL-GUENDOZ, S.; LYOUSSE, B.; & MIGUEL, M. G. Insight on propolis from mediterranean countries: chemical composition, biological activities and application fields. *Chemistry & biodiversity*, 2019 16(7), e1900094.

FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in Action*. Rome: Food and Agriculture Organization. 2020.

FARAG, M. R.; ABDELNOUR, S. A.; PATRA, A. K.; DHAMA, K.; DAWOOD, M. A.; ELNESR, S. S.; ALAGAWANY, M. Propolis: properties and composition, health benefits and applications in fish nutrition. *Fish & Shellfish Immunology*. 2021.

FERREIRA, J. M.; NEGRI, G. Chemical composition and biological activity of Brazilian propolis: green and red. *ACTA Apicola Brasilica*, 2018 6(1), 6-15.

FISCHER, G. Imunomodulação pela própolis. Arquivos do Instituto Biológico, 2021, v. 75, p. 247-253.

FISHBEIN, M.; CASTRO, F.; CHERUKU, S.; JAIN, S.; WEBB, B.; GLEASON, T.; STEVENS, W.R. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *Journal of clinical gastroenterology*; 2005, v.39, n.7, p.619-625.

GALAL, A.; EL-MOTAAL, A. A.; AHMED, A. M.H.; ZAKI, T. G. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. *Int. J. Poult. Sci*, 2008, 7(3): 272–278

GALEOTTI, F.; CRIMALDI, L.; MACCARI, F.; ZACCARIA, V.; FACHINI, A.; VOLPI, N. Selective treatment to reduce contamination of propolis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) still preserving its active polyphenol component and antioxidant activity. *Natural product research*; 2017, 31(17), 1971-1980.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. Manual de Hematologia Veterinária. São Paulo: Livraria Varela; 2005.

GAUR, R.; GUPTA, V. K.; SINGH, P.; PAL, A.; DAROKAR, M. P.; BHAKUNI, R. S. Drug Resistanc; Reversal Potential of Isoliquiritigenin and Liquiritigenin Isolated from *Glycyrrhiza glabra* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytotherapy research*, 2016, 30(10), 1708-1715.

GOLDENFARB, P.B; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 1971, v. 56, n. 1, p.35-39.

HANSKI, L.; GENINA, N.; UVELL, H.; MALINOVSKAJA, K.; GYLFE, Å.; LAAKSONEN, T.; VUORELA, P. M. Atividade inibitória da isoflavona biochanina A em bactérias intracelulares do gênero *Chlamydia* e desenvolvimento inicial de uma formulação bucal. *PLoS One*, 2014, 9 (12), e115115.

HARVEY, B.; SOTO, D.; CAROLSFELD, J.; BEVERIDGE, M.; BARTLEY, D. M. Planning for aquaculture diversification: the importance of climate change and other drivers. In *FAO Technical Workshop*, 2016, (pp. 23-25).

HUH, J. E.; NAM, D. W.; BAEK, Y. H.; KANG, J. W.; PARK, D. S.; CHOI, D. Y.; LEE, J. D. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1

transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *International immunopharmacology*, 2011, 11(1), 46-54.

HULVEY, J. P.; PADGETT, D. E.; BAILEY, J. C. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Ecologia*, 2007, 99(3):421-429.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA/PPM - PESQUISA DA PECUÁRIA MUNICIPAL. Dados do SIDRA, [acessado em 10 jan 2019]. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2018>.

IMRAN, M.; ASLAM GONDAL, T.; ATIF, M.; SHAHBAZ, M.; BATOOL QAISARANI, T.; HANIF MUGHAL, M.; SHARIFI-RAD, J. Apigenin as an anticancer agent. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(8), 1812-1828.

INUI, S.; HATANO, A.; YOSHINO, M.; HOSOYA, T.; SHIMAMURA, Y.; MASUDA, S.; KUMAZAWA, S. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Natural product research*, 2014, 28(16), 1293-1296.

IRIGOITI, Y.; NAVARRO, A.; YAMUL, D.; LIBONATTI, C.; TABERA, A.; BASUALDO, M. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2021.

JALALUDEEN, A. M.; HA, W. T.; LEE, R.; KIM, J. H.; DO, J. T.; PARK, C.; SONG, H. Biochanin A ameliorates arsenic-induced hepato-and hematotoxicity in rats. *Molecules*, 2016, 21(1), 69.

JUNIOR, D. S.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; CAMARDELLI, M. M. L.; DETMANN, E.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M.; OLIVEIRA, M. V. M. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. *R. Bras. Zootec*, 2004, 33(4): 1093–1099.

KASHYAP, D.; SHARMA, A.; TULI, H. S.; SAK, K.; GARG, V. K.; BUTTAR, H. S.; SETHI, G. Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48, 457-471.

KHAN, R.; NAZ, I.; HUSSAIN, S.; KHAN, R. A. A.; ULLAH, S.; RASHID, M. U.; SIDDIQUE, I. Phytochemical management of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) kofoid and white chitwood by *Artemisia* spp. in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Brazilian Journal of Biology*, 2019, 80, 829-838.

KELESTEMUR, G. T.; SEVEN, P. T.; YILMAZ, S. Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in blood of juvenile Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmoniformes) under different flow rates. *Zoologia (Curitiba)*, 2012, 29(2), 99-108.

KIM, S.; WOO, E. R.; LEE, D. G. Apigenin promotes antibacterial activity via regulation of nitric oxide and superoxide anion production. *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(10), 862-872.

KONG, W.; ZHAO, Y.; XING, X.; MA, X.; SUN, X.; YANG, M.; XIAO, X. Avaliação antibacteriana de compostos flavonóides contra *E. coli* por microcalorimetria e quimiometria. *Microbiologia aplicada e biotecnologia*, 2015, 99 (14), 6049-6058.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHENAI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanol extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim. Forsch. Drug Res*, 1993, 43 (5), 607–609.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. Aquicultura no Brasil. Conquistas e Desafios. Panorama da Aquicultura, 2015, v. 25, n. 150, p. 11-13.

LI, S.; DANG, Y.; ZHOU, X.; HUANG, B.; HUANG, X.; ZHANG, Z.; HOI, M. P. M. Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway. *Scientific reports*, 2015, 5(1), 1-17.

LIANG, F.; CAO, W.; HUANG, Y.; FANG, Y.; CHENG, Y.; PAN, S.; XU, X. Isoflavone biochanin A, a novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element activator, protects against oxidative damage in HepG2 cells. *Biofactors*, 2019, 45(4), 563-574.

LIN, Y. S.; SAPUTRA, F.; CHEN, Y. C.; HU, S. Y. Dietary administration of *Bacillus amyloliquefaciens* R8 reduces hepatic oxidative stress and enhances nutrient metabolism and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 2019, 86, 410-419.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, 2014, 146, 174-180.

LOPEZ, B. C.; DE LOURENÇO, C. C.; ALVES, D. A.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M.; SAWAYA, A. C. H. F. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. *Journal of applied microbiology*, 2015, 119(3), 677-687.

MACHADO DUTRA, J.; ESPITIA, P. J.; ANDRADE BATISTA, R. Formononetin: Biological effects and uses—A review. 2021.

MAIA-ARAUJO, Y. L. F. Estudo Da Atividade Antimicrobiana De Variedades De Própolis da Região da Foz do Rio São Francisco – Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE, 2009.

MARQUES, F. B.; WATTERSON, A.; DA ROCHA, A. F.; CAVALLI, L. S. Overview of Brazilian aquaculture production. *Aquaculture Research*, 2020, 51(12), 4838-4845.

MELLO, S. C. R. P.; DE OLIVEIRA, E. DA C. P.; DE SEIXAS FILHO, J. T. Aspectos da aquicultura e sua importância na produção de alimentos de alto valor biológico. *Semioses*, 2017, v. 11, n. 2, p. 28-34.

MELTEM, U. Ç. A. R. The Importance of Propolis in Combating COVID-19. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2021, v. 4, n. 1, p. 22-40.

MENESES, J. O. Nanoterapia e Fitoterapia no controle do fungo *Saprolegnia parasítica*. 2020.

MEURER, F.; MATIUZZI DA COSTA, M.; DE BARROS, D. A. D.; LEAL DE OLIVEIRA, S. T.; DA PAIXÃO, P. S. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. *Aquaculture Research*, 2009, 40(5), 603-608.

MILLER, R. A.; HARBOTTLE, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Microbiology spectrum*, 2018, 6(1), 6-1.

MORGADO, L. N.; LIMA, D. D.; MENDONÇA, C. B. F.; GONÇALVES-ESTEVEES, V. Pollen spectrum in propolis of *Tetragonisca Angustula* Latreille (Apidae: Trigonini) in an Island Area, Brazil. *Bee World*, 2018, 95(3), 84-88.

MU, H.; BAI, Y. H.; WANG, S. T.; ZHU, Z. M.; ZHANG, Y. W. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). *Phytomedicine*, 2009, 16(4), 314-319.

MUTAI, P.; RIGO, G. V.; TASCA, T. Synthesis and anti-giardial activity of formononetin analogues. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 19(1-3), 22-27.

NASSAR, S. A.; MOHAMED, A. H.; SOUFY, H.; NASR, S. M. Protective effect of Egyptian propolis against rabbit pasteurellosis. *BioMed Res. Int.*, 2013.

NETO, M. R.; TINTINO, S. R.; DA SILVA, A. R. P.; DO SOCORRO COSTA, M.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F.; COUTINHO, H. D. M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 107, 572-580.

NICHOLSON, P.; MON-ON, N.; JAEMWIMOL, P.; TATTIYAPONG, P.; SURACHETPONG, W. Coinfection of tilapia lake virus and *Aeromonas hydrophila* synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 2020, 520, 734746.

NIZIO, D. A. C.; FUJIMOTO, R. Y.; MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F.; FRANÇA, C. C. S.; SOUSA, N. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, T. S.; BLANK-ARRIGONI, M. F.; BLANK, A. F. Essential oils *Varronia curassavica* accessions have different activity against White spot disease in freshwater fish. *Parasitology Research*, 2018, Jan, v. 117, p. 97-105.

ODDSSON, G. V. A definition of aquaculture intensity based on production functions—The aquaculture production intensity scale (APIS). *Water*, 2020, 12(3), 765.

ORSI, R. O.; SANTOS, V. G.; PEZZATO, L. E.; CARVALHO, P. L. D.; TEIXEIRA, C. P.; FREITAS, J.; BARROS, M. M. Activity of Brazilian propolis against *Aeromonas hydrophila* and its effect on

Nile tilapia growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2017, v. 89, 1785-1799.

OSMUNDSEN, T. C.; AMUNDSEN, V. S.; ALEXANDER, K. A.; ASCHE, F.; BAILEY, J.; FINSTAD, B.; SALGADO, H. The operationalisation of sustainability: Sustainable aquaculture production as defined by certification schemes. *Global Environmental Change*, 2020, v. 60, 102025.

OZA, MANISHA J.; KULKARNI, YOGESH A. Formononetin attenuates kidney damage in type 2 diabetic rats. *Life sciences*, 2019, v. 219, p. 109-121.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Formononetin treatment in type 2 diabetic rats reduces insulin resistance and hyperglycemia. *Frontiers in pharmacology*, 2018, v. 9, 739.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview para doenças orais, cutâneas e genitais: uma revisão sistemática e meta-análise. *Oxid Med Cell Longev. Journal of nutritional science*, 2017; 5, 47.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3ª ed. Editora Eduem, 2008. Maringá, p. 311.

PEIXE, B. R. Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura. 2021.

PETRUZZI, L.; ROSARIA CORBO, M.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Antifungal and antibacterial effect of propolis: a comparative hit for food-borne pseudomonas, enterobacteriaceae and fungi. *Foods*, 2020, 9(5), 559.

PONTIN, K., DA SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, F. F.; E SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; NANAYAKKARA, N. D.; DE ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*, 2008,103(3), 487-492.

POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V. Content of biologically active compounds in Bulgarian propolis: a basis for its standardization. *Bulg. Chem. Commun*, 2017, v. 49, n. 2017, p. 115-120.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 1999, 269(2), 337-341.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia- SP (Lat. 25°OO'S – Long. 47°55'W). *Boletim do Instituto de Pesca*; 22 (1): 23-40. 1995.

RIBEIRO, A. R.; ALTINTZOGLOU, T.; MENDES, J.; NUNES, M. L.; DINIS, M. T.; DIAS, J. Farmed fish as a functional food: perception of fish fortification and the influence of origin—insights from Portugal. *Aquaculture*, 2019, 501, 22-31.

RODRIGUES, D. M.; DE SOUZA, M. C.; ARRUDA, C.; PEREIRA, R. A. S.; BASTOS, J. K. The role of *Baccharis dracunculifolia* and its chemical profile on green propolis production by *Apis mellifera*. *Journal of chemical ecology*, 2020, 46(2), 150-162.

ROSSI, P. G.; BAO, L.; LUCIANI, A.; PANIGHI, J.; DESJOBERT, J. M.; COSTA, J.; BERTI, L. (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55(18), 7332-7336.

ROY, A.; GHOSH, S. K.; HAUZOUKIM, S. S.; BHATTACHARYA, K.; MUKHERJII, D.; BARDHAN, A. Aqua drugs and chemicals used in freshwater aquaculture: A review. 2021.

RUFATTO, L. C., LUCHTENBERG, P., GARCIA, C., THOMASSIGNY, C., BOUTTIER, S., HENRIQUES, J. A. P., ... & MOURA, S. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological research*, 2018, 214, 74-82.

RUFATTO, L. C.; DOS SANTOS, D. A.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J. A. P.; ELY, M. R.; MOURA, S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(7), 591-598.

SAITO, É.; SACODA, P.; PAVIANI, L. C.; PAULA, J. T.; CABRAL, F. A. Conventional and supercritical extraction of phenolic compounds from Brazilian red and green propolis. *Separation Science and Technology*, 2020, 1-8.

SALMANI, J. M. M.; ZHANG, X. P.; JACOB, J. A.; BAO-AN, C. H. E. N. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future perspectives. *Chinese journal of natural medicines*, 2017, 5(5), 321-329.

SANTIAGO DE SOUSA, A. R.; CRUZ DE MORAES, S. Z.; BARBOSA VIANA-JÚNIOR, A.; DIVINO DE ARAUJO, E. Toward a Novel Pharmacology and Therapeutic Understanding of Brazilian Propolis: A Meta-Analytical Approach. *Pharmacognosy Reviews*, 2020, 14(27).

SANTOS, L. D.; ZADINELO, I. V.; SILVA, L. C. D.; ZILLI, R. L.; BARREIROS, M. A. B.; MAUERWERK, M. T.; MEURER, F. Alcoholic extract of propolis in Nile tilapia post-larvae and fingerlings' diets: effects on production performance, body composition and intestinal histology. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2019, 91.

SANTOS, M. L. D.; ARANTES, F. P.; SANTIAGO, K. B.; SANTOS, J. E. D. Morphological characteristics of the digestive tract of *Schizodon kneri* (Steindachner, 1875), (Characiformes: Anostomidae): An anatomical, histological and histochemical study. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2015, 87, 867- 878.

SARFRAZ, A.; JAVEED, M.; SHAH, M. A.; HUSSAIN, G.; SHAFIQ, N.; SARFRAZ, I.; RASUL, A. Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. *Science of The Total Environment*, 2020, 722, 137907.

ŠEGVIĆ-BUBIĆ, T.; BOBAN, J.; GRUBIŠIĆ, L.; TRUMBIĆ, Ž.; RADMAN, M.; PERČIĆ, M.; ČOŽ-RAKOVAC, R. Effects of propolis enriched diet on growth performance and plasma biochemical

parameters of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under acute low-temperature stress. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(6), 877-885.

SENAR. Piscicultura: fundamentos da produção de peixes. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. – Brasília: 64 p.; il. – (Coleção SENAR, 195), 2017.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Novel functional food ingredients from marine sources. *Current Opinion in Food Science*, 2015, v. 2, 123-129.

SHAHINOZZAMAN, M.; TAIRA, N.; ISHII, T.; HALIM, M. A.; HOSSAIN, M. A.; TAWATA, S. Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-Alzheimer's effects of prenylated flavonoids from Okinawa propolis: an investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, 2018, 23(10), 2479.

SHALMANY, S. K.; SHIVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. *International Journal of poultry science*, 2006, 5(1), 84-88.

SHARMA, A.; GHANI, A.; SAK, K.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K.; SETZER, W. N.; DAS, A. K. Probing into therapeutic anti-cancer potential of apigenin: recent trends and future directions. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 2019, 13(2), 124-133.

SHI, D., YANG, J.; JIANG, Y.; WEN, L.; WANG, Z.; YANG, B. The antioxidant activity and neuroprotective mechanism of isoliquiritigenin. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 152, 207-215.

SHIMIZU, T.; TAKESHITA, Y.; TAKAMORI, Y.; KAI, H.; SAWAMURA, R.; YOSHIDA, H.; KUROKAWA, M. Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–9.

SHUKLA, R.; PANDEY, V.; VADNERE, G. P.; LODHI, S. Role of flavonoids in management of inflammatory disorders. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, Academic Press, 2019, p. 293-322.

SILVA, M. P.; SILVA, T. M.; MENGARDA, A. C.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; ALENCAR, S. M.; DE MORAES, J. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 264, 113387.

SILVA, A.G.; BRANDAO, A.B.; CACCIARI, R.S.; SOARES, W.H. Avanços na elucidação dos mecanismos de ação de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. nos sintomas do climatério. *Ver. Bras. Plantas med.*[online], 2018, 11(4): 455-464.

SILVA-BELTRÁN, N. P.; BALDERRAMA-CARMONA, A. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; MACHADO, B. A. S. Antiviral effects of Brazilian green and red propolis extracts on Enterovirus surrogates. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(23), 28510-28517.

SLANZON, G. S.; TOLEDO, A. F.; SILVA, A. P.; COELHO, M. G.; DA SILVA, M. D.; CEZAR, A. M.; BITTAR, C. M. M. Red propolis as an additive for preweaned dairy calves: Effect on growth performance, health, and selected blood parameters. *Journal of dairy science*, 2019, 102(10), 8952-8962.

SUNDARESAN, A.; RADHIGA, T.; DEIVASIGAMANI, B. Biological activity of biochanin A: A review. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2018, v. 4, n. 1, p. 1-5.

SUNG, S. H.; CHOI, G. H.; LEE, N. W.; SHIN, B. C. External use of propolis for oral, skin, and genital diseases: a systematic review and meta-analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, AZ.; SOKOL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, ZP.; KRÓL, W. Composição química e efeito antiinflamatório do extrato etanólico da própolis verde brasileira sobre o J774A ativado. 1 macrófago. *Medicina alternativa e complementar baseada em evidências*, 2013.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, R. F. Hematologia de Peixes Teleósteos. Ribeirão Preto: Lillimpress Complexo Gráfico; 2004.

TAVARES-DIAS, M. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, 2018, v. 31, p. 13.

TAY, K. C.; TAN, L. T. H.; CHAN, C. K.; HONG, S. L.; CHAN, K. G.; YAP, W. H.; GOH, B. H. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms. *Frontiers in pharmacology*, 2019, v.10, 820.

TEDESCO, P.; FIORAVANTI, M. L.; GALUPPI, R. In vitro activity of chemicals and commercial products against *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia delica* strains. *Journal of fish diseases*, 2019, 42(2), 237-248.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *eCAM*, 2006, v. 3, n. 2, p. 249-254.

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

TUKMECHI, A.; KARIMI RAD, F.; FARROKHI, F.; AGH, N.; JALILI, R. The effects of short-and long-term diet supplementation with Iranian propolis on the growth and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2014, 15(3), 250-255.

UCZAY, J.; PIANESSO, D.; ADORIAN, T. J.; MOMBACH, P. I.; COLDEBELLA, I. J.; LAZZARI, R. Propolis in diets for silver catfish. *Bioscience Journal*, 2014, 30(6), 1912-1918.

UCZAY, J.; LAZZARI, R.; PIANESSO, D.; ADORIAN, T. J.; MOMBACH, P. I.; DECARLI, J. A. Evaluation of propolis as growth promoter for the common carp (*Cyprinus carpio*). *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*, 2011, 21(5), 408-413.

VALLADA, E.P. *Manual de técnicas hematológicas*. São Paulo: Atheneus; 1999.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 2015, v. 38, n. 5, p. 417-428.

VAN LOON, J. J.; WANG, C. Z.; NIELSEN, J. K.; GOLDS, R.; QIU, Y. T. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates: chemoreception and behaviour. In *Proceedings of the 11th International Symposium on Insect-Plant Relationships*, 2002, p. 27-34.

VEIGA, R. S.; DE MENDONÇA, S.; MENDES, P. B.; PAULINO, N.; MIMICA, M. J.; LAGAREIRO NETTO, A. A.; MARCUCCI, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of applied microbiology*, 2017, 122(4), 911-920.

VERNER-JEFFREYS, D. W.; WALLIS, T. J.; CEJAS, I. C.; RYDER, D.; HAYDON, D. J.; DOMAZORO, J. F.; FEIST, S. W. *Streptococcus agalactiae* Multilocus sequence type 261 is associated with mortalities in the emerging Ghanaian tilapia industry. *Journal of fish diseases*, 2018, 41(1), 175-179.

VIGAS, M. V. P.; FATORETTO, M. B.; SLANZON, G. S.; ORTEGA, E. M. M.; DEMÉTRIO, C. G. B.; BITTAR, C. M. M. Red propolis effect analysis of dairy calves health based on Weibull regression model with long-term survivors. *Research in Veterinary Science*, 2021, 136, 464-471.

WANG, C.; YANG, L.; HU, Y.; ZHU, J.; XIA, R.; YU, Y.; WANG, S. L. Isoliquiritigenin as an antioxidant phytochemical ameliorates the developmental anomalies of zebrafish induced by 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether. *Science of The Total Environment*, 2019, 666, 390-398.

WANG, M.; FIRRMAN, J.; ZHANG, L.; ARANGO-ARGOTY, G.; TOMASULA, P.; LIU, L.; YAM, K. Apigenin impacts the growth of the gut microbiota and alters the gene expression of *Enterococcus*. *Molecules*, 2017, 22(8), 1292.

WANG, Q.; YU, Y.; ZHANG, X.; XU, Z. Immune responses of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich): A model for understanding immunity against protozoan parasites. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 93, 93-102.

WANG, Q.; FU, T.; LI, X.; LUO, Q.; HUANG, J.; SUN, Y.; WANG, X. Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccines. *Fish & shellfish immunology*, 2020, 97, 382-389.

WOLSKA, K.; GORSKA, A.; ANTOSIK, K.; LUGOWSKA, K. Immunomodulatory effects of propolis and its components on basic immune cell functions. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 81(4), 575-588.

WOŹNIAK, M.; MRÓWCZYŃSKA, L.; WAŚKIEWICZ, A.; ROGOZIŃSKI, T.; RATAJCZAK, I. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2019, 29, 301-308.

WU, G. Principles of animal nutrition. CRC Press, 2017.

XU, C.; LV, Z.; SHEN, Y.; LIU, D.; FU, Y.; ZHOU, L.; SHEN, J. Metagenomic insights into differences in environmental resistome profiles between integrated and monoculture aquaculture farms in China. *Environment International*, 2020, 144, 106005.

XU, X.; YANG, B.; WANG, D.; ZHU, Y.; MIAO, X.; YANG, W. The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. *Molecules*, 2020, 25, 4612.

YANG, E. J.; KIM, S. I.; KU, H. Y.; LEE, D. S.; LEE, J. W.; KIM, Y. S.; SONG, K. S. Syringin from stem bark of *Fraxinus rhynchophylla* protects A β (25–35)-induced toxicity in neuronal cells. *Archives of pharmacal research*, 2010, 33(4), 531-538.

ZANCANELA, D. C.; FUNARI, C. S.; HERCULANO, R. D.; MELLO, V. M.; RODRIGUES, C. M.; BORGES, F. A.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. *Materials Science and Engineering*, 2019, 97, 576-582.

ZHANG, Y.N.; FOWLER, K.J.; HAMILTON, G.; CUI, J.Y.; SY, E.Z.; BALANAY, M.; SIRLIN, C.B. Liver fat imaging a clinical overview of ultrasound, CT, and MR imaging. *The British journal of radiology*, 2018, v.91, n.1089, p.20170959.

ZHANG, Y.; CHEN, W. A. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines and mediators production in BV2 microglia. *Neurochemical research*, 2015, 40(1), 165-171.

ZHAO, L.; PU, L.; WEI, J.; LI, J.; WU, J.; XIN, Z.; GUO, C. Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. *International journal of environmental research and public health*, 2016, 13(5), 498.

ZHU, W.; CHEN, M.; SHOU, Q.; LI, Y.; HU, F. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.