

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito protetivo e estímulo no crescimento de
tilápias do Nilo suplementadas com óleo de
copaíba e extrato de própolis.**

Janaina Graça de Oliveira Carvalho

Jaboticabal, São Paulo

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito protetivo e estímulo no crescimento de
tilápias do Nilo suplementadas com óleo de
copaíba e extrato de própolis.**

Janaina Graça de Oliveira Carvalho

Orientadora: Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Coorientador: Gustavo da Silva Claudiano

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da Unesp –
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2024

C331e Carvalho, Janaina Graça de Oliveira
Efeito protetivo e estímulo no crescimento de tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaiba e extrato de própolis. / Janaina Graça de Oliveira Carvalho. -- Jaboticabal, 2024
55 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal
Orientadora: Julieta Rodini Engracia de Moraes
Coorientador: Gustavo da Silva Claudiano

1. Rações Aditivos. 2. Imunologia. 3. Bem estar animal. 4. Desenvolvimento Sustentável. 5. Fitoterapia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Resposta imuno-protetiva e performance de crescimento em tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e própolis.

AUTORA: JANAINA GRAÇA DE OLIVEIRA CARVALHO

ORIENTADORA: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES (Participação Virtual),
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV UNESP, Jaboticabal-SP

Pós-Doutorando JEFFERSON YUNIS AGUINAGA (Participação Virtual)
Instituto del Mar del Perú, / UCSur, Paracas/ Perú



Assinado de forma digital por João Batista Kochenberger Fernandes;2662186000
Dados: 2024.09.20 14:57:51 -03'00'

Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBERGER FERNANDES (Participação Virtual)
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

 Documento assinado digitalmente
JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES
Data: 01/10/2024 11:48:24 -0300
Verifique em: <https://validar.f.gov.br>



Jaboticabal, 25 de julho de 2024

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
APOIO FINANCEIRO.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
Peixes e condições experimentais.....	22
Delineamento experimental	23
Sobrevivência após infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
Hematologia.....	27
Atividade respiratória de leucócitos no sangue (Burst respiratório)	28
Concentração de lisozima.....	28
Avaliação do sistema complemento: atividade hemolítica	30
Histologia e Histopatologia	31
Análises estatísticas	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, que nunca me abandonaram durante a minha vida toda e, em especial, durante o mestrado. Sua proteção e bênçãos me deram força e coragem para seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus queridos pais, Maria Bernadete e Luiz Carlos, meu agradecimento mais profundo. Sua dedicação, amor e apoio incondicional foram essenciais para todas as minhas conquistas. Agradeço a Deus todos os dias por ser filha de vocês. Sem o exemplo de coragem e perseverança que vocês me deram, eu não teria chegado até aqui. Este trabalho é, também, uma homenagem a vocês.

Agradeço também à minha orientadora, Julieta Rodini Engrácia de Moraes, por sua orientação, paciência e suporte ao longo de todo este processo. Sua sabedoria e dedicação foram essenciais para a concretização deste trabalho. Sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de aprender e crescer sob sua orientação. Além das loucuras e risadas altas em sua sala, seu companheirismo foi essencial durante o percurso deste mestrado. E não pense que vai se livrar tão fácil de mim, o doutorado está logo aí.

Ao meu coorientador, Gustavo Claudiano, deixo minha mais sincera gratidão. Sua coorientação, conhecimento e paciência foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todas as orientações, conselhos e pela dedicação em me ajudar a alcançar meus objetivos. Seu apoio e os “cinco minutinhos” que eu te pedia, que na verdade foram várias horas, de atenção foram cruciais para a execução do experimento, análises dos dados, enfim, tudo.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

Aos meus amigos do Caunesp, Ana Luiza Lima Rocha, Deborah Jacob, Douglas Graciano, Thaise Mota, Magdiel Oliveira, Vinicius Galante, Tomaz Ayres, Raphael Santucci e Thais Oliveira, meu sincero agradecimento. Cada um de vocês, com sua amizade e apoio, tornou esta jornada mais leve e agradável. Agradeço por estarem sempre presentes, pelas palavras de incentivo, pelos momentos de descontração no Skina Bar e por compartilharem essa trajetória comigo. A amizade de vocês, e a GRANDE ajuda em todas as coletas, foram pilares essenciais para a solidificação deste trabalho.

Em especial, agradeço ao meu amigo, e irmão siamês, Hugo Leandro dos Santos pelos momentos de descontração e pela ajuda infinita durante todo o meu experimento. Sua companhia e apoio foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios ao longo desta jornada. Sem você, Hugo, este trabalho teria sido muito mais difícil.

**Dedico esta dissertação aos meus pais,
Maria Bernadete e Luiz Carlos, que, sob muito
sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.**

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Processo 88887.705547/2022-00.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de Tilápia do Nilo. Fonte: Global Sea Food.....	13
Figura 2. Processo de extração do óleo resina + óleo essencial de copaíba de <i>Copaifera duckeii</i>	15
Figura 3. Aspecto visual do própolis (resina).....	17
Figura 4. Local do experimento: Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR). Biotério Experimental "Flavio Ruas de Moraes"	22
Figura 5. Resposta in vitro de <i>Aeromonas hydrophila</i> (A) e <i>Streptococcus agalactiae</i> (B). Controles positivo e negativo	34
Figura 6. Peso final entre os grupos ao final do período experimental.	1
Figura 7. Índices hematimétricos de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com óleo de copaíba e própolis.....	3
Figura 8. Atividade respiratória de leucócitos, burst respiratório aos 60 dias de experimento.	5
Figura 9. Porcentagem de morte acumulada em tilápias do Nilo desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> após suplementação com óleo de copaíba e própolis....	6
Figura 10. Histopatologia de fígados de tilápias suplementadas com óleo de copaíba e extrato de própolis, isolados e em associação. (Coloração: Hematoxilina-Eosina).....	8
Figura 11. Histopatologia de fígados de tilápias suplementadas com óleo de copaíba e extrato de própolis, isolados e em associação. (Coloração: Acido Periódico de Schiff - Hematoxilina)	9
Figura 12. Fragmentos de intestinos de tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e extrato de própolis. Azul Alcian. (Coloração: Alcian Blue pH 2,5)	2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos de qualidade de água durante o período experimental de Tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e própolis.	33
Tabela 2. Classificação da atividade bactericida do óleo de copaíba e própolis in vitro.	34
Tabela 3. Média \pm desvio padrão para desempenho zootécnico de juvenis de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetido a suplementação dietética com óleo de copaíba e própolis por 12 semanas.....	1
Tabela 4. Valores médios das características hematológicas de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentadas com ração aditiva de óleo de copaíba e própolis.	2
Tabela 5. Distribuição percentual das células de defesa orgânica de valores médios das características hematológicas de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentadas com ração aditiva de óleo de copaíba e própolis.	3
Tabela 6. Análise de atividade respiratória de leucócitos em 9 e 12 semanas.....	4
Tabela 7. Histomorfometria intestinal de tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e própolis por 9 e 12 semanas.	1

RESUMO

O óleo de copaíba e o própolis são compostos orgânicos de conhecida ação imunoestimulante em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Resultados anteriores realizados demonstraram que a alimentação aditiva destes compostos melhoram a resposta imune e o crescimento dos peixes. Objetivou-se investigar o uso destes compostos no manejo alimentar de tilápias do Nilo no incremento da resposta imune e no crescimento. Aproximadamente 270 peixes foram separados em grupos sem suplementação (GS) e com suplementação (G1, G2, G3, G4, G5, G7 e G8)(n=30/grupo) na alimentação. Os grupos com suplementação foram alimentados com ração acrescida dos compostos naturais nas concentrações 0,5% e 1,0% de óleo de copaíba e 1% e 2% para o extrato de própolis; ambos por quilo de ração. Para análise de imunidade foram realizadas quantificação de lisozima, complemento e atividade respiratória de leucócitos. Para o desafio bacteriano separou-se 10 peixes, aleatórios, de cada grupo para inoculação da bactéria *Streptococcus agalactiae*, selecionada em teste *in vitro*. Os peixes foram avaliados quanto a morbidade e mortalidade até 168h após infecção. O ensaio de 12 semanas foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata. Sangue e tecido (intestino, rim, fígado e baço) de 6 animais foram coletados para análises histológicas e histopatológicas. Os grupos G2 (0,5OC), G4 (1PROP), G6 (0,5OC1PROP), G8 (1OC1PROP) E G9 (1OC2PROP) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as análises de desempenho no crescimento, hematológicas, imunológicas, histológicas e histomorfométricas. Constatou-se que a suplementação com estes compostos naturais mostrou resultados satisfatórios em parâmetros, tanto imunológicos quanto de desempenho no crescimento. Sendo assim, a utilização destes compostos mostrou-se favorável como imunoestimulante e potencializam o crescimento.

Palavras-chave: aditivos naturais; imunoestimulantes; fitoterápicos; tilapicultura; desafio bacteriano.

ABSTRACT

Copaiba oil and propolis are organic compounds with known immunostimulating action in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Previous results have demonstrated that additive feeding of these compounds improves the immune response and growth of fish. The objective was to investigate the use of these compounds in the dietary management of Nile tilapia to increase the immune response and growth. Approximately 270 fish were separated into groups without supplementation (GS) and with supplementation (G1, G2, G3, G4, G5, G7 and G8)(n=30/group) in the diet. The supplementation groups were fed food containing natural compounds at concentrations of 0.5% and 1.0% for copaiba oil and 1% and 2% for propolis extract; both per kilo of feed. For immunity analysis, lysozyme, complement and leukocyte respiratory activity were quantified. For the bacterial challenge, 10 random fish were separated from each group for inoculation with the bacteria *Streptococcus agalactiae*, selected in an in vitro test. The fish were evaluated for morbidity and mortality up to 168 hours after infection. The 12-week trial was carried out in a completely randomized design, in triplicate. Blood and tissue (intestine, kidney, liver and spleen) from 6 animals were collected for histological and histopathological analyses. Groups G4 (1PROP), G6(0.5OC1PROP), G8(1OC1PROP) AND G9(1OC2PROP) showed statistically significant differences between growth performance, hematological, immunological, histological and histomorphometric analyses. It was found that supplementation with These natural compounds showed satisfactory results in both immunological and growth performance parameters. Therefore, the use of these compounds proved to be favorable as immunostimulants and enhance growth.

Keywords: natural additives; immunostimulants; herbal medicines; tilapiculture; bacterial challenge.

INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial está em processo constante de crescimento, sendo uma das fontes mais importantes de proteína animal. O Brasil apresenta todas as condições favoráveis para a atividade pesqueira e para a aquicultura, uma vez que possui costa marítima de 8.500 km e 12% da água doce disponível no planeta (Sidônio et al., 2012; Pereira et al., 2013; Santos et al., 2013; Silva, 2017).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, figura 1, é o segundo grupo de peixes mais produzidos no mundo (FAO, 2022) e primeiro no Brasil, com produção de 550 mil toneladas no ano de 2022 (PEIXE BR, 2023), mostrando como qualidades: alta taxa de crescimento, flexibilidade às mudanças ambientais, fácil reprodução e rusticidade (El-Sayed, 2006).



Figura 1 - Exemplar de Tilápia do Nilo. Fonte: Global Sea Food.

Esta espécie é criada principalmente em sistemas intensivos onde as dietas artificiais devem satisfazer as exigências nutricionais. Nestas condições, os peixes são expostos continuamente às alterações na qualidade da água e às práticas de manejo excessivo, transporte e adensamento, que induzem respostas de estresse, com consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência às doenças (Gatlin, 2002; Brandão et al., 2006; Ng & Romano, 2012; Wambua et al, 2021).

O uso de produtos químicos e antibióticos na aquicultura tem aumentado em função da elevada ocorrência de doenças parasitárias e infecciosas (Kovalakova, 2020). Entretanto, o uso indiscriminado destes produtos ocasiona problemas devido ao aumento da pressão de seleção sobre os microrganismos e proliferação das bactérias resistentes, havendo também a possibilidade de transferência dos genes de resistência às outras bactérias nunca expostas ao antibiótico (Salas, 2021).

Além disso, a presença de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados determina restrições na comercialização da carne e impacto negativo no meio ambiente (Smith et al., 2003; Sorum, 2006; Santos & Ramos, 2018). Desta forma é necessário buscar possíveis substitutos aos quimioterápicos mantendo-se as ações benéficas e eliminando as indesejáveis. Isto pode ser realizado com o uso de imunostimulantes (Acunha et al, 2023).

Imunostimulantes são substâncias sintéticas, químicas ou biológicas, que são capazes de aumentar e melhorar a resistência do animal induzindo a ativação ou aumentando qualquer componente do sistema imune. Atuam nos mecanismos de defesa não-específicos diante de um desafio contra enfermidades causadas por vírus, fungos, bactérias e parasitas (Vainikka et al., 2005; Moraes & Moraes, 2009, Chagas et al., 2014) e nos mecanismos de defesa específicos dos animais (Yunis-Aguinaga et al., 2015). Os imunostimulantes atuam no sistema imune dos animais de forma a aumentar a atividade de macrófagos, fagocitose por neutrófilos e monócitos e maior produção de linfócitos, imunoglobulinas e lisozima (Sakai, 1999) aumentando a resistência desses animais frente às infecções por organismos oportunistas proporcionando, desta forma, o crescimento saudável dos peixes (Vainikka et al., 2005; Yunis-Aguinaga et al., 2015).

O uso de extratos de plantas como imunostimulantes encontra-se em crescimento para peixes tropicais (Acunha *et al*, 2023), sendo boa alternativa para o controle de doenças devido ao baixo custo operacional, facilidade no preparo, utilização e segurança ambiental. Em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa tem-se estudado o uso compostos naturais que apresentam características adequadas para serem consideradas imunostimulantes decorrentes de suas composições ricas em compostos que modulam o sistema imune (Yunis-Aguinaga et al., 2015, Yunis-Aguinaga et al., 2016; Bozzo et al, 2023)

Um desses compostos é o óleo de copaíba, fitoterápico que apresenta características terapêuticas como ação anti-inflamatória, cicatrizante, potencial antisséptico, antitumoral, antibacteriano, germicida, expectorante, diurético, analgésico e possui atividade antidiabética (Veiga Júnior et al., 2002; Rigamonte Azevedo et al., 2004; Carvalho et al., 2017) em humanos e animais. (Pieri et al., 2009).

A copaíba da espécie *Copaifera duckei* é nativa da região Amazônica e o óleo extraído de sua casca possui as frações óleo-resina e óleo essencial com ação anti-inflamatória mais eficaz do que o diclofenaco de sódio (Cavalcante, 2013).



Figura 2. Processo de extração do óleo resina + óleo essencial de copaíba de *Copaifera duckei*

A composição do óleo de copaíba é a base de sesquiterpenos como cubeno e cadineno, ácidos graxos, cumarina, tocoferol, bisaboleno, ácido copálico, cariofileno, flavonas, copaeno, copaína, carioazuleno, humuleno, saponinas, quininos, taninos e selineno. Dentre os compostos do óleo, a resposta antiinflamatória se dá pela ação do cariofileno, (Cavalcante, 2013) conforme observado em estudos realizados em ratos com artrite induzida por adjuvante em que os efeitos das inflamações articulares e sistêmicas foram reduzidos nos animais após o tratamento com o óleo de copaíba (Comar et al., 2013).

O composto cariofileno inibiu o crescimento dos parasitas *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL em relação

a substância eugenol no estudo realizado por Leite et al. (2013) em ratos. Além de ser um dos principais componentes do óleo de copaíba e atuar como um potente anti-inflamatório por meio da inibição das vias histamínicas e serotoninérgicas com efeito antinociceptivo (mediado por receptores opioides) (Gomes et al., 2010; Lucca et al., 2015).

O cariofileno também possui ação antimicrobiana contra patógenos (Yang et al., 2015). Este fato foi observado no trabalho realizado por Yoo e Jwa (2018) em que observaram que o crescimento de *Streptococcus mutans* foi inibido em concentrações de 0,078%, comprovando a eficácia antimicrobiana do cariofileno. Ele também tem capacidade de penetrar em biofilmes que protegem as bactérias, auxiliando também na inibição da formação do mesmo (Yoo e Jwa, 2018).

O óleo-resina de copaíba também foi eficaz no tratamento do diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina em ratos no estudo realizado por Carvalho et al. (2017). Os autores também observaram redução no colesterol, triglicérides e glicose dos ratos tratados. O óleo-resina restaurou as células alfa do pâncreas e aumentou o diâmetro das ilhotas de Langerhans em ratos.

A eficácia do óleo de copaíba na atividade antibactericida já foi comprovada em diversos estudos realizados em animais e humanos (Pieri et al., 2010; Souza et al., 2011; Dias et al., 2015; Guimarães et al., 2016; Simões et al., 2016), assim como a eficácia na atividade antifúngica (Zimmermam-Franco et al., 2013; Dias et al., 2015; Tobouti et al., 2016). Estes fatos indicam que o óleo de copaíba é um antimicrobiano que age contra bactérias e fungos sendo benéfico em muitas condições infecciosas (Tobouti et al., 2017).

O óleo de copaíba também aumentou a angiogênese em retalho cutâneo subdérmico analisados por Estevão et al. (2009) em fragmentos das porções cranial, média e caudal em ratos 8 dias pós-operatório comprovando seu efeito pró cicatrizante.

O óleo-resina da copaíba da espécie *Copaifera duckei* foi eficaz no tratamento de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados por parasitas monogêneos que são os responsáveis por grandes perdas econômicas em aquicultura devido a mortalidade que causam nos peixes (Da Costa et al., 2017). Os autores banharam as brânquias parasitadas por 10 minutos em concentrações de 10 e 50 mg/L de óleo de copaíba.

Com relação a alterações histopatológicas, as lesões observadas nos

peixes estudados por Da Costa et al. (2017), não foram causadas pelo óleo-resina da copaíba, mas sim pelo parasitismo ou condições nutricionais. Os autores ressaltam que o tratamento com óleo-resina é uma alternativa promissora no tratamento contra estes tipos de parasitas.

Outro composto natural muito utilizado é o própolis, fitoterápico amplamente utilizado como promotor de crescimento em tilápias (Meurer et al, 2009; Abass & El Assely, 2012) e também devido às suas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, bacteriostático, antisséptico e imunoestimulante (Burdock, 1998; Ramos & Miranda, El-Guendouz et al, 2019; Wolska et al, 2019; Petruzzi et al, 2020).

Sendo uma substância resinosa, o própolis é coletado por abelhas a partir de exsudatos de plantas e modificada com enzimas salivares. Este composto é utilizado pelas abelhas para selar fendas, proteger a colmeia contra intrusos e manter um ambiente estéril (Meurer et al, 2009; Abass & El-Assely, 2012). A composição do própolis varia de acordo com a flora local, mas geralmente contém resinas, bálsamos, ceras, óleos essenciais, pólen e compostos orgânicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, que conferem ao própolis suas múltiplas propriedades biológicas (Wolska et al, 2019).



Figura 3. Aspecto visual do própolis (resina).

O própolis contém níveis variáveis de componentes que variam de 45 a 55% de resinas e bálsamos vegetais (ésteres, ácidos fenólicos e flavonóides), 8 a 35% de cera (principalmente cera de abelha), 5 a 10% de óleos aromáticos e essenciais (pineno, viridiflorol, tricosano, e eudesmo), 5% de ácidos graxos (geralmente de cera e o restante dependendo da origem botânica), 5% de pólen e

5% de outros componentes orgânicos (açúcares, quinonas, lactonas, cetonas, esteróides) e microelementos (Fe e Zn) (Bankova et al, 2000) . O própolis varia em cor de amarelo-esverdeado a marrom, dependendo de sua maturação e fontes (Burdock, 1998; Wach, 2013).

A composição do própolis contém grande número de biomoléculas incluindo fenóis, ésteres, terpenos, hidrocarbonetos, açúcares e componentes minerais. Foi relatado que o própolis contém vários compostos bioativos, como flavonas, flavonóis, dihidroflavonol, flavanonas e compostos fenólicos totais. Esses compostos bioativos têm estreita associação com a sua atividade biológica (Bankova, 2005; Stan et al, 2011; Oruç et al, 2017).

Sua atividade antimicrobiana é uma das mais bem documentadas, sendo eficaz contra diferentes micro-organismos. O estudo da ação antibacteriana contra várias cepas tem demonstrado que o própolis é mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (Sforcin et al., 2000). O própolis também apresenta atividade antifúngica (Sforcin et al., 2001; Ota et al., 2001; Siqueira et al., 2009), anti-parasitária (Freitas et al., 2006; Salomão et al., 2011; Da Silva et al., 2013) e antiviral (Bufalo et al., 2009), sendo que ela age diretamente sobre os micro-organismos *in vitro* ou estimular o sistema imune para eliminá-los *in vivo* (Sforcin & Bankova, 2011). Dessa forma, o própolis induz aumento na atividade antimicrobiana de macrófagos contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Murad et al., 2002), contra *Samonella Typhimurium* (Orsi et al., 2005), de monócitos contra *Candida albicans* (Cardoso et al., 2017), e células dendríticas (DCs) contra *Streptococcus mutans* (Conti et al., 2016).

Na piscicultura, o uso de própolis como imunoestimulante tem ganhado destaque devido à necessidade de alternativas naturais e eficazes para a promoção da saúde dos peixes (Meurer et al, 2009; Abass & El-Assely, 2012). O própolis melhora a resposta imune dos peixes, aumentando a produção de células de defesa, como leucócitos, e a atividade de enzimas imunológicas, como a lisozima. Isso resulta em uma maior resistência às infecções, redução da mortalidade e melhoria do bem-estar geral dos peixes, contribuindo para uma produção mais sustentável e eficiente (Dotta et al, 2015).

O cultivo de tilápias, em particular, tem se beneficiado do uso de própolis. Estudos mostram que a suplementação de dietas de tilápias com própolis melhora parâmetros imunológicos, como a atividade fagocítica e a produção de anticorpos.

Além disso, peixes suplementados com própolis apresentam melhores taxas de crescimento e conversão alimentar, provavelmente devido ao efeito positivo do própolis na saúde intestinal e na digestão (Cardoso et al., 2017).

Peixes redondos, como o tambaqui e o pacu, também têm mostrado respostas positivas ao uso de própolis. A suplementação com própolis nestes peixes resulta em uma melhor resistência a patógenos comuns na aquicultura, como *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. Além disso, o própolis auxilia na recuperação de peixes após infecções ou estresses ambientais, acelerando o processo de cicatrização e reduzindo o uso de antibióticos (Dotta et al, 2015).

A aplicação de própolis na aquicultura não se limita apenas à alimentação. O uso tópico de extratos de própolis em feridas e lesões cutâneas de peixes tem mostrado acelerar a cicatrização e prevenir infecções secundárias. Isso é particularmente útil em sistemas intensivos de cultivo, onde os peixes são mais suscetíveis a lesões e infecções devido à alta densidade populacional e ao manejo frequente (Meurer et al, 2009; Abass & El-Assely, 2012). Além dos benefícios diretos para a saúde dos peixes, o uso de própolis na aquicultura contribui para a sustentabilidade do setor. Ao reduzir a dependência de antibióticos e outros medicamentos sintéticos, o própolis ajuda a diminuir o risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e a contaminação ambiental (Maфра et al, 2022). Isso está alinhado com as práticas de aquicultura responsável e sustentável, que buscam minimizar os impactos negativos ao meio ambiente e garantir a segurança alimentar através dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis da ONU, pela Agenda 2030 (ONU, 2015).

Por ser um composto natural com múltiplas propriedades benéficas, o própolis têm diversas opções que podem ser exploradas na aquicultura. Seu uso como imunostimulante em tilápias, peixes redondos e outras espécies cultivadas oferece uma alternativa promissora para a promoção da saúde e bem-estar dos peixes (Meurer et al, 2009; Abass & El-Assely, 2012). Ao melhorar a resistência às doenças, promover o crescimento saudável e reduzir a necessidade de tratamentos químicos, o própolis se destaca como uma ferramenta valiosa para a aquicultura moderna e sustentável (ONU, 2015).

Portanto, diante da possibilidade da utilização de compostos fitoterápicos como imunostimulantes previamente às infecções causadas por bactérias

comumente afetadas no cultivo de peixes em aquicultura, o estudo em questão pretende avaliar a eficácia da adição de óleo de copaíba e própolis à dieta de *Oreochromis niloticus* e investigar suas ações como antimicrobianos, anti-inflamatórios e suas atuações no sistema imunológico de tilápias do Nilo, assim como seu papel no efeito de crescimento desta espécie.

OBJETIVOS

- Avaliar a atividade bactericida *in vitro* do óleo de copaíba e extrato de própolis para cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*;
- Avaliar a resposta imune e o efeito no crescimento de tilápias do Nilo com alimentação acrescida de óleo de copaíba e própolis antes e após infecção por *Streptococcus agalactiae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes e condições experimentais

O presente estudo foi realizado no Centro de Aquicultura da Unesp, Departamentos de Patologia, Reprodução e Saúde Única (DPRSU) da FCAV – Unesp, adotando as normas de apresentação de trabalhos da Universidade Estadual Paulista (2000) e dos princípios éticos na experimentação animal propostos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o certificado de numeração 0004509/23.

Foram utilizadas 270 tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, com peso médio de 27g e comprimento total médio de 13 cm, adquiridos em piscicultura comercial da região de Jaboticabal- SP. Inicialmente os peixes foram acondicionados em tanques de 310 litros, com fluxo contínuo de poço artesiano, com vazão de 6L/min e aeração suplementar. Os peixes receberam ração comercial peletizada (36% PB e 4000 kcal/kg-1EB), duas vezes ao dia, correspondendo a 3% da biomassa. A qualidade da água foi determinada a cada dois dias com sonda multiparâmetros Série U-50 – HORIBA.



Figura 4 - Local do experimento: Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR). Biotério Experimental "Flavio Ruas de Moraes"

Delineamento experimental

Pré-ensaio: Para estabelecer a atividade bactericida do óleo de copaíba e extrato de própolis para cepas de *Streptococcus sp.*, e *Aeromonas hydrophyla* foi utilizado o método de difusão em discos adaptado de Abdollahzadeh et al. (2014). Primeiramente soluções bacterianas de cada patógeno foram preparadas, para *S. agalactiae* e *A. hydrophila*. Foi utilizado caldo cérebro coração (BHIB) (GAO & GAUNT, 2016). As doses bacterianas foram preparadas centrifugando os caldos de cultivos a 10000 g, 4°C por 10 min, seguido de ressuspensão dos pellets bacterianos em tampão fosfato salino estéril (PBS).

As doses bacterianas foram padronizadas previamente para produzir crescimento completo em placas Petri, e foram acertadas com auxílio de espectrofotometria a 625 nm. Em seguida, 100µL de cada solução bacteriana foram espalhados usando swabs estéreis em ágar Brain Heart Infusion (BHI) para *S. agalactiae* e *A. hydrophila* (Gao; Gaunt, 2016). As placas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem e após 5 min, um disco de papel filtro estéril (Whatman, 6 mm de diâmetro) foi aplicado na superfície central de cada placa previamente semeada.

A seguir, três testes foram realizados: um utilizando somente o óleo de copaíba, outro com o própolis e o terceiro com os dois compostos juntos. Em cada teste, os compostos previamente filtrados (0,22 µm) foram aplicados pipetando 8 µL ou 10 µL no centro dos discos de papel filtro, sendo utilizadas cinco repetições para cada volume. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 15 min para secagem e a seguir, foram incubadas a 28°C por 24-72h para avaliação do crescimento bacteriano. Um disco do antibiótico oxitetraciclina de 30 µg foi adicionado nas placas utilizadas como controle positivo, enquanto como controle negativo foi utilizado apenas o disco estéril sem óleo ou antibiótico. Após incubação, foi utilizado paquímetro para medir os diâmetros de inibição bacteriana causados pela aplicação dos discos com óleo e extrato de própolis. O grau de inibição foi classificado como sem inibição (-), levemente (+), parcialmente (++) ou totalmente inibido (+++).

Ensaio Experimental: Para avaliar o efeito protetivo e efeito no crescimento em tilápias suplementadas com óleo de copaíba e própolis, 270 juvenis de tilápias obtidas de uma piscicultura comercial com peso médio de 27g e comprimento médio de 13 cm foram aclimatados por 15 dias e, posteriormente, distribuídos aleatoriamente em 27 tanques de fibra (250L / n=10), abastecidos com água corrente, de poço artesiano, com vazão de 1L/min. e com aeração suplementar. Os peixes receberam ração comercial peletizada (36% PB e 4000 kcal/kg-1EB), pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas a cada três dias, e a qualidade da água foi determinada diariamente com oxímetro

YSI®, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo YSI®, modelo 63, mantendo-se dentro da faixa de conforto para espécie (oxigênio dissolvido= 5,1 mg/L; temperatura = 29,47 °C; pH= 7,66 e a condutividade elétrica = 117,96 µS/cm) (HEIN & BRIANESE, 2004). Os grupos foram distribuídos aleatoriamente (DIC): controle não suplementado e oito tratamentos com as concentrações de óleo de copaíba 0,50% e 1,0%, por quilo de ração e própolis nas concentrações 6 e 15g por quilo de ração, por 80 dias. Os tratamentos adotados foram:

- G1: Grupo sem suplementação na ração (CTL);
- G2: Grupo com suplementação de 0,5% de óleo de copaíba (0,5OC);
- G3: Grupo com suplementação de 1,0% de óleo de copaíba (1OC);
- G4: Grupo com suplementação de 1% de própolis (1PROP);
- G5: Grupo com suplementação de 2% de própolis (2PROP);
- G6: Grupo com suplementação de 0,5% de óleo de copaíba e 1% de própolis (0,5OC1PROP);
- G7: Grupo com suplementação de 0,5% de óleo de copaíba e 2% de própolis (0,5OC2PROP);
- G8: Grupo com suplementação de 1,0% de óleo de copaíba e 1% de própolis(1OC1PROP);
- G9: Grupo com suplementação de 1,0% de óleo de copaíba e 2% de própolis(1OC2PROP).

Os peixes receberam ração duas vezes ao dia (3% da biomassa) (BRUM et al., 2017; BRUM et al., 2018; BABA et al., 2016). As concentrações de óleo de copaíba foram definidas de acordo com ensaios prévios de palatabilidade que mostraram que concentrações superiores a 1,0% não eram ingeridas pelas tilápias. O preparo da dieta foi realizado de acordo com Skov et al., (2012) com modificações. Para cada 100g de ração, foram adicionados 500 µL (0,50%) e 1000 µL (1,0%) de óleo de copaíba. Para a adição de própolis foram utilizados, por quilo de ração, 1%, e 2%, e posteriormente refrigerados. Foi utilizada ração comercial (Supra Tilápia 36%, Alisul) com 360g kg⁻¹ proteína pura, 120g kg⁻¹ umidade, 80g kg⁻¹ extrato etéreo e 40g kg⁻¹ fibra bruta.) para o preparo da ração acrescida dos compostos orgânicos.

Os compostos utilizados para a preparação da ração foram adquiridos de produtores brasileiros. O óleo resina de copaíba utilizado durante o período experimental da fabricante Copaíba da Amazônia (com sede da empresa em Guarujá-SP) e de origem botânica de *Copaifera duckei*. O extrato de própolis utilizado foi o do tipo alcoólico por proporcionar maior estabilidade aos compostos

ativos, preservando suas propriedades biológicas por um período mais longo. Isso é especialmente importante para garantir a eficácia constante da ração suplementada ao longo do experimento. O extrato foi adquirido do Apiário Melbee, com sede em São Jose do Rio Preto-SP e de origem botânica de Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*).

Foram realizadas 2 biometrias para a correção da massa de ração a ser ofertada aos peixes. As biometrias ocorreram após 15 e 50 dias de experimento. Em cada biometria aferiu-se o peso e comprimentos total e padrão de todos os peixes das unidades experimentais.

Para a determinação da concentração bacteriana letal 50 (DL50-96h) e determinação do inóculo do desafio, foram utilizadas quatro caixas de fibra (volume de 250 L), contendo 10 peixes em cada, com peso médio inicial de 80 g. Os peixes das caixas 1 a 3 foram inoculados na cavidade celomática com as concentrações 10⁶; 10⁷; 10⁸ UFC/mL de *S. agalactiae* e outra correspondendo ao grupo controle, injetados com PBS (tampão fosfato salino). Os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística para que fosse possível estabelecer a concentração da dose letal de 50% dos animais.

Após os tempos de experimentação de 9 e 12 semanas foi coletado o sangue de 6 animais de cada grupo por punção do vaso caudal com seringa descartável e distribuído em microtubos contendo EDTA (10%). Foi determinado o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), hemoglobina (Collier, 1944) e contagem de eritrócitos utilizando a solução de Natt & Herrick como diluente e corante (Natt e Herrick, 1952). Com estas variáveis foram calculados o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Para contagem total e diferencial de leucócitos, as extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com corante Panótico Rápido (Laborclin; PR. Brasil). Os peixes utilizados para a coleta sanguínea foram eutanasiados em benzocaína (100 mg.L⁻¹) previamente diluída em álcool puro para coleta de amostras de sangue e tecidos (Marcusso et al., 2021). O sangue total foi utilizado para análises hematológicas e burst respiratório, enquanto o soro para análises bioquímicas e imunológicas (lisozima e complemento).

Para determinação do efeito no crescimento, os parâmetros foram calculados de acordo com o peso inicial e final dos peixes de cada etapa experimental. Foram calculados os parâmetros de desempenho zootécnico pelo

ganho de peso (GP (g)= Peso médio final - Peso médio inicial), Conversão alimentar aparente (CA) (CA: Alimento consumido (g) / ganho de peso(g)), taxa de crescimento específico (TCE) (TCE (g)= $100[(\ln \text{ peso final médio (g)} - \ln \text{ peso inicial médio (g)}) / \text{tempo}]$) e Biomassa final (BF) (o BF (g)= Peso médio final (g) x Número de peixes analisados).

Após o período de 12 semanas de alimentação dos peixes com ração comercial suplementada com diferentes concentrações de óleo de copaíba e própolis, 10 peixes de cada tratamento foram separados em tanques de 250 L. Os organismos foram novamente reagrupados em DIC, em dois grupos para indução da inflamação, dos quais um grupo foi inoculado com solução PBS (controle negativo) e os outros grupos receberam o volume de 1mL para cada 100g de massa do animal com a DL50 da bactéria que obteve melhor resultados no pré-ensaio, *S. agalactiae*. Os animais foram inoculados na cavidade peritoneal e foram avaliados quanto a morbidade e mortalidade a cada 12h após infecção até o momento em que não houvesse mais a ocorrência de mortalidade.

Sobrevivência após infecção por Streptococcus agalactiae

Após a inoculação para infecção, com a bactéria *Streptococcus agalactiae*, os animais foram avaliados quanto a morbidade e mortalidade a cada 12h. Para cada ponto de avaliação, registrou-se a ocorrência ou não de eventos de interesse, como a mortalidade. Esses dados foram posteriormente utilizados para a construção das curvas de Kaplan-Meier. Esta técnica estatística permitiu estimar a probabilidade de sobrevivência dos animais ao longo do tempo, fornecendo uma visualização clara da proporção de indivíduos que permaneciam vivos em cada intervalo de tempo. As curvas de Kaplan-Meier foram geradas para comparar as taxas de sobrevivência entre os diferentes grupos experimentais, permitindo uma análise detalhada da eficácia dos tratamentos e das respostas dos animais à infecção.

A curva de Kaplan-Meier é uma técnica estatística utilizada para estimar a probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo em um grupo de indivíduos. Este tipo de gráfico é amplamente utilizado em estudos de sobrevivência e análise de tempo até o evento, permitindo visualizar a proporção de indivíduos que continuam livres de um determinado evento (como morte, recidiva de doença, ou qualquer outro evento de interesse) em diferentes momentos. No gráfico, o eixo vertical

representa a probabilidade de sobrevivência e o eixo horizontal representa o tempo. As quedas na curva ocorrem nos momentos em que os eventos são observados, proporcionando uma visualização clara de como a sobrevivência vai ao longo do tempo. A curva de Kaplan-Meier é particularmente útil em áreas como a medicina, onde se compara a eficácia de diferentes tratamentos, avaliar fatores prognósticos e entender melhor a progressão de doenças.

Hematologia

As análises hematológicas são fundamentais para avaliar a saúde e o bem-estar das tilápias do Nilo durante experimentos. Esses exames permitem monitorar parâmetros sanguíneos, como a contagem de glóbulos vermelhos e brancos, níveis de hemoglobina e hematócrito, que são indicadores importantes do estado imunológico e da capacidade de transporte de oxigênio dos peixes. Alterações nesses parâmetros revelam respostas a fatores estressantes, infecções ou outras condições patológicas. Além disso, as análises hematológicas auxiliam na avaliação dos efeitos de diferentes dietas, tratamentos ou condições ambientais aplicadas durante o experimento, fornecendo dados essenciais para interpretações científicas precisas. Dessa forma, essas análises contribuem significativamente para a compreensão do impacto das intervenções experimentais na fisiologia e saúde das tilápias do Nilo.

Após os tempos de 9 e 12 semanas, o sangue de 6 animais de cada grupo foi coletado por punção do vaso caudal com seringa descartável e distribuído em microtubos contendo EDTA (10%). Foram determinados o hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), hemoglobina (Collier, 1944) e contagem de eritrócitos utilizando a solução de Natt & Herrick como diluente e corante (Natt e Herrick, 1952). Com estas variáveis foram calculados o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Para contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos, as extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com corante Panótico Rápido (Laborclin; PR. Brasil). As contagens de leucócitos e trombócitos foram realizadas em extensões sanguíneas considerando até 2000 eritrócitos para a contagem total. De posse desses resultados e da contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, foi realizado o cálculo: Leucócitos/ Trombócitos (μL de

sangue) = (número de leucócitos/ Trombócitos x contagem de eritrócitos/ μL)/ número eritrócitos na extensão sanguínea.

Atividade respiratória de leucócitos no sangue (Burst respiratório)

A análise de burst respiratório, ou atividade respiratória de leucócitos, é crucial para avaliar a resposta imunológica inata das tilápias do Nilo. Esse teste mede a capacidade dos leucócitos de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) como resposta a agentes patogênicos, uma função vital na defesa contra infecções. Ao quantificar a produção de EROs, é possível determinar a eficácia do sistema imunológico dos peixes em neutralizar microorganismos invasores. Essa análise é especialmente importante em estudos que investigam o impacto de fatores ambientais, dietas ou tratamentos no sistema imunológico das tilápias. Assim, o burst respiratório fornece dados valiosos sobre a saúde imunológica dos peixes, contribuindo para o desenvolvimento de práticas de manejo e intervenções mais eficazes na aquicultura.

O sangue total utilizado na análise da atividade respiratória de leucócitos do sangue foi coletado nos tempos supracitados (6, 24 e 48 horas após infecção). Essa metodologia baseou-se na determinação das espécies reativas de oxigênio produzidas pelo “burst” oxidativo por meio de ensaio colorimétrico, quantificando-se a redução do corante “nitrobluetetrazolium” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel, azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de “formazan” (KLEIN, 1990). Para isso 100 μL de sangue heparinizado foi adicionado em 100 μL do corante “nitrobluetetrazolium” (NBT, Sigma, ST Luis, MO, USA) e foram adicionados 100 μL de PMA 10-5 (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1mg), cuja mistura foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente ($\pm 26^\circ\text{C}$) e a seguir centrifugada a 300g, por 5 minutos. Na reação o corante NBT foi reduzido, visto que o DMF (N, N- dimetilformamida - Sigma-Aldrich®) promoveu a lise da parede celular dos leucócitos e solubilizou os grânulos de formazan. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Unico 2100) no comprimento de onda de 540 nm (SAHOO et al., 2005).

Concentração de lisozima

A lisozima é uma enzima antimicrobiana que desempenha um papel crucial no sistema imunológico inato de muitos organismos, incluindo as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ela atua degradando a parede celular de bactérias,

principalmente através da quebra de ligações β -1,4-glicosídicas no peptidoglicano, levando à lise bacteriana. A quantificação da atividade da lisozima é de grande importância em análises imunológicas, pois serve como um indicador da saúde e da resposta imune dos peixes. Monitorar os níveis de lisozima oferece informações valiosas sobre a capacidade de defesa do organismo contra infecções bacterianas e ajudar na avaliação do estado imunológico geral das tilápias, contribuindo para práticas de manejo e aquicultura mais eficazes.

Níveis elevados de lisozima são indicativos de um sistema imunológico robusto e eficaz nas tilápias do Nilo. Quanto maior a atividade de lisozima, maior a capacidade do peixe em combater infecções bacterianas e manter a saúde geral. Isso se deve à função essencial da lisozima na degradação das paredes celulares bacterianas, o que impede a proliferação de patógenos. Portanto, a presença de altos níveis de lisozima no organismo das tilápias não apenas sinaliza uma resposta imune ativa, mas também contribui para uma maior resistência a doenças, resultando em peixes mais saudáveis e uma produção aquícola mais sustentável e produtiva.

A determinação da concentração de lisozima sérica foi feita nos tempos supracitados (6, 24 e 48 horas após infecção) pelo teste turbidimétrico, segundo ELLIS (1990) e adaptada por Marzocchi– Machado *et al.* (1999). Inicialmente uma curva padrão utilizando lisozima liofilizada (1 mg/mL⁻¹) de clara de ovo de galinha nas concentrações de 10, 25, 50, 80, 100 e 150 ng lisozima/300 μ L, suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg) e 50 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) foi preparada e analisada em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em 450 nm, sendo o resultado das diferenças de densidade ópticas iniciais e finais utilizados para quantificação das concentrações de lisozima nas amostras. A princípio as amostras de soro foram inativadas a 56 °C, em banho-maria, durante 30 minutos, causando a inativação das proteínas do sistema complemento, de modo que a ação da lisozima seja o único fator responsável pela lise do *M. lysodeikticus*.

As amostras foram de 175 μ L de soro inativado e 125 μ L de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), cuja solução foi colocada no espectrofotômetro (Beckman DU-70S) para incubação durante dois minutos a 26°C. Uma suspensão de *M. lysodeikticus* (300 μ L) foi adicionada à solução, totalizando um volume final de 600 μ L. Em seguida foi avaliada a redução da densidade óptica (Δ DO) em 450

nm entre 0,5 e 5,0 minutos, a 26 °C. A concentração de lisozima ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) correspondeu a redução da ΔDO (densidade ótica) para cada volume da amostra avaliada (ABREU et al., 2009).

Avaliação do sistema complemento: atividade hemolítica

O sistema complemento é uma parte crucial do sistema imunológico inato das tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), composto por uma série de proteínas plasmáticas que atuam em cascata para combater infecções. Sua importância reside na capacidade de opsonizar patógenos, promover a inflamação e causar a lise de células invasoras. A quantificação da atividade do sistema complemento é essencial em análises imunológicas, pois oferece uma visão detalhada da eficácia da resposta imune do peixe. A via alternativa do complemento, uma das três vias de ativação, é particularmente relevante para a análise, pois não depende de anticorpos para iniciar a cascata, permitindo uma rápida resposta contra uma ampla gama de patógenos. Medir a atividade da via alternativa fornece informações valiosas sobre o estado imunológico e a capacidade de defesa das tilápias, auxiliando na implementação de estratégias de manejo e saúde mais eficazes na aquicultura.

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ferriari et al. (1990) nos tempos supracitados (9 e 12 semanas). No ensaio foi utilizada suspensão de eritrócitos de coelhos, cuja preparação foi feita utilizando-se uma alíquota de sangue total de coelhos misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. À solução filtrada foi adicionado o mesmo volume do agente quelante TEA-EDTA (trietanolamina – ácido etileno diaminotetracético) 10 mM, pH 7,4 e gelatina a 0,1%. Esta solução foi incubada por 15 minutos, a 37°C e, posteriormente, centrifugada a 600 g, por 10 minutos, a 4°C, para preparação dos eritrócitos. Os eritrócitos foram, então, ressuspensos em tampão trietanolamina (TEA) – Mg^{2+} 2mM, pH 7,4 e lavados com o mesmo tampão, por 3 vezes, após centrifugação (600 x g, por 10 minutos, 4 °C). Os eritrócitos depois da última centrifugação foram ressuspensos em solução de Alséver e armazenados a 10 °C, permanecendo viáveis por até 15 dias. No momento da utilização, parte da suspensão de eritrócitos armazenada foi lavada duas vezes com tampão TEA – ácido etileno glicoltetracético (EGTA) 8mM

e Mg²⁺ 2mM, com gelatina 0,1% (600 xg, por 10 minutos, 4 °C) e ressuspendidos em tampão TEA-EGTA 1% em densidade óptica entre 0,7 e 0,8 a 700 nm. A padronização da metodologia para soro de tilápia-do-Nilo foi realizada em diversas diluições em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg²⁺ 2mM, com gelatina 0,1%. A análise da atividade hemolítica do complemento foi realizada pela mistura de 400 µL de cada diluição de soro com 800 µL da suspensão de eritrócitos, a qual foi submetida à leitura da absorbância em 700nm, por 10 min, em espectrofotômetro provido de banho a 37°C (Hitachi U-2910). Após a padronização da diluição de 1:10, foram adicionados a 280 µL de tampão TEA-EGTA 8mM e Mg²⁺ 2mM, com gelatina 0,1% e a essa mistura foram acrescentados 800µL da suspensão de eritrócitos. A solução foi, então, submetida à leitura em espectrofotômetro, como descrito. Uma alíquota de soro foi aquecida a 56°C, por 30 min para controle negativo da atividade do sistema complemento. A diferença entre a absorbância inicial e final foi determinada entre 0 e 10 min, a 37°C. Os resultados foram expressos utilizando-se os valores da variação de absorbância.

Histologia e Histopatologia

Afim de que se observasse possíveis alterações nos órgãos durante o ensaio experimental, nas coletas dos períodos de 9 e 12 semanas foram coletados intestino, fígado, baço e rim para análise histológica. A análise histológica dos intestinos foi realizada para observar o comprimento das microvilosidades. A obtenção das medidas de altura e altura total das vilosidades corresponderam à distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e do ápice das vilosidades até o término da serosa, respectivamente. A largura das vilosidades e a espessura do epitélio das vilosidades, foram realizadas em microscopia de luz, AX10 Zeiss, câmera AxioCam MRC, com auxílio do “software” Scope A1.

Fragmentos de fígado, baço e rim foram coletados e fixados em formaldeído 10% em tampão fosfato. Posteriormente à fixação, o material foi conservado em álcool 70% até o momento da inclusão em parafina histológica. O material foi submetido a cortes seriados de 5 µm e corados por hematoxilina-eosina e Alcian e submetidos à reação com ácido periódico de Schiff (PAS) e as lesões descritas sob microscopia de luz (Luna, 1968)

Os polissacarídeos neutros no trato digestório e o glicogênio hepático foram detectados pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS), com contracoloração

com Hematoxilina de Harris; a presença de polissacarídeos ácidos foi determinada pela coloração com Azul de Alcian pH 2,5, com contracoloração com hematoxilina de Harris Todos os procedimentos histopatológicos seguirão os padrões de rotina do laboratório central do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única/FCAV/Unesp.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testado quanto a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade pelo teste de Levene. E atendendo as premissas de serem dados normais e homocedásticos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Caso alguma das médias apresentasse diferença estatística, foram comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade ($P < 0,05$) e os dados não paramétricos, como o de comprimento de vilosidades dos intestinos foram comparados pelo teste de Kruskall Wallis a 5% de probabilidade e teste de Dunn para comparação dos postos. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa estatístico GraphPad® Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos, permanecendo durante a maior parte do período experimental. Estes resultados mantiveram-se dentro das recomendações, indicando que a qualidade da água permaneceu constante durante os dias de observação. O sifonamento do fundo dos aquários e a renovação de água impediram o acúmulo de matéria orgânica, garantindo a manutenção da qualidade da água. Assim, a qualidade da água permaneceu dentro dos padrões adequados, segundo Sipaúba-Tavares (1995). De acordo com El Sayed e Kawanna (2004), as tilápias toleram amplas variações de temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e potencial hidrogeniônico (pH).

Entretanto, a manutenção de condições ambientais dentro da faixa de conforto, para essa espécie, é fundamental para o sucesso da tilapicultura intensiva (MUIR et al., 2000). Desta forma, infere-se que a qualidade da água teve pouca influência sobre os resultados obtidos de desempenho produtivo dos peixes alimentados com dieta suplementada com óleo de copaíba e própolis, em todas os seus níveis de inclusão. Os valores dos parâmetros podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos de qualidade de água durante o período experimental de Tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e própolis.

TRATAMENTOS / PARÂMETROS	Temperatura (C°)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Amônia Tóxica (mg/L)
G1	30,1 \pm 0,2a	5,6 \pm 1,19a	6,9 \pm 0,15a	165 \pm 4,5a	0,003 \pm 0,001a
G2	29,6 \pm 0,19a	4,8 \pm 1,69a	6,8 \pm 1,14a	166 \pm 5,61a	0,003 \pm 0,002a
G3	29,8 \pm 0,19a	6,1 \pm 1,14a	6,9 \pm 2,5a	168 \pm 6,47a	0,003 \pm 0,001a
G4	30,2 \pm 0,19a	5,9 \pm 0,99a	7,0 \pm 1,25a	178 \pm 3,51a	0,003 \pm 0,003a
G5	30,1 \pm 0,18a	4,9 \pm 1,15a	7,0 \pm 1,4a	166 \pm 3,92a	0,003 \pm 0,002a
G6	30,1 \pm 0,18a	4,9 \pm 0,88a	7,1 \pm 1,1a	169 \pm 8,81a	0,003 \pm 0,002a
G7	30,2 \pm 0,17a	4,6 \pm 1,66a	7,2 \pm 2,8a	167 \pm 5,69a	0,003 \pm 0,002a
G8	29,8 \pm 0,18a	4,7 \pm 1,12a	7,2 \pm 1,19a	169 \pm 3,12a	0,003 \pm 0,002a
G9	29,8 \pm 0,18a	4,1 \pm 1,17a	7,6 \pm 0,15a	173 \pm 6,14a	0,003 \pm 0,002a

pH = potencial hidrogeniônico. Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p>0,005$)

Os resultados do ensaio in vitro com as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* com o óleo de copaíba e própolis são apresentados nas

figuras 3 e 4. Houve formação evidente de halo nas dimensões médias $1,5 \text{ cm}$, $\pm 1,0 \text{ cm}$ e $1,3 \pm 0,2 \text{ cm}$, respectivamente.

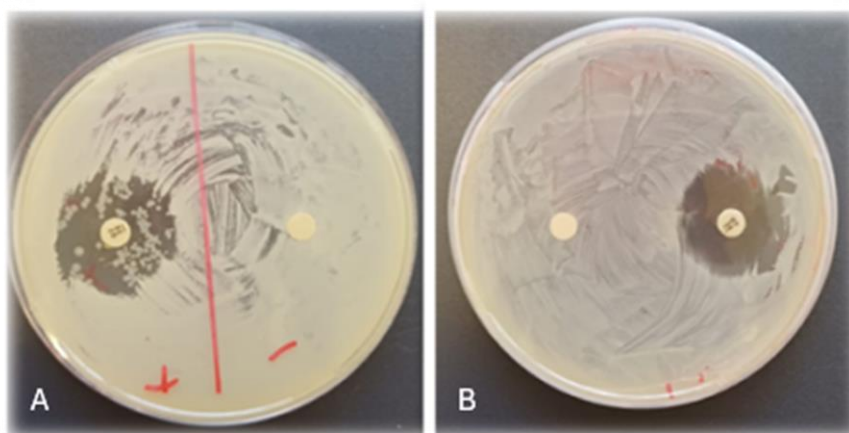


Figura 5. Resposta in vitro de *Aeromonas hydrophila* (A) e *Streptococcus agalactiae* (B). Controles positivo (com formação de halo) e negativo (sem formação de halo de inibição).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas contra as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* no ensaio in vitro. Porém, os halos de inibição dos aditivos contra *Streptococcus agalactiae* foram maiores em relação aos encontrados contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Sendo assim, a bactéria escolhida para que fosse realizada o desafio pós ensaio in vivo foi a *S. agalactiae*.

Tabela 2. Classificação da atividade bactericida do óleo de copaíba e própolis in vitro.

Bactéria	Inibição
<i>Streptococcus agalactiae</i>	++
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-

Os resultados deste estudo demonstraram que a combinação de própolis e óleo de copaíba foi altamente eficaz contra a bactéria *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria gram-positiva. Essa eficácia é atribuída às propriedades antimicrobianas sinérgicas desses compostos naturais.

Corroborando com os recentes achados, um estudo recente avaliou a atividade antimicrobiana in vitro do própolis contra várias cepas de bactérias gram-positivas e encontrou resultados semelhantes, destacando a eficácia do própolis na inibição do crescimento bacteriano (STÄHLI et al, 2021). Essa pesquisa sublinha o potencial do própolis como um agente antimicrobiano, especialmente contra

bactérias gram-positivas, reforçando a validade de nossos resultados experimentais.

A literatura sugere que os compostos fenólicos presentes no própolis desempenham um papel crucial na sua atividade antimicrobiana, interferindo na integridade da membrana celular bacteriana e inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas essenciais (Khameneh et al, 2019; Lahiri et al, 2019; Biharee et al, 2020) Quando combinados com o óleo de copaíba, que também possui propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, esses efeitos são potencializados, resultando em uma ação mais robusta contra *Streptococcus agalactiae*.

Portanto, a sinergia entre própolis e óleo de copaíba oferece uma abordagem terapêutica promissora para o controle de infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* e possivelmente outras bactérias gram-positivas. Essa combinação não só amplia o espectro de ação antimicrobiana, mas também reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, um problema crescente na terapêutica antimicrobiana, e, portanto, uma problemática na aquicultura recente.

Dentre os parâmetros de efeito no crescimento, a adição dos compostos óleo de copaíba e própolis afetou o parâmetro de peso final ao final de 12 semanas para o G4 (1PROP). Nas primeiras 9 semanas de experimento o efeito no crescimento não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p>0,05$), tabela 2 e figura 4.

Tabela 3. Média \pm desvio padrão para desempenho zootécnico de juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* submetido a suplementação dietética com óleo de copaíba e própolis por 80 dias.

	Parâmetros de Efeito no Crescimento (80 dias)					
	Peso final (g)	Ganho em peso (g)	TCE ⁽²⁾ (%/dia)	Biomassa final (g)	Ganho em biomassa (g)	Sobrevivência (%)
G1	144,06 \pm 12.6c	117,11 \pm 4,6	2,09 \pm 0,44	573,86 \pm 25,8	304,36 \pm 25,96	40 \pm 0,11
G2	163,81 \pm 9.8b	137,18 \pm 1,22	2,27 \pm 0,12	869,79 \pm 18,14	603,52 \pm 38,14	50 \pm 0,22
G3	164,59 \pm 16.15b	137,51 \pm 6.55	2,25 \pm 0,18	873,12 \pm 13,45	466,96 \pm 29,14	50 \pm 0,88
G4	177,32 \pm 12.13a	150,14 \pm 1,48	2,33 \pm 1,85	728,62 \pm 21,20	456,89 \pm 26,18	43 \pm 0,4
G5	168,14 \pm 6.28b	141,02 \pm 2,45	2,27 \pm 1,22	943,55 \pm 15,33	672,35 \pm 31,98	56 \pm 0,45
G6	158,85 \pm 13.15ab	131,81 \pm 3,78	2,20 \pm 1,99	1112,42 \pm 9,74	842,05 \pm 45,81	70 \pm 0,11
G7	159,73 \pm 10.01ab	132,83 \pm 13,41	2,22 \pm 2,41	870,78 \pm 26,28	601,82 \pm 51,18	53 \pm 0,11
G8	152 \pm 14.11ab	124,96 \pm 11,12	2,15 \pm 1,78	946,12 \pm 26,41	675,78 \pm 40,38	63 \pm 0,18
G9	161,28 \pm 11.45b	134,32 \pm 9,04	2,23 \pm 1,63	805,77 \pm 29,85	536,13 \pm 26,28	56 \pm 0,14
(F; p) ⁽¹⁾	2,59;0,0443*	0,74;0,649	0,71;0,67	0,42;0,88	0,57;0,78	0,25;0,97

(1) F: variável do teste, p: valores críticos; ⁽²⁾ TCE: crescimento específico. Letras distintas nas colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

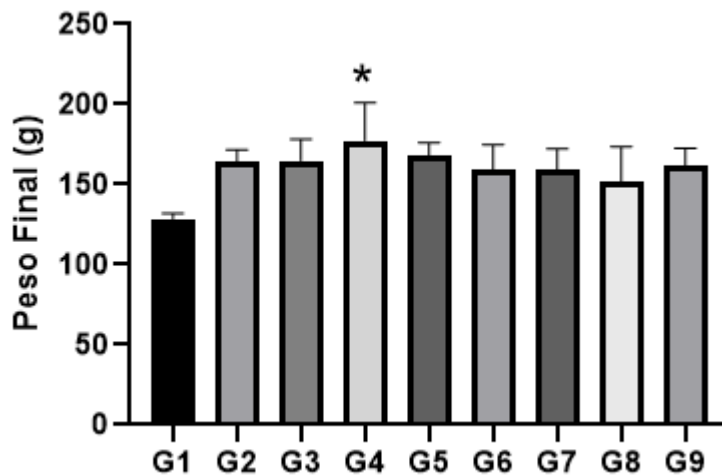


Figura 6 - Peso Final entre os grupos ao final do período experimental (80 dias). * indica o grupo com resultados estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a suplementação com 1% de própolis na dieta das tilápias levou ao aumento significativo no peso final dos peixes ao final de 12 semanas de experimento. Estes achados são consistentes com os resultados reportados em um estudo recente, onde a inclusão de 1 a 2% de própolis em ração comercial resultou em um aumento no peso final das tilápias após 160 dias de experimento (Alrashada et al, 2023).

A congruência entre os resultados de ambos os estudos sugere que a suplementação com própolis, independentemente do tempo de suplementação, potencializa o crescimento das tilápias. A própolis possui propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas que contribuem para a melhoria da saúde geral dos peixes, resultando em melhor desempenho no crescimento. Além disso, os compostos bioativos presentes na própolis melhoram a digestibilidade dos nutrientes e promovem um ambiente intestinal saudável, facilitando um crescimento mais eficiente do animal.

Esses achados destacam a potencialidade da própolis como suplemento alimentar benéfico para a aquicultura, promovendo não apenas a saúde, mas também o desempenho de crescimento dos peixes. A utilização de própolis na ração é uma estratégia eficaz para melhorar a produtividade e sustentabilidade na criação de tilápias, especialmente considerando os resultados consistentes em diferentes condições experimentais e períodos de suplementação.

Portanto, a suplementação com própolis apresenta-se como abordagem promissora para a aquicultura, oferecendo benefícios significativos tanto em termos de crescimento quanto de saúde dos peixes. A continuidade de pesquisas nesta área poderá aprofundar a compreensão dos mecanismos pelos quais a própolis exerce seus efeitos benéficos e otimizar as dosagens e formas de administração para maximizar os resultados.

As características hematológicas estão representadas nas tabela 4 e 5. A adição de óleo de copaíba e própolis à ração de tilápias do Nilo diferiu ao índice de Volume Corpuscular Médio do grupo G8 (1OC1PROP) ao final do período experimental (12 semanas), Figura 7.

Tabela 4. Valores médios das características hematológicas de *Oreochromis niloticus* alimentadas com ração aditiva de óleo de copaíba e própolis.

	Parâmetros hematológicos (80 dias)					
	Eritrócitos (10 ⁶ /mL)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg/cel)	CHCM (%)	Leucócitos (mL)
G1	2,68	8,5	107,51	36,78	34,18	121837
G2	3,25	9,4	84,65	27,21	31,88	268991a
G3	2,45	9,9	119,26	37,65	33,38	190094
G4	2,58	9,0	122,86	33,05	29,08	191250
G5	3,03	11,0	115,86	36,71	29,9	233820
G6	2,56	8,8	107,80	31,16	29,18	208158
G7	2,74	11,6	118,56	44,06	35,06	186561
G8	2,35	10,7	137,16a	46,71	33,75	164648
G9	7,54	12,4	116,19	47,66	38,01	190600
(F; p) ⁽¹⁾	1,01; 0,43	1,19;0,32	2,74;0,0147	1,79; 0,10	0,53; 0,82	2,71;0,0158

⁽¹⁾ F: variável do teste, p: valores críticos

Tabela 5. Distribuição percentual das células de defesa orgânica de Valores médios das características hematológicas de *Oreochromis niloticus* alimentadas com ração aditiva de óleo de copaíba e própolis.

	Células de defesa orgânica				
	Neutrófilo (%)	Linfócito (%)	Monócito (%)	Eosinófilo (%)	Basófilo (%)
G1	25,5±5,1	36,2±10,5	20,2±2,1	8,8±5,7	7,4±7,9
G2	20,9±5,3	50,3±1,3	19,6±0,3	3,7±3,6	5,8±3,4
G3	17,8±2,7	46,3±2,2	31,3±5,5	1,5±1,3	2,9±2,7
G4	19,4±2,5	51,4±9,1	25,4±2,3	1,2±0,7	8,3±4,6
G5	17,5±9,7	42,7±8,0	26±8,3	5,8±3,4	6,5±7,2
G6	13,9±8,3	47,6±6,6	28,4±8,2	3,5±3,3	5,9±4,7
G7	19,6±8,9	24,5±9,1	19,5±7,9	6,2±1,2	7,9±2,0
G8	19,4±3,9	39,9±5,5	26,3±8,3	5,7±4,2	9,5±6,1
G9	14,5±4,6	46,7±13,5	28,5±15,4	4,4±3,9	5,8±4,1
(F; p) ⁽¹⁾	0,0; 0,533	1,13; 0,38	0,88; 0,54	1,49; 0,22	0,41; 0,89

⁽¹⁾ F: variável do teste, p: valores críticos

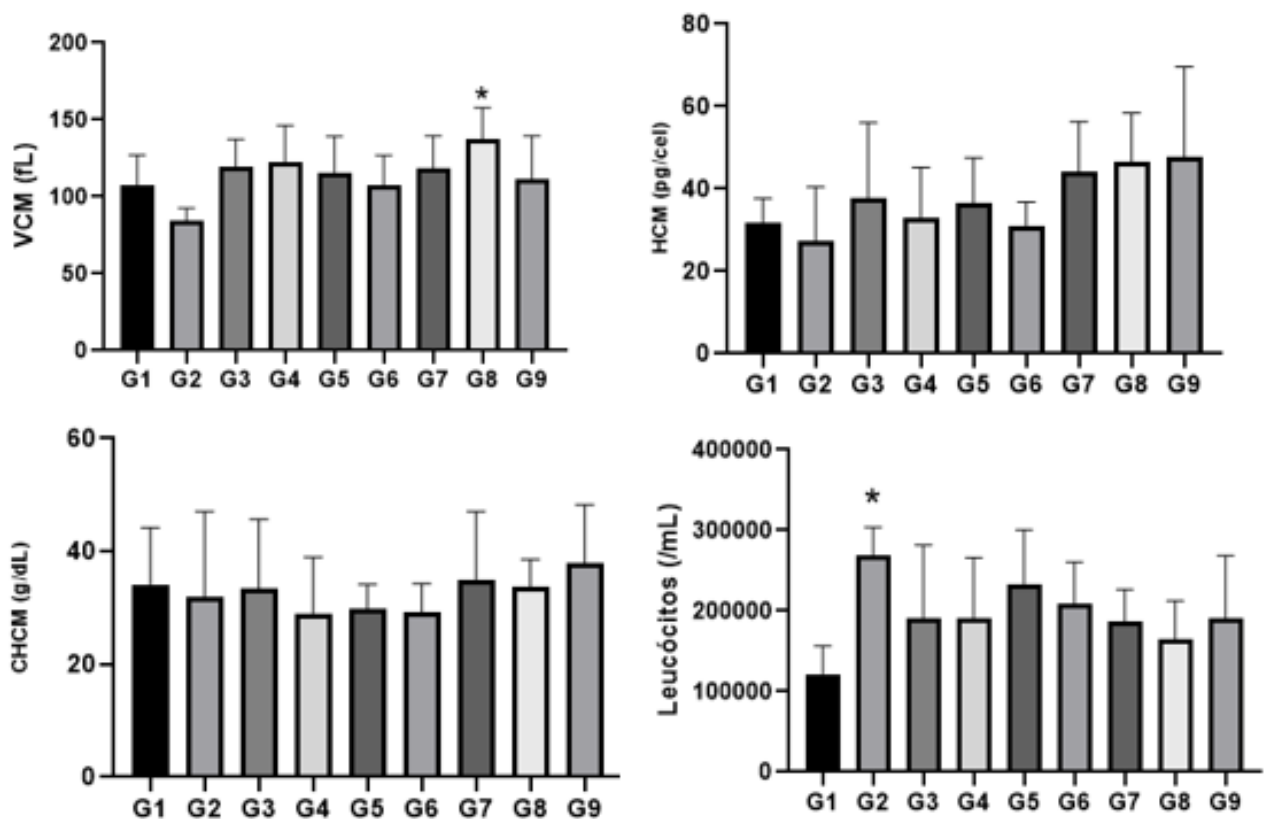


Figura 7 - Índices hematimétricos de tilápias do Nilo alimentadas com ração aditiva de óleo de copaíba e própolis. * representa o grupo com resultados estatisticamente significativos em relação aos outros grupos.

Os níveis inalterados de MCV, MCH, proteína total e albumina, os valores aumentados de glicose e as contagens mais baixas de monócitos em todos os

grupos no dia 7 provavelmente ocorreram devido ao manuseio dos peixes e não devido aos tratamentos. Outros estudos descreveram alterações hematológicas em peixes tratados com diferentes compostos fitoterápicos e em diferentes métodos de imuno estimulação e profiláticos de peixes. Por exemplo, Hashimoto et al. (2016) relataram uma redução nas contagens de hemácias e trombócitos e um aumento nos níveis de hematócrito e neutrófilos em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* que recebeu três banhos de imersão com 40 mg/L de *Lippia sidoides* (óleo essencial) por 10 min com um intervalo de 24 h entre os banhos. Além disso, *C. macropomum* banhado por 30 min com 150 mg/L de *Lippia alba* (óleo essencial) apresentou valores reduzidos de hemácias e hematócrito e aumento nos níveis de glicose, CHCM e trombócitos devido ao estresse (Soares et al., 2016).

Na análise da atividade respiratória de leucócitos, ou burst respiratório, aferiu-se que o G9 (1OC2PROP) diferiu-se estatisticamente em relação aos outros grupos ($p < 0,05$) nas primeiras 9 semanas de período experimental. A tabela 5 mostra os resultados deste parâmetro em relação às coletas sanguíneas de 9 e 12 semanas de experimento.

Tabela 6. Resultados obtidos com a análise de atividade respiratória de leucócitos "burst respiratório" em dois momentos do experimento, 9 e 12 semanas.

	Atividade Respiratória de Leucócitos "Burst respiratório"	
	9 semanas	12 semanas
G1	0,2673c	0,232
G2	0,5548ab	0,233
G3	0,59ab	0,334
G4	0,572ab	0,333
G5	0,589ab	0,326
G6	0,548b	0,288
G7	0,588ab	0,279
G8	0,588ab	0,286
G9	0,605a	0,272
F; p	5,49; 0,0001	1,37; 023

⁽¹⁾ F: variável do teste, p: valores críticos; Letras distintas nas colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

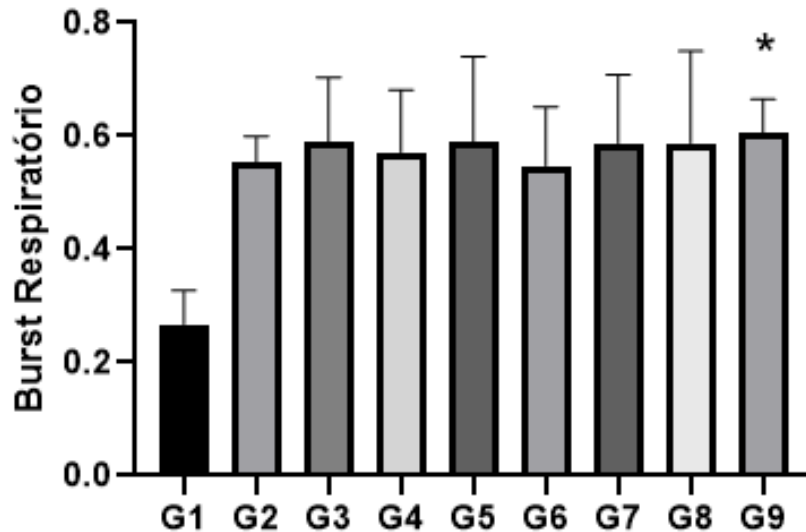
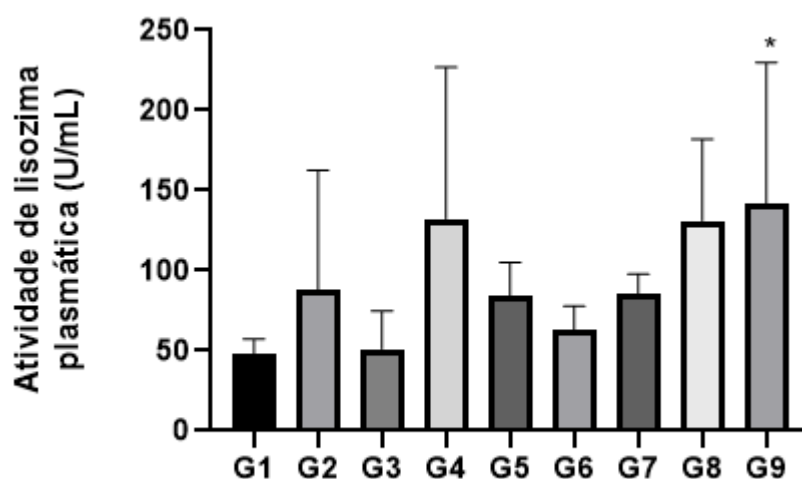


Figura 8 - Atividade respiratória de leucócitos, burst respiratório aos 60 dias de experimento.

É possível observar que os dados para a análise de burst respiratório às 9 semanas de experimento se manteve com resultados maiores aos realizados ao final do experimento, 12 semanas.

Foi observada diferença significativa na atividade da lisozima às 9 semanas de experimento, sugerindo impacto inicial da suplementação sobre este parâmetro imunológico. Por outro lado, na análise imunológica da atividade da lisozima realizada na semana 12, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.



Os resultados do desafio com a bactéria *Streptococcus agalactiae* são apresentados na figura 7. Para que fosse realizado o desafio bacteriano foram inoculados a concentração de $5,03 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ da bactérias *S. agalactiae* na proporção de 1mL para cada 100g de peso vivo dos peixes. Observou-se que os peixes que não receberam a suplementação apresentaram mortalidade de 100% no desafio experimental. A adição de óleo de copaíba e própolis, em conjunto, independentemente da concentração promoveu mortalidade mais tardia comparada ao grupo controle. Mas observa-se que a maior redução de mortalidade acumulada foi na suplementação com óleo de copaíba e própolis na proporção de 0,5% e 1%, respectivamente, por kg de ração (grupo 6). Este grupo apresentou um peixe que ficou vivo até 168 h.

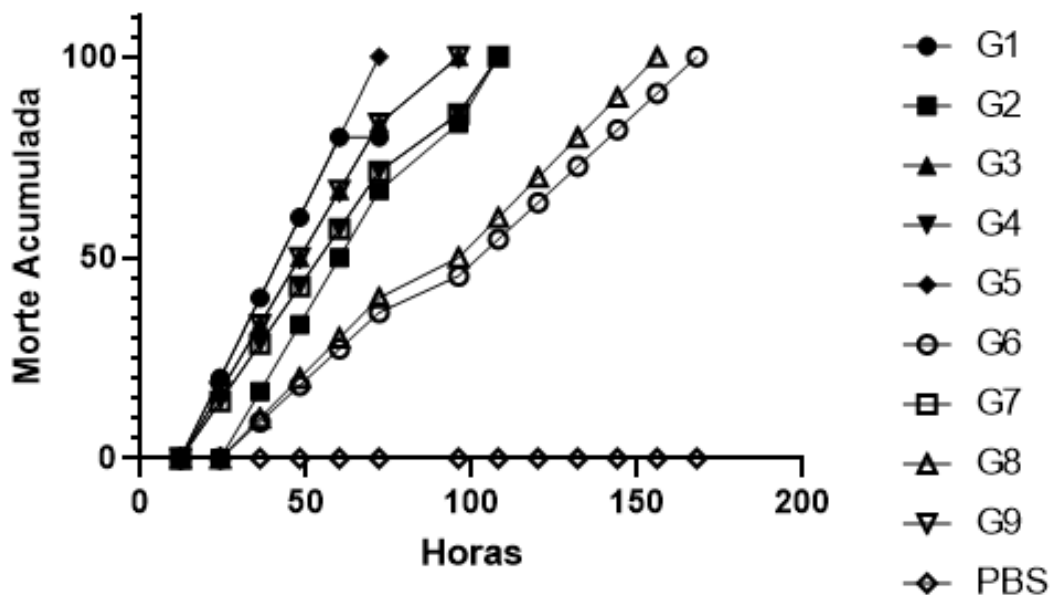


Figura 9 - Porcentagem de morte acumulada em tilápias do Nilo desafiadas com *Streptococcus agalactiae* após suplementação com óleo de copaíba e própolis.

A análise histopatológica do fígado das tilápias após 12 semanas de suplementação com óleo de copaíba e própolis, isoladas ou associadas revelou resultados promissores. No presente estudo, não foram observadas grandes lesões hepáticas na maioria dos grupos tratados, corroborando com as conclusões de estudos anteriores, como Mello et al (2024) e Dotta et al (2015) aferiram que tanto o óleo de copaíba como o própolis, nas concentrações utilizadas neste estudo, se mostraram seguros para a suplementação de tilápias do Nilo. As figuras 8 e 9 representam

estruturas hepáticas coradas com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff (PAS), respectivamente.

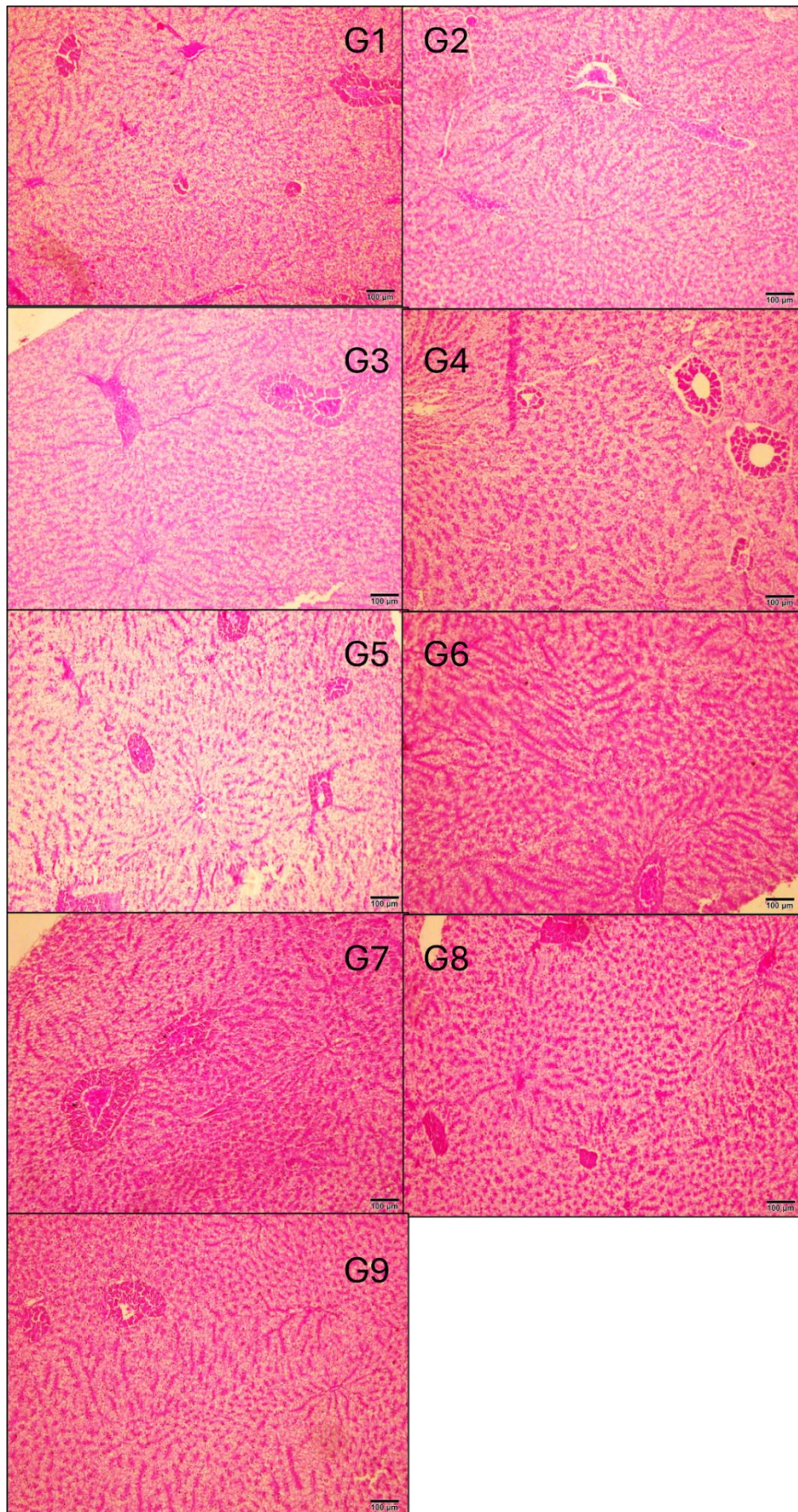


Figura 10. Histopatologia de fígados de tilápias suplementadas com óleo de copaíba e extrato de própolis, isolados e em associação. (Coloração: Hematoxilina- Eosina)

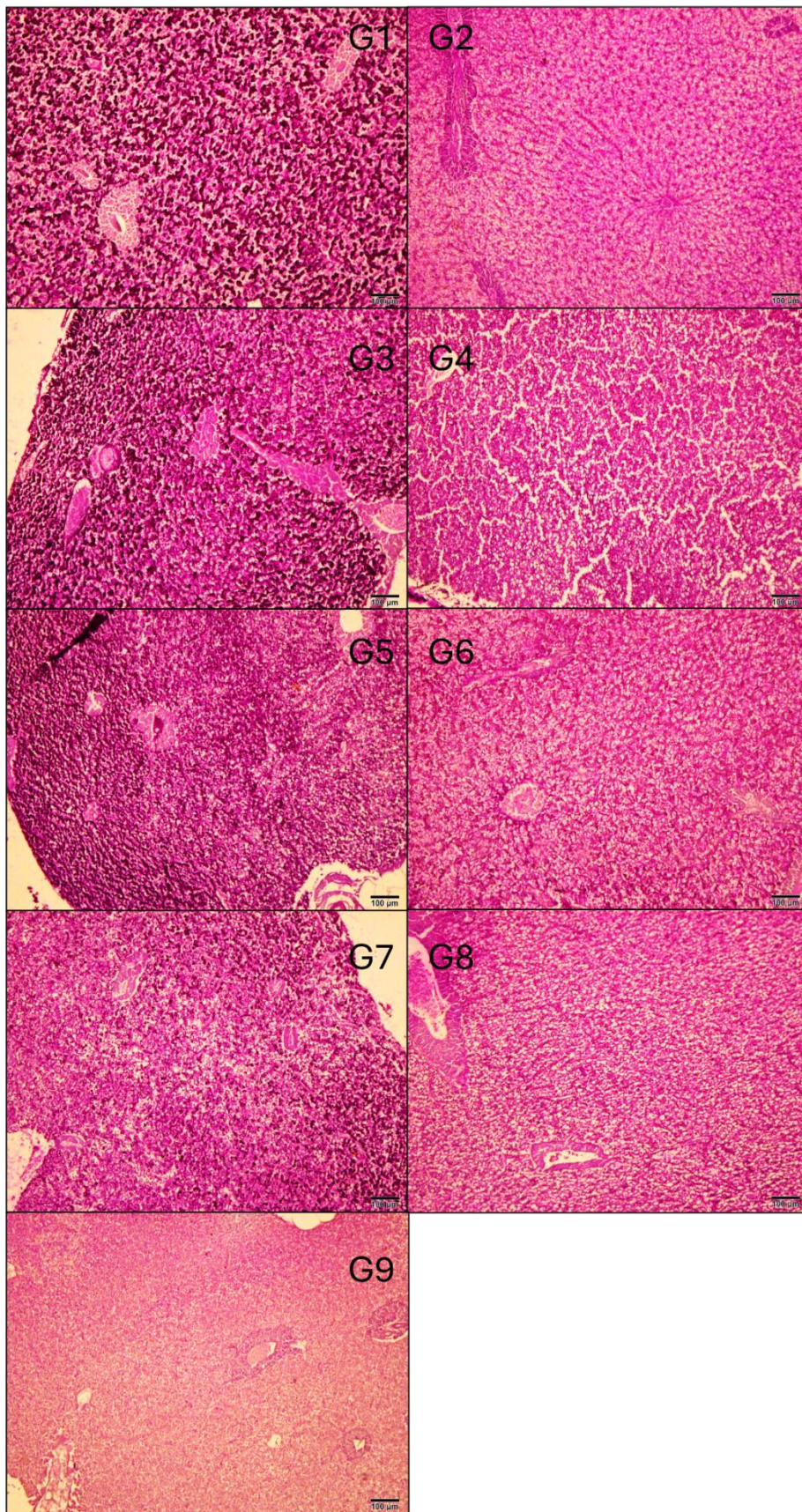


Figura 11. Histopatologia de fígados de tilápias suplementadas com óleo de copaíba e extrato de própolis, isolados e em associação. (Coloração: Acido Periódico de Schiff - Hematoxilina)

Indicou-se com estes resultados que o uso de óleo de copaíba não resultou em grandes lesões hepáticas, evidenciando a segurança deste composto na dieta dos peixes. Outro estudo, que avaliou o uso de própolis em concentrações semelhantes às utilizadas neste experimento, também não encontrou lesões significativas no fígado dos peixes, reforçando a segurança da própolis como suplemento alimentar (Alrashada et al, 2020).

Neste experimento, a suplementação combinada e isolada de óleo de copaíba e própolis não causou lesões hepáticas significativas, com exceção de um certo grau de esteatose observado em alguns grupos, especificamente nos grupos 4 e 9. A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de lipídios nos hepatócitos, foi leve e não comprometeu a função hepática de forma severa. Esse achado está relacionado ao metabolismo lipídico alterado devido à suplementação, mas não representa um efeito adverso grave.

Esses resultados sugerem que a utilização de óleo de copaíba e própolis, em concentrações adequadas, é segura para a saúde hepática das tilápias. A ausência de grandes lesões hepáticas e a presença apenas de esteatose leve indicam que esses compostos podem ser incorporados na dieta de tilápias sem causar danos hepáticos significativos, promovendo benefícios na saúde geral dos peixes.

Continuar a investigar os efeitos de longo prazo e em diferentes dosagens desses compostos fornece uma compreensão mais profunda sobre sua segurança e eficácia, garantindo a otimização de protocolos de suplementação na aquicultura.

A análise histomorfométrica da porção anterior do intestino mostrou diferenças significativas nos valores de altura total das vilosidades e largura do epitélio das vilosidades nos peixes alimentados com ração suplementada com óleo de copaíba e própolis (Tabela 7). O número de células caliciformes foi proporcional à altura de vilosidades intestinais. A integridade da mucosa intestinal medida pela altura e densidade dos vilos está relacionada com a renovação celular do epitélio da mucosa intestinal que indicou aumento no número de suas células epiteliais.

Tabela 7. Histomorfometria intestinal de tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaíba e própolis por 9 e 12 semanas.

	9 semanas								
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Comprimento da vilosidade (μm)	237,6 \pm 47,5	202,9 \pm 47,1	228,5 \pm 50,5	309,9 \pm 28,8	245,8 \pm 58,3	353,5 \pm 51,3	285,8 \pm 41,8	298,1 \pm 39,6	330,2 \pm 54,8
Largura da vilosidade (μm)	46,3 \pm 11,7	45,4 \pm 9,71	38,4 \pm 15,2	53,5 \pm 11,6	51,8 \pm 15,4	52,4 \pm 11,5	53,5 \pm 5,9	49,4 \pm 11,3	54,05 \pm 9,1
Número de células caliciformes	52,1 \pm 15,4	68,3 \pm 18,5	66,3 \pm 15,7	79,5 \pm 12,1	54,1 \pm 14,2	58,7 \pm 15,8	66,9 \pm 14,8	71,7 \pm 14,5	75,9 \pm 11,8
	12 semanas								
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Comprimento da vilosidade (μm)	278,8 \pm 39,8	288,4 \pm 28,9	280,1 \pm 57,1	390,7 \pm 41,6	262,5 \pm 45,3	268,8 \pm 82,1	264,1 \pm 32,8	253,4 \pm 25,8	306,3 \pm 10,2
Largura da vilosidade (μm)	463,9 \pm 12,7	532,1 \pm 9,5	47,6 \pm 6,9	61,4 \pm 10,1	59,9 \pm 12,1	49,1 \pm 7,8	44,1 \pm 8,9	50,1 \pm 11,7	59,6 \pm 10,26
Número de células caliciformes	60,8 \pm 12,1	61,8 \pm 12,5	59,6 \pm 14,8	83,9 \pm 10,8a	69,8 \pm 9,8	68,7 \pm 6,8	72,8 \pm 10,8	75,9 \pm 14,8	81,8 \pm 12,8a

A contagem do número de células caliciformes (Tabela 7) apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Nos peixes que receberam a suplementação, com própolis e este associado a óleo de copaíba, G4 (1PROP) e G9 (1OC2PROP), o número de células caliciformes foi significativamente maior que o observado no grupo controle e outros grupos.

O número de células caliciformes foi proporcional à altura de vilosidades intestinais. As células caliciformes proliferam-se para aumentar a produção de muco quando ocorre a agressão por agentes patogênicos (SCHWARZ et al, 2010). Assim, a adição dos compostos fitoterápicos à ração favoreceu o aumento do número de células caliciformes contribuindo para a defesa contra a ação de bactérias prejudiciais à mucosa.

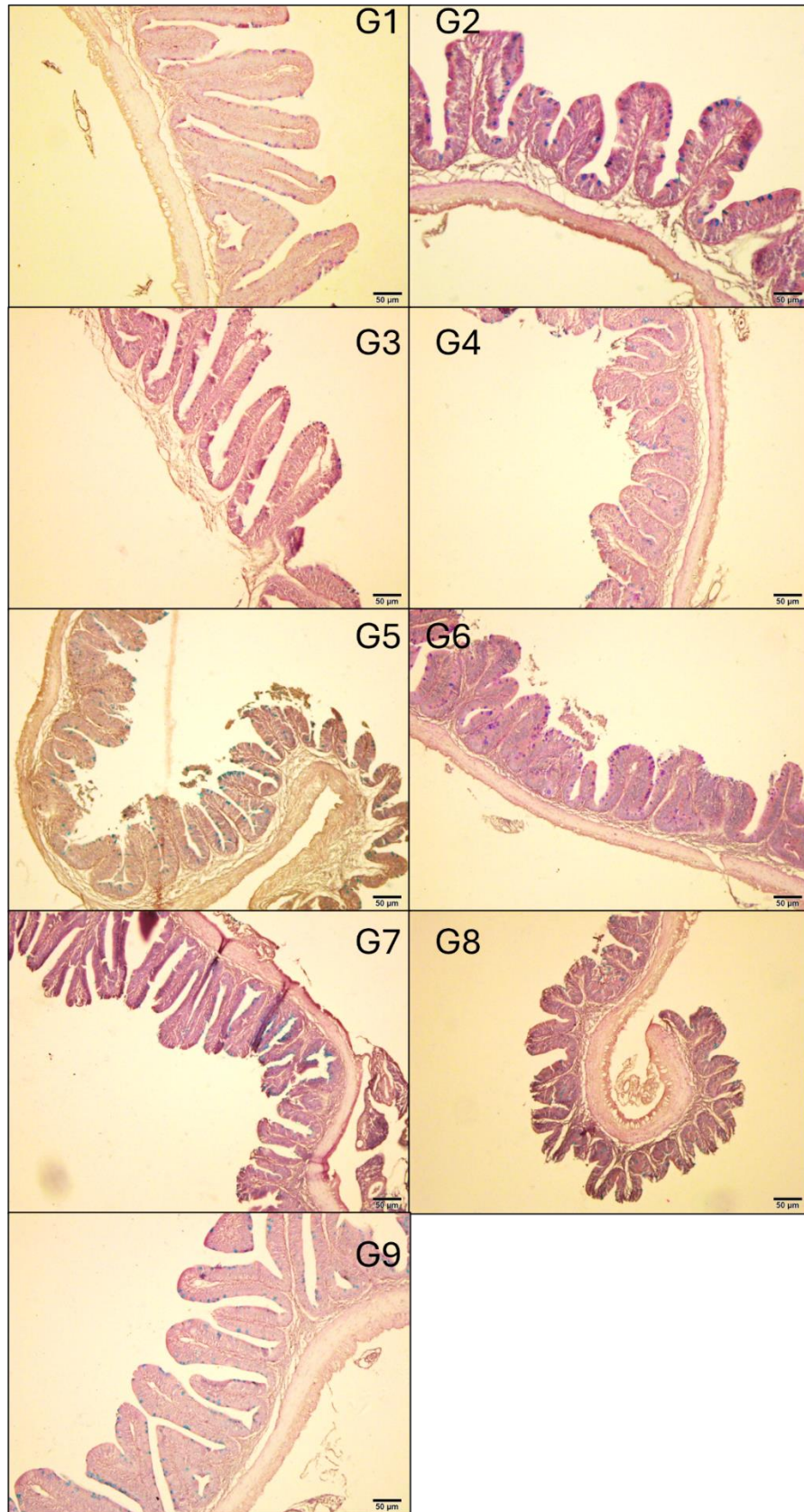


Figura 12. Intestinos de tilápias do Nilo suplementadas com óleo de copaiba e extrato de própolis com destaque para as células caliciformes em Azul Alcian. (Coloração: Alcian Blue pH 2,5)

CONCLUSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da suplementação com óleo de copaíba e extrato de própolis no sistema imunológico, no crescimento e na proteção contra infecções de tilápias. Os resultados obtidos demonstram que ambos os compostos, isolados ou em associação, tiveram um impacto positivo significativo na resposta imunológica, evidenciado por marcadores imunológicos melhorados. Além disso, esses compostos demonstraram efeito protetivo contra a infecção pelo *Streptococcus agalactiae*, uma patologia comum e prejudicial à piscicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNHA, R. M. G. .; SANCHES, D. de S. .; ALMEIDA, R. G. dos S. .; OLIVEIRA, F. C. .; SOARES, M. P. .; DAVALO, M. R. S. .; SILVA, M. E. V. M. da .; OLIVEIRA, K. K. C. de .; CAMPOS, C. M. de . The use of immunomodulators in fish feed: A review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e11312440964, 2023.

ALRASHADA, Yousof N. et al. Dietary propolis improves the growth performance, redox status, and immune response of Nile tilapia upon a cold-stress challenge. **Plos one**, v. 18, n. 11, p. e0293727, 2023.

AMAR E.; KIRON V.; SATOH S.; WATANABE T. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquacult. res.** V. 32, p. 162–173. 2001.

BELO M.; SCHALCH S.; MORAES F.; SOARES V.; OTOBONI A.; MORAES, J. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.146-54, 2005.

BELO DA, MORAES JRE, SOARES VE. MARTINS ML, BRUM CD, MORAES FR. D. 2012. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V.47(7), p.1015-1021.

BIHAREE, Avadh et al. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104720, 2020.

BRANDÃO F.; GOMES L.; CHAGAS E. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaimagigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amaz.** V. 36, p. 349–356. 2006

BOZZO, F. R. .; DA SILVA CLAUDIANO, G. .; AGUINAGA, JEFFERSON YUNIS .; MARCUSSO, P. F. .; ENGRÁCIA FILHO, JAIR R. .; Moraes J.R.E. . Effects of supplementation with vitamins C and E on the acute inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus*. **CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA**, v. 04, p. 73661, 2023.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.

CAVALCANTE, R. **Fitodontologia**. 1. Ed. Rio Branco, 2013. 267p.

CHAGAS, E; MAJOLO, C; BOIJINK, C.; CHAVES, F.; HASHIMOTO, G.; FIGUEREDO, A. & MARTINS, M. Uso de óleos essenciais e extratos no tratamento

de enfermidades de peixes. In: Maldi RR, Campos CM, Lizama MAP, Takemoto RM, responsabilidade intelectual. **Patologia e sanidade de ambientes aquáticos**. Maringá: Editora Massoni, p.269, 2014.

CLAUDIANO G.; DIAS NETO J.; SAKABE R. et al. Eficácia do extrato aquoso de "*Terminalia catappa*" em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Rev. Bras. Saúde Prod Anim.** V. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

COMAR, J.C.; DE SÁ-NAKANISHI, A.B.; DE OLIVEIRA, A.L.; WENDT, M.M.N.; BERSANI-AMADO, C.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; PERALTA, R.M.; BRACHT, A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.58, p. 144-153, 2013.

DOTTA, G.; BRUM, A.; JERONIMO, G. T.; MARASCHIN, M.; LATERÇA, M. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 66–71, jan. 2015.

EL-SAYED A. **Tilapia culture**. p. 277. London: Cabi. 2006.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. p. 197. Rome. 2022.

GATLIN D. Nutrition and fish health. Em: **Fish Nutrition**. Halver J. & Hardy R. (eds.), 3rd edition. London: Academic Press. p. 671-702. 2002.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, p. 9099–9104, 2008.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. da C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne, **J. Ethnopharmacol.**, v.128, p. 177–183. 2010.

HASHIMOTO, G.S.O.; NETO, F.M.; ACHCHILE, M.L.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, 450, pp. 182-186, 2016.

IBRAHEM M.; FATHI M.; MESALHY S.; EL-ATY A. 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunol.** 29, 241-246.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; FAZLY BAZZAZ, B.S. Review on

plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrob Resist Infect Control**. 2019

KOVALAKOVA, P.; CIZMAS, L.; MCDONALD, T. J.; MARSALEK, B.; FENG, M., & SHARMA, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, v. 251, p. 126351, 2020.

LAHIRI, Dibyajit et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of biosciences**, v. 44, n. 2, p. 52, 2019.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, A. K. L. S.; ALENCAR, L. B. B.; TINTINO, S. R.; FERREIRA, J. V. A.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H. D. M. In vitro cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P. de; BORILLE, B. T.; DIAS, D. de O.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA Jr., V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaíba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144-148, 2015.

LUNA, Lee G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. In: Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. p. xii, 258-xii, 258, 1968.

MAFRA, J.F.; DE SANTANA, T.S.; CRUZ, A.I.C.; FERREIRA, M.A.; MIRANDA, F.M.; ARAÚJO, F.M.; RIBEIRO, P.R.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S. Influence of red propolis on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of tilapia (*Oreochromis niloticus*) salami. **Food Chem**, p.15;394:133502, 2022.

MARTINS M.; VIEIRA F.; JERÔNIMO G.; MOURIÑO J.; DOTTA G.; SPECK G.; JATOBÁ A.; PEDROTTI F.; BUGLIONE-NETO C.; PEREIRA G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus sp*. **FishPhysiol Biochem**. V.35, p. 219-222. 2009.

MORAES F.; MARTINS M. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva, In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSI, D.M. et al. (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.343-383.

MORAES F.; MORAES J. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa. p. 625-723. 2009.

NG, W.& ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Rev Aquac.** V.5(4), p: 220–54, 2013.

ONU. Organização das Nações Unidas. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável.** 2015.

PEREIRA, D.P.; SANTOS, D.M.S.; CARVALHO NETA, A.V.; CRUZ, C.F.; CARVALHO NETA, R.N.F. Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil), **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.4, p.1213- 21, 2014.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. et al. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30,n.4, p.583-91, 2004.

SALAS, G.; VIDAL DEL RIO, M. & CONCEPCION, P. Uso intensivo de antibióticos profiláticos en la acuicultura: un problema creciente para la salud humana y animal. **Revista Universidad y Sociedad**, v. 13(S2), p. 204-210, 2021

SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.52 (2), p.135-143, 2018.

SANTOS, E.F.; TAVARES-DIAS, M.; PINHEIRO, D.A.; NEVES, L.R.; MARINHO, R.G.B.; DIAS, M.K.R. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amazônica**, v.43, n.1, p.105-12, 2013.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; AGALHAES, G.; LIMA, J.; BRUNS, V.; JUNIOR, A. J. A.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades – BNDES Setorial. 2012.

SILVA, G.H. Ecoeconomia e pesca esportiva: o meio ambiente como oportunidade sustentável de negócios, Santos-Brasil. 2017, 131f. Dissertação (Mestrado em Direito Ambiental) - Universidade Católica de Santos, Santos, 2017.

SMITH V.; BROWN J.; HAUTON C. Immunostimulations in crustaceans, does it really protect against infection?. **Fish. shellfish immun.** V. 15, p. 71-90. 2003.

SOARES B.V.; NEVES, L.R.; OLIVEIRA, M.S.B.; CHAVES, F.C.M.; CHAGAS, M.K.R.; DIAS, E.C.; CHAGAS, M. T. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia*

alba on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, 452, pp. 107-114, 2016.

SORUM H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. p. 213-238. 2006. VAINIKKA A.; JOKINEN E.; KORTET R.; PAUKKU S. PIRHONEN J.; RANTALA, M.; TASKINEN J. Effects of testosterone and B-glucan on immune function in tench. **J.Fish Biol.** V. 66, p. 348-361. 2005.

SCHWARZ K.K.; FURUYA W.M.; NATALI M.R.M.; MICHELATO M. & GUALDEZI M.C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de Tilápias-do-Nilo. **Acta Scient., Anim. Sci.** 32(2):197-203, 2010.

STÄHLI, A.; SCHRÖTER, H., BULLITTA, S., SERRALUTZU, F., DORE, A., NIETZSCHE, S. & EICK, S. In vitro activity of propolis on oral microorganisms and biofilms. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1045, 2021.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005.

WAMBUA D., HOME PG, RAUDE J. & ONDIMU S. Environmental and energy requirements for different production biomass of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in recirculating aquaculture systems (RAS) in Kenya. **Aquac Fish.** V. 6(6), p: 593-600. 2021

YUNIS-AGUINAGA, J., CLAUDIANO, G. S., MARCUSSO, P. F., MANRIQUE, W. G., DE MORAES, J. R. E., DE MORAES, F. R., & FERNANDES, J. B. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. **Fish shellfish immunol**, V.47(1), p.630-638. 2015

ZIMMERMAN S.; FITZMMONS K. Tilapicultura intensiva. Em: CYRINO, J.; URBINATI E.; FRACALOSSO, D. et al (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Campo Belo: Tecart. p. 239-266. 2004.