



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE - OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PÓLEN EM DIETAS PARA
ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO
EM SISTEMA DE
RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA:
DESEMPENHO E
HISTOMORFOMETRIA HEPATO-
INTESTINAL**

FERNANDA PICOLI

CHAPECÓ, 2019

FERNANDA PICOLI

**PÓLEN EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO EM SISTEMA DE
RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA: DESEMPENHO E HISTOMORFOMETRIA
HEPATO-INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de
Concentração Ciência e Produção Animal, da
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),
como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Zootecnia

**Orientador: Maurício Gustavo Coelho
Emerenciano**

Co-orientador(s): Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Chapecó, SC, Brasil
2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Picoli, Fernanda

Pólen em dietas para alevinos de tilápia-do-Nilo em sistema de recirculação de água: desempenho e histomorfometria hepato-intestinal / Fernanda Picoli. -- 2019.
65 p.

Orientador: Maurício Gustavo Coelho Emerenciano
Coorientador: Diogo Luiz de Alcantara Lopes
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2019.

1. Aditivo. 2. Imunoestimulante. 3. Nutrição animal. 4. Tilapicultura. I. Emerenciano, Maurício Gustavo Coelho. II. Lopes, Diogo Luiz de Alcantara. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PÓLEN EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO EM SISTEMA DE
RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA: DESEMPENHO E HISTOMORFOMETRIA
HEPATO-INTESTINAL**

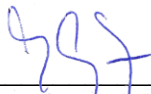
Elaborada por
Fernanda Picoli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

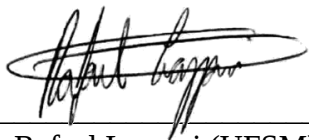
Comissão Examinadora:



Diogo Luiz de Alcantara Lopes (UDESC-CEO)



Thiago El Hadi Perez Fabregat (UDESC - CAV)



Rafael Lazzari (UFSM)

Chapecó, 15 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por nunca ter me permitido desistir em meio aos obstáculos.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo de sempre e amor incondicional. Vocês são minha motivação diária!

A minha irmã Paula que sempre esteve ao meu lado, minha fiel cúmplice.

Ao Márcio, pela paciência, respeito e compreensão.

Aos meus orientadores, Prof. Maurício e Prof. Diogo, que ao longo dessa caminhada sempre estiveram prontos a me orientar, auxiliar e contribuir profissional e pessoalmente.

Ao Prof. André e todos os colaboradores da UNIBAVE pelas portas abertas e ajuda para a realização dessa pesquisa.

A UDESC e todos os professores pela oportunidade e apoio, afinal, entre idas e vindas, já são dez anos de parceria.

Aos colegas de mestrado e amigos feitos nessa jornada e aos de longa data.

A palavra que resume tudo isso é...

GRATIDÃO!

Agradeço a FUMDES – UNIEDU pela bolsa de iniciação científica e apoio, possibilitando a conclusão deste trabalho.



“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.
(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

PÓLEN EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO EM SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA: DESEMPENHO E HISTOMORFOMETRIA HEPATO-INTESTINAL

AUTOR: Fernanda Picoli

ORIENTADOR(A): Maurício Gustavo Coelho Emerenciano

CO-ORIENTADOR (A): Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Chapecó, 15 de fevereiro de 2019.

RESUMO: Com o aumento da demanda mundial de pescado, a eficiência dos sistemas de produção aquícola é fundamental. O sistema de recirculação de água (RAS) é uma alternativa viável e ecologicamente sustentável à aquicultura tradicional, com reduzido impacto ambiental e reciclagem de água através de tratamento de resíduos. Fatores ligados à condição nutricional e à saúde dos animais reforçam a necessidade de investigar melhorias nas formulações das dietas. Neste sentido, o pólen apícola é um aglomerado de pólen das flores misturado com néctar e secreções glandulares das abelhas, rico em aminoácidos essenciais e polissacarídeos solúveis, além de ser uma excelente fonte de flavonóides, carotenóides, compostos fenólicos, esteróis e minerais. Por sua capacidade de fortalecer o sistema imunológico, ação antioxidante e outros efeitos terapêuticos interessantes como: antimicrobiano, antifúngico, hepatoprotetor, quimiopreventivo e anti-inflamatório, este aditivo é uma excelente alternativa para melhoria das dietas aquícolas. Diversos estudos têm sido realizados com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) avaliando diferentes aditivos alimentares, mas são escassos os trabalhos que avaliam o efeito do pólen sobre o desempenho e parâmetros intestinais e hepáticos da espécie em RAS. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a inclusão de níveis de pólen apícola no desempenho zootécnico e histomorfometria hepato-intestinal de alevinos de tilápia do Nilo. Foram utilizados 225 alevinos de tilápia ($1,253 \pm 0,056$ g), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em 15 tanques (30 L) mantidos em sistema de recirculação de água com três tratamentos (níveis de inclusão 0% ou controle, 1,5% e 2,5% de pólen) e cinco repetições. As taxas de arraaçamento foram definidas a partir das biometrias semanais e realizado monitoramento periódico dos parâmetros físico-químicos da água. As variáveis da qualidade da água se mantiveram dentro do adequado para a espécie durante todo o experimento. Não houve diferença significativa para os índices somáticos e de desempenho zootécnico nesse experimento. A inclusão de pólen na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo ocasionou aumento linear na morfologia dos hepatócitos ($p=0,0098$). Para as variáveis intestinais de altura de vilosidades, observou-se aumento significativo linear ($p<0,05$) conforme aumentava a inclusão de pólen, já para largura e espessura, não houveram alterações significativas. Nos peixes que receberam 2,5% de pólen, o número de células caliciformes foi significativamente maior ($p<0,001$) que o observado no grupo controle e no 1,5%. Recomenda-se a inclusão de até 2,5% de pólen apícola em dietas aquícolas comerciais para alevinos de tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Aditivo, Imunoestimulante, Nutrição animal, Tilapicultura.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

POLLEN IN DIETS OF NILO TILAPIA IN A RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM: PERFORMANCE AND HEPATO- INTESTINAL HISTOMORPHOMETRY

AUTHOR: Fernanda Picoli
ADVISER (A): Maurício Gustavo Coelho Emerenciano
CO-ADVISER (A): Diogo Luiz de Alcantara Lopes
Chapecó, february 15, 2019.

Abstract: With the increase in world demand for fish, the efficiency of aquaculture production systems is fundamental. The recirculation aquaculture system (RAS) is a viable and ecologically sustainable alternative to traditional aquaculture with low environmental impact and water recycling through waste treatment. Factors related to nutritional status and animal health reinforce the need to investigate improvements in diet formulations. In this sense, bee pollen is a cluster of flower pollen mixed with nectar and glandular secretions of bees, rich in essential amino acids and soluble polysaccharides, as well as being an excellent source of flavonoids, carotenoids, phenolic compounds, sterols and minerals. For its ability to strengthen the immune system, antioxidant action and other interesting therapeutic effects such as: antimicrobial, antifungal, hepatoprotective, chemopreventive and anti-inflammatory, this additive is an excellent alternative for improving aquaculture diets. Several studies have been carried out with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) evaluating different feed additives, but there are few studies evaluating the effect of pollen on performance and intestinal and hepatic parameters of the species in RAS. This work was carried out with the objective of evaluating the inclusion of bee pollen levels on the zootechnical performance and hepato-intestinal histomorphometry of Nile tilapia fingerlings. A total of 225 tilapia fingerlings ($1,253 \pm 0,056$ g) were distributed in a completely randomized design (DIC) in 15 tanks (30 L) maintained in a RAS system with three treatments (0% inclusion levels or control, 1.5% and 2.5% inclusion and five replicates. Feeding rates were defined from the weekly biometrics and periodic monitoring of the physical-chemical water quality parameters. The water quality variables remained within the appropriate range for the species throughout the experiment. There was no significant difference for the somatic indexes and zootechnical parameters in this experiment. However, the inclusion of pollen in Nile tilapia fingerlings showed a linear increase in hepatocyte morphology ($p = 0.0098$). For the intestinal variables of villus height a significant linear increase was observed ($p < 0.05$) as the pollen inclusion increased, already for width and thickness, there were no significant alterations. In fish that received 2.5%, the number of goblet cells was significantly higher ($p < 0.001$) than control group and 1.5%. It is recommended to include 2.5% bee pollen in commercial aquaculture diets for Nile tilapia fingerlings.

Key words: Additive, Immunostimulant, Animal nutrition, Tilapia farming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mensuração das vilosidades (μm) da porção proximal da parede intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo.	33
Figura 2. Contagem do número de células caliciformes (unidade) da porção proximal da parede intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo.	33
Figura 3. Mensuração da área média dos hepatócitos ($\text{AMH}/\mu\text{m}^2$) do fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo.	34
Figura 4. Área média dos hepatócitos ($\text{AMH}/\mu\text{m}^2$) de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola.	36
Figura 5. Contagem do número de células caliciformes (CC) de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola.	37
Figura 6. Variáveis hepáticas e intestinais de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta base utilizada para a inclusão de pólen apícola em rações comerciais extrusadas para alevinos de Tilápia-do-Nilo.....	30
Tabela 2. Médias ($\pm$) de parâmetros zootécnicos e índices somáticos de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com pólen apícola.	35
Tabela 3. Histomorfometria intestinal de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com pólen apícola.....	37

ANEXOS

Figura 1. Esquema do dispositivo experimental.....	62
Figura 2. Pólen apícola utilizado no experimento.	63
Figura 3. Biometria realizada no experimento.	63
Figura 4. Coleta e pesagem dos órgãos.	64
Figura 5. Preparo das amostras intestinais e hepáticas para análises histológicas.	64
Figura 6. Amostras intestinais e hepáticas para análises histológicas.	65
Figura 7. Equipe de trabalho - UNIBAVE.	65

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	12
1.1. AQUICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA	12
1.1.1 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA.....	14
1.1.2 TILÁPIA E FASE DE ALEVINAGEM	15
1.1.3 DIETAS AQUÍCOLAS E USO DE ADITIVOS	18
1.1.4 PÓLEN APÍCOLA – CARACTERIZAÇÃO E USO NA NUTRIÇÃO ANIMAL	19
1.2 OBJETIVOS	23
1.2.1 Geral	23
1.2.2 Específicos.....	23
1.3 HIPÓTESE	24
2. CAPÍTULO II	25
2.1. ARTIGO I	25
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
4. RECOMENDAÇÕES E FUTURAS PESQUISAS	50
5. REFERÊNCIAS	50
CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA.....	61
ANEXOS	62

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

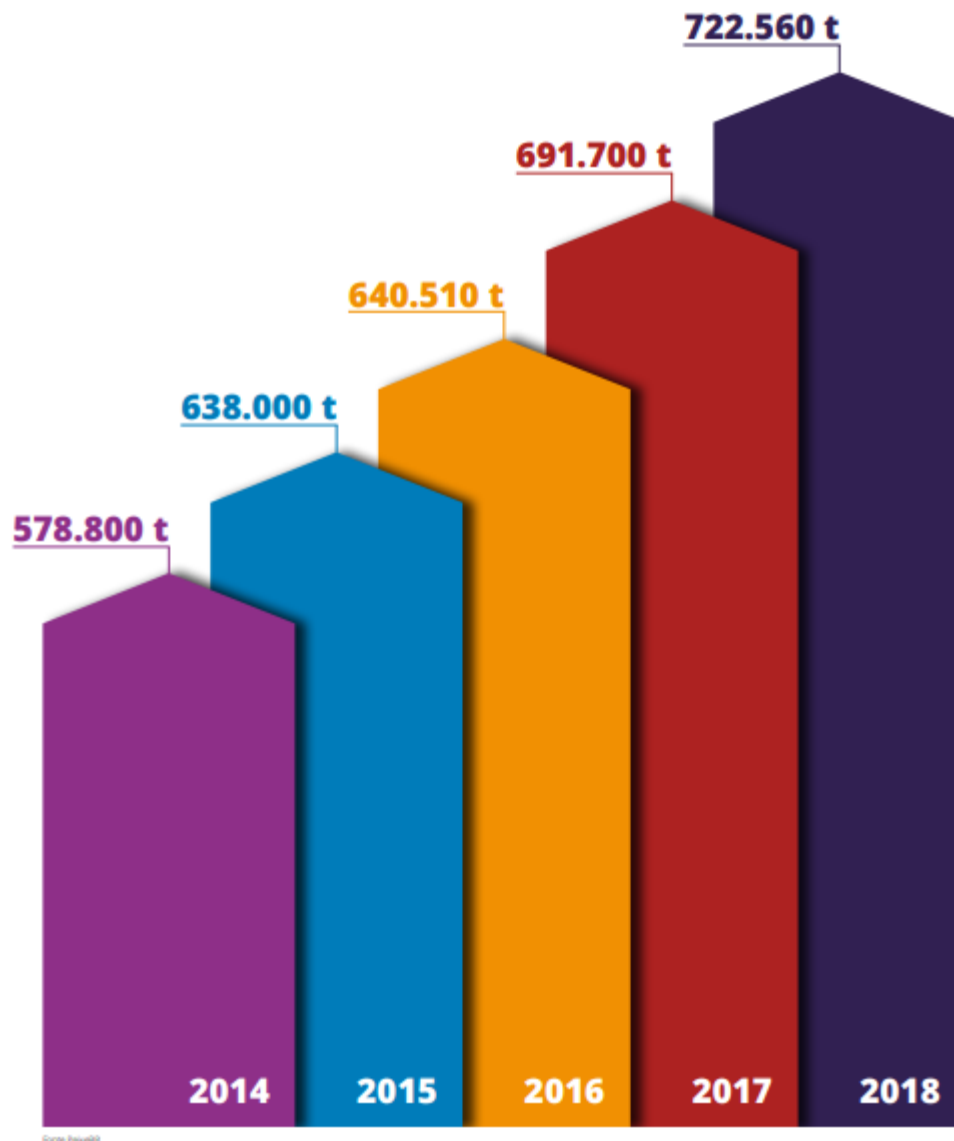
1.1. AQUICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA

A atividade aquícola contribui cada vez mais para a produção mundial de alimentos com índices produtivos crescentes. Por ser a atividade agropecuária que apresentou maior crescimento nos últimos anos, a aquicultura oferece potencial suficiente para suprir a demanda crescente de proteínas de origem animal (FAO, 2018). Essa demanda justifica-se também pela estagnação da pesca, importante setor que abastece globalmente este mercado, mas que desde a década de 90 vem sofrendo repetitivas quedas em produção (FAO, 2014), incentivando os produtores aquícolas a investirem cada vez mais na atividade, bem como, na intensificação da mesma (MPA, 2015).

Segundo o IBGE (2015), o consumo de peixe por habitante/ano em nosso país é de 14,4 kg, mantendo-se abaixo da média de consumo mundial (20 kg), mas acima do recomendado pela FAO que são 12 kg. Adicionalmente, de acordo com estimativas da FAO (2016), o Brasil deverá dobrar sua produção aquícola (104%) até o ano de 2025, se colocando à frente de países como Argentina e México, que devem apresentar crescimento de 53,9% e 54,2%, respectivamente.

A piscicultura do país cresceu aproximadamente 8% no ano de 2017, alcançando 691,7 mil toneladas, ante 640,5 mil toneladas de peixes no ano de 2016. Já no ano de 2018, essa produção aumentou para 722.560 toneladas de peixes, com crescimento de 4,5% em relação ao ano anterior (PEIXEBR, 2019). A produção de peixes nacional entre os anos 2014 e 2018 encontra-se nas Figura 1 abaixo:

Figura 1. Crescimento da piscicultura nacional entre os anos 2014 e 2018.



Fonte: PEIXEBR (2019). Disponível em:
<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>? Acesso em 15 de fev. de 2019.

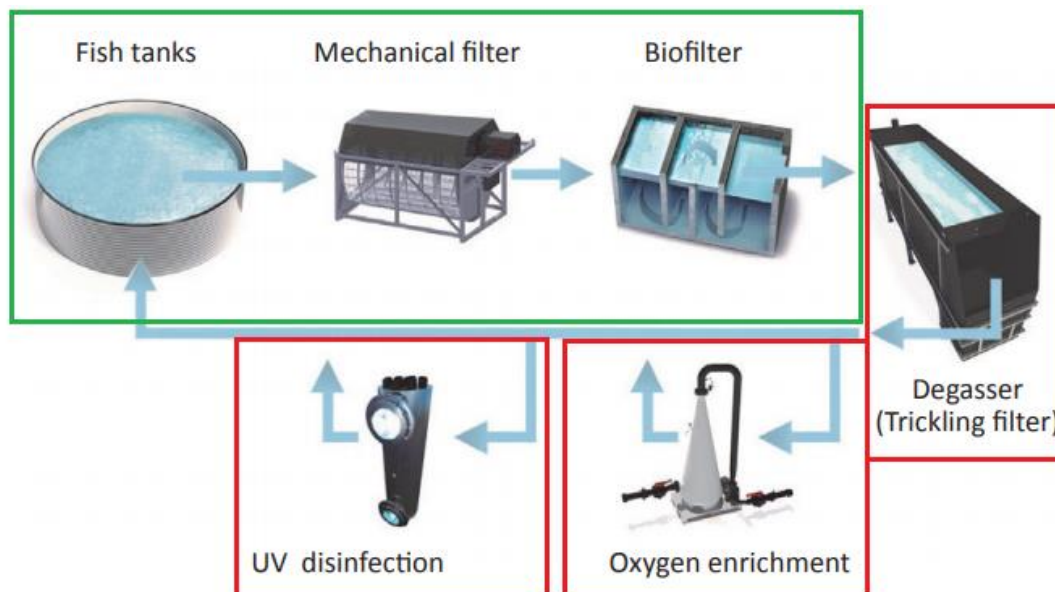
De forma a suprir o aumento da demanda mundial de pescado, a eficiência dos sistemas de produção aquícola é fundamental. Paralelamente a isso, fatores ligados à condição nutricional e à saúde dos animais reforçam ainda mais a necessidade de investigar melhorias nas formulações das dietas visando melhor aproveitamento dos nutrientes oriundos desta, diminuindo assim os custos de produção (COSTA, 2015).

1.1.1 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA

Por ser um sistema com reduzido impacto ambiental (YOGEV et al., 2017) e reciclagem de água através de tratamento de resíduos (MARTINS et al., 2010), o sistema de recirculação de água (do inglês *Recirculating Aquaculture System* ou RAS), é uma alternativa ecologicamente sustentável à aquicultura tradicional, se comparado a viveiros e tanques-rede (YOGEV et al., 2017).

Os componentes básicos deste sistema incluem: a) tanques de cultivo que podem ser circulares, ovais, retangulares ou octogonais, onde os animais são alocados; b) decantadores (partículas > 100 micra ou 0,1mm) ou filtros mecânicos (partículas entre 40 e 100 micra) (KUBITZA, 2006) responsáveis pela remoção do material suspenso ou particulado (resíduos de ração, fezes e sólidos) (KUBITZA, 2006; MARTINS et al., 2010) do meio; c) biofiltros ou filtros biológicos, composta por substratos diversos que facilitem a fixação de bactérias nitrificadoras, oxidando a amônia a nitrato (RIDHA e CRUZ, 2001; KUBITZA, 2006); d) sistema de aeração ou oxigenação (KUBITZA, 2006) com a função melhorar os níveis de oxigênio do meio e acelerando a decomposição do material orgânico e os processos de nitrificação (KUBITZA, 2008); e) sistema de bombas e tubulações de drenagem e retorno, esse sistema será responsável por fazer o retorno da água tratada e reoxigenada para os tanques de cultivo (KUBITZA, 2006) e f) unidade de quarentena que deve estar fisicamente isolada do restante da produção e ter seus componentes próprios (tanques, filtros, biofiltros, aeração e equipamentos de bombeamento), possibilitando o isolamento e a observação de animais recém adquiridos. Diversas adequações podem ser implementadas nesse sistema, como automação da alimentação e do monitoramento da qualidade de água, uso de oxigênio puro e de degasificadores, aplicação de luz ultravioleta e/ou ozônio para processos de desinfecção, ajuste automático de pH, entre outras; isso dependerá da necessidade exata de cada sistema de cultivo a ser implantado (BREGNBALLE, 2015). Através de toda essa estrutura (Figura 2), esse sistema permite maior controle dos parâmetros de qualidade da água e da presença de microrganismos patogênicos, bem como, auxilia no melhor monitoramento no desempenho dos peixes (TIMMONS e EBELING, 2007; TAL et al., 2009).

Figura 2. Componentes básicos (verde) e adequações de enriquecimento (vermelho) de um sistema RAS.



Legenda: Adaptado de Bregnballe (2015).

Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4626e.pdf>> Acesso em: 10 de agosto de 2018.

O sistema RAS ainda permite a integração desse sistema a outros cultivos animais (sistemas multitróficos; LANDER et al., 2013; WALLER et al., 2015; GRANADA et al., 2016) ou vegetais (sistema aquapônico; PINHO et al., 2017), aprimorando a eficiência produtiva com mínimo impacto ao meio ambiente (ALI et al., 2010).

1.1.2 TILÁPIA E FASE DE ALEVINAGEM

Alta aceitação comercial, rusticidade, hábito alimentar onívoro com conversões alimentares reduzidas (ocasionando relativos baixos custos de produção) são alguns dos atributos de sucesso no cultivo tilápias (POPMA e PHELPS 1998; EL-SAYED, 2006; RESENDE, 2009). Esta espécie é originária do continente africano e introduzida no Brasil no ano de 1952 no estado de São Paulo objetivando, naquela época, mitigar a proliferação em represas de algas e macrófitas aquáticas (BOSCARDIN, 2008; OSTRENSKY et al., 2008). Somente após o ano de 2002 é que as tilápias tiveram expressivo aumento em seu cultivo, passando a ser a mais produzida no Brasil.

Já no ano de 2004 a sua produção alcançava 26% do total de produção de toda a aquicultura nacional (BOSCARDIN, 2008) e no ano seguinte chegou a 67.850 toneladas de acordo com o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Após mais de uma década (ano 2015) estimou-se uma produção de 219.329 toneladas de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL, 2017). Por fim, no ano de 2017, a tilapicultura representou 51,7% de toda a piscicultura do Brasil totalizando 357.639 toneladas. Esses expressivos valores posicionam nosso país no 4º lugar na produção de tilápia do mundo, de acordo com dados inéditos da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR, 2018).

Essa progressiva produção se justifica pelas excelentes características desses animais em se adaptar a ambientes intensivos, bons índices reprodutivos e de crescimento, além de se ajustarem aos diferentes sistemas de produção (BEVERIDGE e MCANDREW, 2000; FITZSIMMONS et al., 2011). Outras vantagens para a criação de tilápias se fundamentam no constante melhoramento genético de suas espécies, ampla tolerância às diversas condições físico-químicas da água de cultivo, além de boa resistência às doenças e ao estresse, mantendo sua saúde (KUBITZA, 2011). Tilápias do gênero *Oreochromis*, com destaque para a *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo) por sua excelente/rápida taxa de crescimento, adaptabilidade aos diferentes meios de cultivos e aceitação do mercado consumidor tem sido escolha importante para cultivo nas condições do Brasil (BOSCOLO et al., 2001; MEUER et al., 2002).

O cultivo das tilápias podem ser divididas em diversas fases, com destaques as fases iniciais ou alevinagem, que é marcada por cultivo em altas densidades de estocagem e taxas de mortalidade consideráveis (MARENGONI, 2006). Nessa fase, os peixes possuem um sistema imunológico imaturo, dessa forma, sua resistência natural às enfermidades é restrita (KIRKAN et al., 2003, YIN et al., 2008), tornando-os propícios principalmente a enfermidades de origem bacteriana. Essas doenças bacterianas em constante ascensão são responsáveis por acometer peixes de água doce nos cultivos no Brasil (LEIRA et al., 2016), sobretudo nas fases iniciais, agravando ainda mais esses índices de mortalidade. Dados provenientes do Laboratório de Aquicultura (LAQ) da UDESC (comunicação pessoal) observaram mortalidades acima de 70% em alguns lotes nessa fase, mesmo levando considerações medidas profiláticas. Este fato evidencia ainda mais a necessidade de

estratégias para a melhoria da saúde dos animais, principalmente em períodos críticos como o pós-transporte.

Ainda nas fases iniciais de vida, os peixes possuem rápido desenvolvimento corpóreo no qual uma nutrição adequada garantirá o aporte nutricional essencial para certificar o seu crescimento (HAYASHI et al., 2002; FILIPETTO et al., 2005) e a manutenção da saúde (KIM et al., 2003). No intestino desses animais, há uma comunidade microbiana composta por bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas e/ou obrigatórias, que colaboram para o desenvolvimento, metabolismo, sistema imunológico e resistência a doenças (RAWLS et al., 2004; NAYAK, 2010). Esta microbiota complexa é responsável pela produção de enzimas digestivas extracelulares (SAHA; RAY, 1998; BAIRAGI et al., 2002; SAHA et al., 2006) que exerce importante papel no metabolismo e nutrição dos peixes (RAY et al., 2012). Embora trabalhos sobre essa funcionalidade da nutrição aquícola sejam limitados, inúmeros estudos comprovam que a composição da dieta desempenha elevada influência na microbiota intestinal (RINGØ et al., 1995; RINGØ; BIRKBECK, 1999; RINGØ; OLSEN, 1999; RINGØ et al., 2006a; RINGØ et al., 2006b; NAYAK, 2010).

A capacidade digestiva, bem como, a eficiência alimentar em peixes é fortemente influenciada pelas enzimas digestivas existentes (LEMIEUX et al., 1999). A amilase, por exemplo, pode ter origem na dieta, de maneira endógena ou ainda, ser produzida pelas bactérias presentes no intestino dos animais e é crucial para a digestão de carboidratos (KROGDAHL et al., 2005; RAY et al. 2012). Nas tilápias, espécie típica onívora, que consome especialmente algas, plantas e fitoplâncton e tem um extenso intestino composto por uma mucosa dotada de vilosidades, o processo de absorção dos alimentos é aumentado (LEENHOUWERS et al., 2008). Neste sentido, a utilização de dietas devidamente balanceadas com a adição de aditivos alimentares pode ser uma estratégia interessante para mitigar perdas nas etapas iniciais de vida e garantir melhorias nas fases subsequentes desses animais (HAYASHI et al., 2002).

1.1.3 DIETAS AQUÍCOLAS E USO DE ADITIVOS

As dietas aquícolas são responsáveis por pelo menos metade dos custos totais de produção dependendo do sistema de cultivo adotado (BOSCOLO et al., 2002). Isso se justifica, entre outros, pelos animais serem mais exigentes em termos nutricionais que às demais espécies domésticas de produção (IWASHITA et al. 2014). Além disso, conhecer os fatores que podem vir a interferir no aproveitamento das rações nos diferentes sistemas de produção aquícola também é preciso, já que quanto melhor esse insumo for manejado e balanceado, menores serão os custos de produção e, conseqüentemente, maiores os retornos para o aquicultor (IWASHITA et al. 2014). Dessa forma, a escolha e o manejo de ingredientes de qualidade e quantidade corretas, é um caminho para o sucesso da atividade, já que indústrias do setor priorizam elevada eficiência, atrelada à diminuição de custos e excelência no produto final (RIBEIRO et al. 2012).

A profissionalização da atividade vinculada à intensificação da tilapicultura alavancou a utilização de alternativas nutricionais para essa espécie, principalmente por questões de mercado onde há uma expansiva oportunidade de crescimento para a indústria de rações (SCORVO FILHO et al., 2010). Sob outra perspectiva, a escassa disponibilidade e qualidade de ingredientes em algumas regiões é a principal preocupação dos nutricionistas da área, já que a maior parte destes é empregue na avicultura e suinocultura (SINDIRAÇÕES, 2011).

A inclusão racional de aditivos nas dietas, também chamados alimentos funcionais (RIBEIRO et al. 2012) pode ser uma alternativa para melhorar o desempenho, a saúde e o aproveitamento dos nutrientes pelos animais. Em novembro de 2004 no Diário Oficial da União, foi publicada a Instrução Normativa nº 13 que regulamenta a utilização de aditivos designados à alimentação animal (BRASIL, 2004). Essa instrução conceitua aditivos como “substâncias ou microrganismos adicionados intencionalmente, que normalmente não se consomem como alimento, tenham ou não valor nutritivo, que afetem ou melhorem as características do alimento ou dos produtos animais”. A incorporação da maioria dos aditivos alimentares nas dietas aquícolas é feita em baixas concentrações (IWASHITA et al. 2014).

São escassas as informações sobre os embasamentos tecnológicos em dietas aquícolas (RESENDE, 2009) quando comparadas às demais espécies animais. Entretanto, trabalhos com aditivos alimentares já são realidade nas dietas aquícolas, entre eles a utilização de ácidos orgânicos (DA SILVA et al, 2008; CARDOSO, 2016), fitase (FURUYA et al., 2001; BOCK et al., 2007; KULMAR et al, 2011; MELO et al., 2012,) e probiótico (GILDBERG et al., 1997; GRAM et al., 1999; NIKOSKELANEN et al., 2001; CARVALHO et al., 2011; ALBUQUERQUE et al, 2013; MELLO et al., 2013) com resultados promissores. Alguns trabalhos com resultados benéficos para a saúde intestinal (MELLO et al., 2013; CARVALHO et al., 2011) contribuíram para a melhoria do status imunitário dos animais.

1.1.4 PÓLEN APÍCOLA – CARACTERIZAÇÃO E USO NA NUTRIÇÃO ANIMAL

A Instrução Normativa de nº 3 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) publicada em 19 de janeiro de 2001, em seu Anexo V traz o “Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola”. Neste documento o pólen é definido como: “o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia”. Citam ainda que: “o pólen apícola desidratado é o produto que passa por processo de desidratação, seguindo os procedimentos adequados de tratamento, com temperatura inferior a 42°C, e com teor de umidade inferior a 4%”.

O pólen apícola é composto basicamente de proteínas, lipídios, açúcares, fibras, sais minerais, aminoácidos e vitaminas (BRASIL, 2001). Neste sentido, os requisitos físico-químicos de acordo com o MAPA para o pólen apícola desidratado são: umidade: máximo 4%; cinzas ou matéria mineral: máximo de 4% m/m, na base seca; lipídios: mínimo de 1,8% m/m, na base seca; proteínas: mínimo 8% m/m, na base seca; açúcares totais: 14,5% a 55,0% m/m, na base seca; fibra bruta: mínimo 2% m/m, na base seca; acidez livre: máximo 300 mEq/kg e pH: 4 a 6. Ainda em termos de nomenclatura, de acordo com outros autores o pólen é um aglomerado de pólen das flores coletado de diversas fontes de plantas e misturado com néctar e secreções glandulares hipofaringianas das abelhas (CARPES et al., 2008). É um alimento rico em proteínas, bem como, aminoácidos essenciais como a lisina,

triptofano, histidina, leucina, isoleucina, valina, entretanto, a prolina e ácido glutâmico são os mais abundantes (DIAS et al., 2013).

Concentrações consideráveis de vitaminas A, C, D, K3 e do complexo B (DIAS et al., 2013), minerais, enzimas e coenzimas, flavonóides, carotenoides, fitoesteróis, carboidratos e óleos também fazem parte da rica composição deste alimento (GOODMAN, 2003; ALMEIDA-MURADIM et al., 2005; BARRETO et al. 2006; MARCHINI et al., 2006; ALMARAZ-ABARCA, 2007; XU et al., 2009, (FÉAS et al., 2012). Compostos principalmente por polissacarídeos insolúveis, os carboidratos presentes no pólen estão na forma de amido, frutose, glucose e sacarose, já sua fonte lipídica é composta especialmente por ácidos graxos, esteróis e hidrocarbonetos (BOGDANOV, 2004).

Por sua capacidade de fortalecer o sistema imunológico, ação antioxidante (GEYMAN, 1994, GOODMAN, 2003; ALMEIDA-MURADIM et al., 2005; ALMARAZ-ABARCA, 2007) e outros efeitos terapêuticos interessantes como: antimicrobiano (ÖZCAN et al. 2004; BASIM., et al., 2006), antifúngico, hepatoprotetor, quimiopreventivo e anti-inflamatório (PASCOAL et al., 2014), este aditivo pode ser uma alternativa para melhoria das dietas aquícolas. Além disso, suas proteínas e aminoácidos auxiliam no crescimento e restauração dos tecidos animais (MODRO et al. 2007).

Arruda et al., (2017) analisaram 62 amostras comerciais de pólen desidratado do Brasil, sendo de 8 (oito) estados e do Distrito Federal, para parâmetros de qualidade (umidade, cinzas, lipídeos e proteínas). A maioria das amostras analisadas atenderam aos limites estabelecidos pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001) para os parâmetros de cinzas (máx.) 4%, lipídeos (mín) 1,8% e proteínas (mín.) 8%, exceto para o teor de umidade das amostras excedeu o limite de 4% estabelecido pela legislação para amostras desidratadas. Neste mesmo trabalho, as 8 amostras obtidas no estado de Santa Catarina, continham a seguinte composição (Tabela 1):

Tabela 1. Composição físico-química de amostras de pólen apícola coletado no estado de Santa Catarina segundo Arruda (2017).

AMOSTRA	UM (%)	MM (%)	LPD (%)	PTN (%)	FRUT (%)	GLC (%)
SC 01	4,61 ±	2,68 ±	7,51 ±	19,26 ±	19,82 ±	7,84 ±
	0,14	0,04	0,45	0,33	1,77	1,17
SC 02	4,34 ±	2,61 ±	9,51 ±	20,34 ±	15,82 ±	6,11 ±
	0,06	0,03	0,70	0,43	0,81	0,63
SC 03	3,41 ±	2,68 ±	7,78 ±	20,42 ±	17,51 ±	6,50 ±
	0,14	0,02	0,18	0,15	2,12	0,95
SC 04	3,66 ±	2,40 ±	8,01 ±	21,37 ±	12,08 ±	4,68 ±
	0,05	0,28	0,39	0,46	1,58	0,46
SC 05	4,50 ±	2,52 ±	9,17 ±	19,73 ±	16,71 ±	6,53 ±
	0,07	0,01	0,81	0,26	2,19	1,05
SC 06	4,44 ±	2,70 ±	7,97 ±	19,88 ±	11,86 ±	5,72 ±
	0,28	0,02	0,13	0,15	0,70	0,39
SC 07	4,19 ±	2,44 ±	5,09 ±	27,01 ±	14,32 ±	5,39 ±
	0,07	0,02	0,12	0,21	0,72	0,11
SC 08	4,41 ±	3,16 ±	7,46 ±	19,43 ±	13,83 ±	14,80 ±
	0,53	0,05	0,58	0,13	0,16	0,47

Legenda: UM = Umidade; MM = Matéria Mineral; PTN = Proteínas; FRUT = Frutose; GLC = Glicose.

Diversos estudos foram realizados com esse aditivo funcional em outras categorias animais, principalmente aves (FARIA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2018; HENRIQUES et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017). No entanto, poucos estudos foram realizados quanto ao seu uso em dietas aquícolas. Adicionalmente, os trabalhos existentes na literatura remetem a estudos em sistemas de cultivo abertos com a mesma espécie com excelentes resultados para desempenho zootécnico, aspectos hematológicos e de fecundidade, seguem:

Abbass et al. (2012) avaliaram os efeitos do pólen e própolis sobre o desempenho, a fecundidade e algumas variáveis hematológicas para funções hepáticas e renais de tilápias do Nilo em sistema aberto com troca contínua de água. Os resultados indicaram que a adição de 2,5% de própolis ou pólen na dieta melhorou a taxa de crescimento específico, ganho médio diário e a eficiência alimentar das tilápias. Os machos suplementados com pólen apícola apresentaram melhoras na qualidade do sêmen, aumento do peso testicular e do índice gonadosomático. Ambos aditivos diminuíram a alanina aminotransferase sérica, agindo como hepato-protetora e melhorando a saúde dos animais.

Segundo El-Asely et al. (2014) no mesmo sistema de cultivo investigaram a ação do pólen apícola em tilápias-do-Nilo infectadas experimentalmente (injeção intraperitoneal)

por *Aeromonas hydrophila* sobre variáveis imunológicas, hematológicas, bioquímicas e de crescimento. O aditivo melhorou as variáveis zootécnicas como peso corporal, comprimento, ganho diário médio, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência alimentar. Além disso, afetou positivamente os aspectos imunológicos como atividade fagocitária, atividade bactericida do soro e ensaio de nitroazul de tetrazólio (NBT); variáveis hematológicas, como hematócritos, leucócitos, número de neutrófilos, monócitos e linfócitos e influenciou também nas variáveis bioquímicas como proporções séricas de proteínas totais, albumina e globulina. Esses estudos apresentaram resultados zootécnicos, reprodutivos e hematológicos favoráveis (ABBASS et al., 2012; EL-ASELY et al., 2014) ao incluir o pólen como aditivo alimentar nas dietas das tilápias.

Apesar de alguns trabalhos sobre inclusão dietética de pólen já terem sido realizados com tilápias, este aditivo ainda não foi avaliado em sistemas intensivos fechados (RAS). Além disso, é desconhecido seu efeito sobre parâmetros intestinais e hepáticos desses animais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

O objetivo do estudo é avaliar a inclusão de pólen nas dietas para alevinos de tilápia nilótica, em RAS, e seus efeitos sobre o desempenho zootécnico, índices organossomáticos e a histomorfometria hepato-intestinal desses animais.

1.2.2 Específicos

- Avaliar a inclusão de pólen nas dietas de tilápia sobre o ganho de peso médio, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico, produtividade e sobrevivência dos alevinos.
- Mensurar a inclusão de pólen nas dietas de tilápia sobre os índices organossomáticos (índice hepato-somático e viscerossomático) e mensurar a área média dos hepatócitos.
- Analisar o efeito da inclusão de pólen nas dietas de tilápia sobre histomorfométrica das vilosidades intestinais e contagem de células caliciformes.

1.3 HIPÓTESE

O uso do pólen como aditivo alimentar em dietas comerciais de alevinos de tilápias do Nilo melhorará o desempenho zootécnico e os índices organossomáticos e promoverá alterações morfométricas benéficas na mucosa intestinal e na morfologia hepática desses animais.

2. CAPÍTULO II

2.1. ARTIGO I

Título do Artigo: Pólen afeta a histomorfometria hepato-intestinal de alevinos de tilápia do Nilo

O manuscrito foi formatado segundo as normas da **Revista *Aquaculture***.

QUALIS CAPES A2 na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros

Fator de impacto igual a 1,893.

Pólen apícola afeta a histomorfometria hepato-intestinal de alevinos de tilápia do Nilo

Fernanda Picoli^{a,*}, Diogo Luiz de Alcantara Lopes^a, Aline Zampar^a, Suélen Serafini^a, André Freccia^b, Luciane Orbem Veronezi^b, Mateus Wiggers Kowalsk^b, Jonis Baesso Ghizzo^b, Maurício Gustavo Coelho Emerenciano^{a,c*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Chapecó-Santa Catarina, Brasil.

^b Laboratório de Aquicultura do Centro Universitário Barriga Verde – UNIBAVE, Orleans - SC, Brasil.

^c CSIRO Agricultura e Alimentação, Programa de Aquicultura, Centro de Pesquisas da Ilha de Bribie, Woorim, QLD, Austrália.

* Autores para correspondência: Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina. Rua Zanin Beloni Trombeta 680 D, Chapecó/SC, Brasil, CEP: 89815-630, telefone +55 49 2049-9557. (E-mail: F. Picoli - picoli.zootecnista@hotmail.com; M. G. C. Emerenciano - mauricioemerenciano@hotmail.com)

Resumo: Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a inclusão de níveis de pólen apícola no desempenho zootécnico e histomorfometria hepato-intestinal de alevinos de tilápia do Nilo. Foram utilizados 225 alevinos de tilápia ($1,253 \pm 0,056$ g), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em 15 tanques (30 L) mantidos em sistema de recirculação de água com três tratamentos (níveis de inclusão 0% ou controle, 1,5% e 2,5% de pólen) e cinco repetições. As taxas de arraçoamento foram definidas a partir das biometrias semanais e realizado monitoramento periódico dos parâmetros físico-químicos da água. As variáveis da qualidade da água se mantiveram dentro do adequado para a espécie durante todo o experimento. Não houve diferença significativa para os índices somáticos e de desempenho zootécnico nesse experimento. A inclusão de pólen na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo ocasionou aumento linear na morfologia dos hepatócitos ($p=0,0098$). Para as variáveis intestinais de altura de vilosidades, observou-se aumento significativo linear ($p<0,05$) conforme aumentava a inclusão de pólen, já para largura e espessura, não houveram alterações significativas. Nos peixes que receberam 2,5% de pólen, o número de células caliciformes foi significativamente maior ($p<0,001$) que o observado no grupo controle e no 1,5%. Recomenda-se a inclusão de até 2,5% de pólen apícola em dietas comerciais extrusadas para alevinos de tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Aditivo, Imunoestimulante, Nutrição animal, Tilapicultura.

Abstract: This work was carried out with the objective of evaluating the inclusion of bee pollen levels on the zootechnical performance and hepato-intestinal histomorphometry of Nile tilapia fingerlings. A total of 225 tilapia fingerlings ($1,253 \pm 0,056$ g) were distributed in a completely randomized design (DIC) in 15 tanks (30 L) maintained in a RAS system with three treatments (0% inclusion levels or control, 1.5% and 2.5% inclusion) and five replicates. Feeding rates were defined from the weekly biometrics and periodic monitoring of the physical-chemical water quality parameters. The water quality variables remained within the appropriate range for the species throughout the experiment. There was no significant difference for the somatic indexes and zootechnical parameters in this experiment. However, the inclusion of pollen in Nile tilapia fingerlings showed a linear increase in hepatocyte morphology ($p = 0.0098$). For the intestinal variables of villus height a significant linear increase was observed ($p < 0.05$) as the pollen inclusion increased, already for width and thickness, there were no significant alterations. In fish that received 2.5%, the number of goblet cells was significantly higher ($p < 0.001$) than control group and 1.5%. It is recommended to include of up to 2.5% bee pollen in extruded commercial diets for Nile tilapia fingerlings.

Key-words: Additive, Immunostimulant, Animal nutrition, Tilapia farming.

1. Introdução

A atividade aquícola contribui cada vez mais para a produção mundial de alimentos com índices produtivos crescentes (FAO, 2018), mas ainda existem inúmeros obstáculos no sistema de produção como um todo. A dependência de ingredientes dietéticos pouco abundantes em algumas regiões ou o baixo aproveitamento nutricional das rações são alguns destes gargalos, o que onera ainda mais essa produção (Costa, 2015). Paralelamente, a intensificação dos sistemas, buscando maior eficiência produtiva, bem como, sua relação com a condição nutricional e de saúde dos animais reforçam a necessidade de investigar melhorias nas formulações das dietas aquícolas, visando o melhor aproveitamento dos nutrientes oriundos desta.

Com base nisso, o uso de aditivos alimentares visa promover crescimento e melhorar a saúde dos animais (Brasil, 2004; Ribeiro et al., 2012). Neste contexto, o pólen aquícola é um aglomerado de pólen das flores misturado com néctar e secreções glandulares das abelhas (Carpes et al., 2008), rico em aminoácidos essenciais (Dias et al., 2013), polissacarídeos insolúveis, frutose, glucose, sacarose e componentes lipídicos (Bogdanov, 2004), além de ser uma excelente fonte de flavonóides, carotenóides, compostos fenólicos e minerais (Féas et al., 2012). Por sua capacidade de fortalecer o sistema imunológico, conter ação antioxidante (Geyman, 1994, Goodman, 2003; Almeida-Muradim et al., 2005; Almaraz-Abarca, 2007) e apresentar outros efeitos terapêuticos como antimicrobiano (Basim et al., 2006), antifúngico, hepatoprotetor, quimiopreventivo e anti-inflamatório (Pascoal et al., 2014), este aditivo se apresenta como alternativa para melhoria das dietas aquícolas.

Existem relevantes estudos com o uso deste aditivo para diversas categorias animais como codornas japonesas (Faria et al., 2008), coelhos (Attia et al., 2011a; Attia et al., 2011b; Zeedan et al., 2017), ratos (Selmanoglu et al., 2009; Hajková et al., 2013), frangos de corte (Rodrigues et al., 2018; Henriques et al., 2014; Nascimento et al., 2015; Oliveira et al., 2015) e frango caipira (Araújo et al., 2017). Além disso, o pólen já foi testado em peixes em sistemas abertos, normalmente com menores densidades de estocagem e maior conforto ambiental aos animais (Abbass et al., 2012; El-Asely et al., 2014). No entanto, é desconhecido seu efeito sobre os parâmetros intestinais e hepáticos de tilápias, ainda mais

para sistemas intensivos com os sistemas de recirculação (RAS, na sua sigla em inglês). Diante disso, o objetivo com o presente estudo foi avaliar se a inclusão de pólen nas rações de alevinos de tilápia nilótica, linhagem GIFT, em RAS, afeta o desempenho zootécnico e a histomorfometria intestinal e hepática desses animais.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Aquicultura, do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE) no município de Orleans - SC (Lat. 28°21'S; Long.49°16'O). Foram utilizados alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, linhagem GIFT) adquiridos da piscicultura comercial Sertãozinho, situada em Braço do Norte - SC e transportados em sacos plásticos de transporte até o local do experimento. Sete dias antes do início do período experimental esses animais ficaram alojados em um tanque de volume útil de 500 litros com forte aeração em temperatura de 28°C para aclimação e adaptação ao meio de cultivo.

Por um período experimental de 26 dias, foram povoados em 15 unidades experimentais (caixa plástica retangular - 30 L de volume útil), 225 peixes com peso médio inicial de $1,253 \pm 0,056$ g. Distribuiu-se em cada uma delas 15 alevinos, totalizando 03 (três) tratamentos com 05 (cinco) repetições por tratamento. Esses animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e alimentados com ração comercial extrusada (1 – 2,0 mm) contendo níveis de inclusão de pólen apícola, sendo: tratamento 0% (ração comercial 40%PB e sem pólen), tratamento 1,5% (ração comercial 40%PB e 1,5% de inclusão de pólen) e tratamento 2,5% (ração comercial 40%PB e 2,5% de inclusão de pólen).

De acordo com dados do fabricante as características nutricionais do pólen fornecido (porção de 1 kg) eram de 285,71 g/kg de proteína, 428,57 g/kg de carboidratos e 2.857 kcal de energia por porção (Marca Minamel®, Íçara, Santa Catarina, Brasil). Já a dieta comercial (BioBase®, Águas Frias, Santa Catarina, Brasil), era composta pelos níveis de garantia contidos na Tabela 1. Os animais foram alimentados três vezes/dia (08h00min, 13h00min e 18h00min) com taxa de arraçoamento inicial de 8% da biomassa/dia, corrigida para 5% após 15 dias e mantida até o término do experimento.

149 **Tabela 1.** Níveis de garantia da dieta base utilizada para a inclusão de pólen apícola em
 150 rações comerciais extrusadas para alevinos de Tilápia-do-Nilo.

Nutriente	Nível de garantia
Proteína Bruta (Mín.)	400,0 g/kg
Cálcio (Mín.)	40,0 g/kg
Cálcio (Máx.)	50,0 g/kg
Fósforo (Mín.)	15,0 g/kg
Extrato Etéreo (Mín.)	40,0 g/kg
Matéria Fibrosa (Máx.)	60,0 g/kg
Matéria Mineral (Máx.)	150,0 g/kg
Umidade (Máx.)	120,0 g/kg
Vitamina C (Mín.)	500,0 mg/kg

151 Fonte: BioBase[®], Águas Frias, Santa Catarina, Brasil.

152

153 As unidades experimentais foram dispostas em duas bancadas, conectadas a um
 154 sistema de recirculação de água e oxigenadas por pedras porosas (1x2cm) acopladas através
 155 de um compressor de ar (SUNSUN[®] Hp-200 1,8l/min 2,5w P Aquários 220v, China). Toda
 156 a estrutura foi interligada sequencialmente a um sistema formado por um tanque circular
 157 com volume útil de 500 litros (macrocosmo) que dispunha em sua saída um filtro
 158 mecânico, seguido por uma caixa plástica circular de 150L (sistema de filtragem biológica)
 159 e um tambor plástico de 120L acoplado a uma bomba submersa de 4000 L h⁻¹ (ATMAN[®]
 160 modelo PH4000, China), responsável pela distribuição da água até as unidades
 161 experimentais e seu posterior retorno por gravidade (Anexo A). Esse sistema de filtragem e
 162 foi composto por um filtro mecânico (60µm – malha tipo Perlton) e um filtro biológico de
 163 material particulado (totalizando 0,05m³ de substrato composto por pedra de argila
 164 expandida) de maneira a auxiliar no processo de nitrificação fornecendo superfície de
 165 adesão às bactérias nitrificantes do meio. A sifonagem dos resíduos orgânicos suspensos
 166 era feita a cada dois dias e a reposição da água sifonada provinha da Companhia de água e
 167 esgoto do município (SAMA-Orleans/SC). Antes de sua utilização, essa água passava por
 168 um armazenamento prévio em um recipiente de 500 litros, fortemente aerado por 02 (dois)
 169 dias para retirada do cloro residual.

170 Foram monitorados diariamente (08h00min) os parâmetros de qualidade de água,
 171 temperatura (termômetro de mercúrio $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e oxigênio dissolvido (oxímetro ALFAKIT[®]
 172 modelo AT-155, Alfakit, Florianópolis – SC, Brasil), duas vezes por semana o pH

(SENSOGLASS SP1800®) e semanalmente coletaram-se amostras de água (mantidas em freezer -20°C) para posterior análise de amônia total, nitrito, nitrato, alcalinidade e ortofosfato (Fotocolorímetro AT-100P, marca ALFAKIT®, Florianópolis – SC, Brasil) no Laboratório de Aquicultura da UDESC (LAQ-UDESC) em Laguna – SC. Os níveis de temperatura, oxigênio dissolvido e pH apresentaram médias e desvio padrão de 26,19 ± 2,65°C, 6,39 ± 0,228 mg/L⁻¹ e 6,76 ± 0,241 mg/L⁻¹, respectivamente. Já amônia, nitrito, nitrato, ortofosfato e alcalinidade apresentaram valores de 0,77 ± 0,120 mg/L⁻¹, 0,05 ± 0,014 mg/L⁻¹, 2,45 ± 0,381 mg/L⁻¹, 0,52 ± 0,197 mg/L⁻¹ e 48,00 ± 5,656 mg/L⁻¹, respectivamente.

2.1 Análises zootécnicas e índices organossomáticos

Após 26 dias de experimento, todos os peixes foram capturados com puçá dos tanques experimentais, colocados em recipientes para anestesia com eugenol e, em seguida, foram imobilizados manualmente (com auxílio de toalhas úmidas e luvas) para a realização da biometria final. A partir dos dados foram realizadas as avaliações das variáveis zootécnicas a partir das seguintes fórmulas: ganho de peso médio (GPM) = peso final (g) – peso inicial (g); conversão alimentar aparente (CA) = consumo de ração / ganho de peso; taxa de crescimento específico (TCE) = $\ln$ peso final (g) - $\ln$ peso inicial (g) / período experimental x 100; produtividade (P) = biomassa final (g) / volume útil tanque (L) e sobrevivência (S) = número de animais mortos / total de peixes x 100.

Após a biometria, foram eutanasiados de acordo com métodos aprovados segundo o CONCEA (sedados com eugenol e ao não apresentarem nenhum movimento foram imediatamente decapitados), em média 04 (quatro) animais por unidade experimental, totalizando 20 animais por tratamento, para retirada do fígado e das vísceras. A partir das coletas, os órgãos foram pesados e posteriormente, avaliaram-se os índices viscerossomático (IVS = peso das vísceras (g) / peso final (g) x 100) e hepatossomático (IHS = peso do fígado (g) / peso final (g) x 100). Posteriormente, esses órgãos foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE) para os procedimentos histológicos.

2.2 Histomorfometria intestinal e hepática

Para as análises histomorfométricas foram coletadas duas frações da parte inicial do intestino (proximal) de cada animal e para a análise hepática, duas frações do fígado do mesmo. O processamento histológico dessas amostras foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE), conforme métodos de rotina de elaboração de lâminas histológicas (Nunes e Cinsa, 2016).

Os fragmentos intestinais foram colocados em recipientes plásticos estéreis com solução de Bouin, pré-identificados e após fixadas por 24 horas foram novamente identificados e conservados em formol 10% até a avaliação das características morfohistológicas de sua mucosa. Posteriormente, essas frações intestinais passaram por secções de 0,3 cm através de técnica de histologia, diafanização e inclusão em parafina histológica, para posterior fracionamento em cortes de 3µm de espessura em micrótomo semiautomático, de acordo com metodologia adaptada de Mello et al., (2013). Em seguida, foram realizados cortes em sentido longitudinal, semisseriados e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Prophet et al., 1992) para mensurações das vilosidades intestinais e área média dos hepatócitos. Outro conjunto de lâminas do intestino foram coradas pelo método de histoquímica Schiff, o PAS (do inglês, Periodic Acid-Schiff) (Tolosa et al., 1976) para a contagem de células caliciformes. Após esses procedimentos, as amostras foram observadas através de microscopia de luz (microscópio Bioval L-2000^a, São Paulo – SP, Brasil). Com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio, as imagens foram digitalizadas através do software “TCapture” (Marca Laborana®, São Paulo, São Paulo, Brasil).

Finalizadas as digitalizações, foram realizadas as mensurações nas vilosidades intestinais nas lâminas intestinais coradas com HE (10x). Elas foram selecionadas por critério de integridade, sendo, seis vilosidades por campo de captura de imagem e por animal. As mensurações realizadas foram adaptadas da metodologia de Mello et al. (2013), sendo: i) altura de vilosidade (AV), ou seja, distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular; ii) altura total das vilosidades (ATV), isto é, altura do ápice das vilosidades até o término da serosa; iii) largura das vilosidades (LV); e iv) espessura da vilosidade (EV), conforme ilustrado na Figura 1. Estes valores correspondem à mensuração de 90 vilos por tratamento, totalizando 270 vilos.

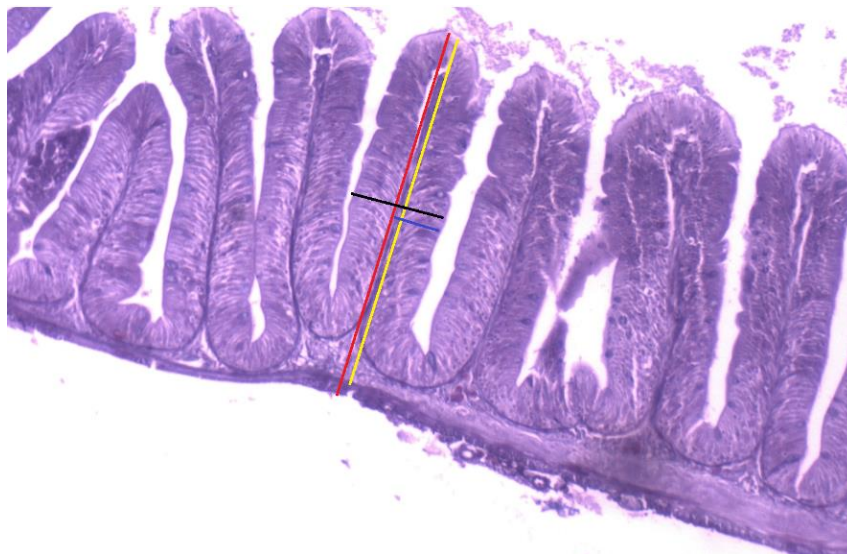


Figura 1. Mensuração das vilosidades (μm) da porção proximal da parede intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo.

Legenda: (linha vermelha) ATV - altura total das vilosidades; (linha amarela) AV - altura das vilosidades; (linha preta) LV - largura das vilosidades; (linha azul) EV - espessura do epitélio das vilosidades. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), Objetiva: 10x.

Nas lâminas intestinais coradas com PAS, foram realizadas as contagens do número de células caliciformes (CC) de 06 vilosidades por campo de captura (40x). Foi considerada cada célula caliciforme como uma unidade (Lima, 2014), conforme a Figura 2.



Figura 2. Contagem do número de células caliciformes (unidade) da porção proximal da parede intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo.

Legenda: (setas vermelhas) – Cada seta representa uma célula caliciforme. Coloração: Periodic Acid-Schiff (PAS). Objetiva: 40x.

Em seguida, através do software “Image J” (National Institute for Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América) realizou-se a mensuração de todas as variáveis citadas acima. Já para as lâminas com tecido hepático na coloração HE foi realizada a captura e digitalização aleatórias de 05 campos de imagem (40x) de cada animal. Em seguida, realizou-se a mensuração da área de 20 hepatócitos por imagem capturada (Figura 3), sendo 100 hepatócitos por animal, 1.500 por tratamento e 4.500 no experimento todo. Após as mensurações, estimou-se a área média dos hepatócitos (AMH) por tratamento, conforme metodologia adaptada de Tessaro et al., (2012).

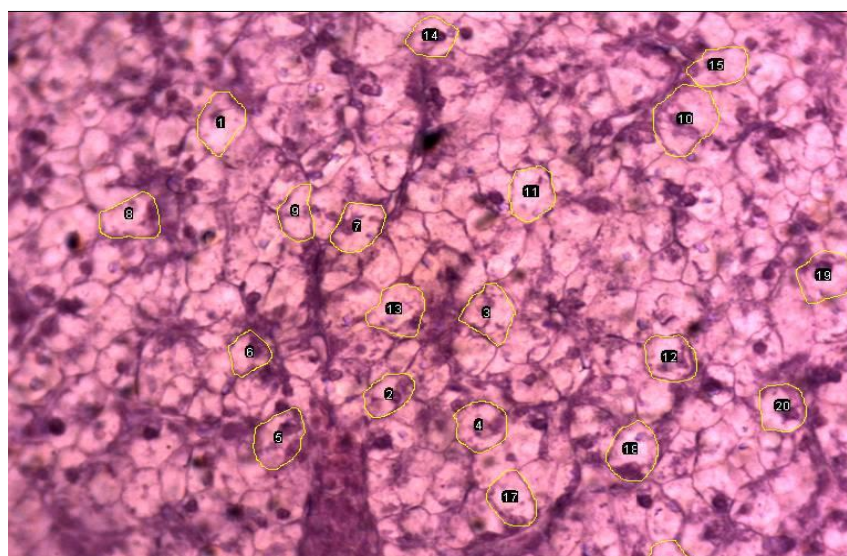


Figura 3. Mensuração da área média dos hepatócitos (AMH/ μm^2) do fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo. Legenda: (área circundada em amarelo) – Área do hepatócito. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Objetiva: 40x.

2.3 Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene (Sokal e Rohlf, 1995). Quando não apresentaram normalidade, foram transformados pela equação $= \arcsen \sqrt{1/1}$ (Zar, 1984) e, uma vez cumpridos os pré-requisitos, ANOVA uma-via foi empregada seguido pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) (Sampaio, 1998).

3. Resultados

3.1 Parâmetros zootécnicos e índices organossomáticos

Os resultados de parâmetros zootécnicos e índices organossomáticos são apresentados na Tabela 2. Os parâmetros de peso final (PF), ganho médio diário (GMD), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar aparente (CA), produtividade (P) e sobrevivência (S) não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de inclusão de pólen apícola ($P > 0,05$) e foram observados valores médios de $3,464 \pm 0,347$ g, $2,240 \pm 0,344$ g, $0,089 \pm 0,010$ g dia⁻¹, $1,641 \pm 0,218$, $1,027 \pm 0,171$ kg m⁻³ e $92,889 \pm 6,885$ %, respectivamente.

Os índices somáticos IHS e IVS também não foram afetados pelos níveis de pólen nas dietas ($P > 0,05$), apresentando valores médios de $2,973 \pm 0,850$ % e $8,003 \pm 1,001$ %, respectivamente.

Tabela 2. Médias ($\pm$) de parâmetros zootécnicos e índices somáticos de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com pólen apícola.

Parâmetros	Nível de pólen (%)			p valor
	0 (Controle)	1,5	2,5	
Pi (g)	1,25 ($\pm 0,05$)	1,19 ($\pm 0,15$)	1,22 ($\pm 0,01$)	NS (P = 0,62)
Pf (g)	3,575 ($\pm 0,19$)	3,18 ($\pm 0,43$)	3,53 ($\pm 0,19$)	NS (P = 0,06)
GPM (g)	2,42 ($\pm 0,22$)	1,99 ($\pm 0,45$)	2,30 ($\pm 0,19$)	NS (P = 0,12)
TCE (%/dia)	9,31 ($\pm 0,85$)	8,42 ($\pm 1,45$)	8,86 ($\pm 0,73$)	NS (P = 0,43)
CA	1,55 ($\pm 0,11$)	1,76 ($\pm 0,35$)	1,60 ($\pm 0,03$)	NS (P = 0,30)
P (kg/m ³)	1,08 ($\pm 0,14$)	0,93 ($\pm 0,25$)	1,05 ($\pm 0,04$)	NS (P = 0,38)
S (%)	93,33 ($\pm 6,66$)	90,66 ($\pm 8,94$)	94,66 ($\pm 5,57$)	NS (P = 0,67)
IHS (%)	2,99 ($\pm 0,19$)	2,67 ($\pm 0,70$)	3,24 ($\pm 1,33$)	NS (P = 0,61)
IVS (%)	7,41 ($\pm 0,58$)	8,50 ($\pm 1,38$)	8,08 ($\pm 0,69$)	NS (P = 0,22)

Legenda: PI = Peso Inicial; PF = Peso Final; GPM = Ganho de Peso Médio; TCE = Taxa de Crescimento Específico; CA = Conversão Alimentar; P = Produtividade; S = Sobrevivência; IHS = Índice Hepatosomático; IVS = Índice Viscerosomático; DP = Desvio Padrão; g = grama; g/dia = grama por dia; kg = quilograma por metro cúbico; NS = Não significativo.

3.2 Análise hepática

A partir da análise da área dos hepatócitos dos diferentes tratamentos observou-se um aumento linear na morfologia destes, por meio da mensuração da área média dos hepatócitos em μm^2 (AMH) (Figura 4). A AMH teve gradativo aumento conforme a inclusão de pólen ($P < 0,001$). Adicionalmente, os tratamentos 1,5% e 2,5% de inclusão diferiram significativamente do controle (0% de inclusão).

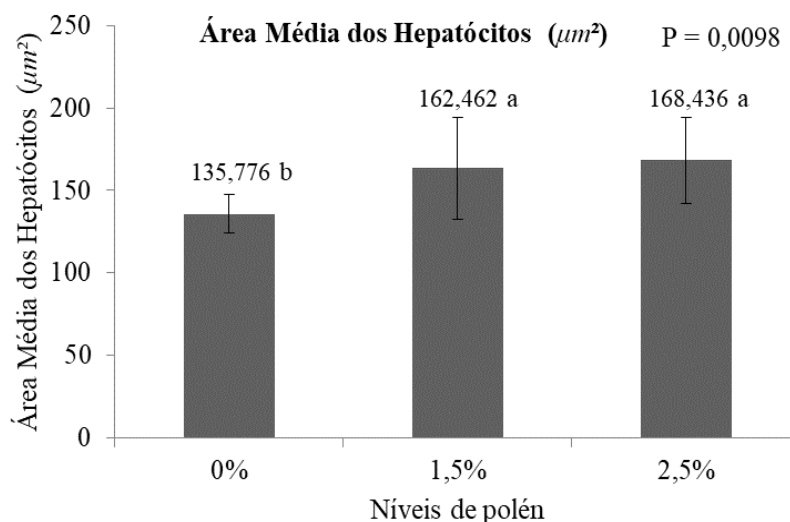


Figura 4. Área média dos hepatócitos (AMH/ μm^2) de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

3.3 Análises intestinais - mensurações das vilosidades e contagem de células caliciformes

Para as variáveis intestinais ATV e AT houve influência positiva, ou seja, observou-se aumento significativo linear ($P < 0,05$) na altura das vilosidades intestinais conforme a inclusão de pólen acrescia (Tabela 3). As demais variáveis (LV e EV) não sofreram aumento significativo dos diferentes níveis de inclusão ($P > 0,05$).

Tabela 3. Histomorfometria intestinal de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com pólen apícola.

Parâmetros	Nível de pólen (%)			p valor
	0 (Controle)	1,5	2,5	
ATV (µm)	328,81 ^b (±68,77)	341,57 ^{ab} (±49,05)	381,39 ^a (±47,37)	(p = 0,03)
AV (µm)	278,63 ^b (±61,59)	295,83 ^{ab} (±48,05)	329,11 ^a (±41,34)	(p = 0,03)
LV (µm)	85,81 (±12,53)	88,77 (±10,45)	84,82 (±12,47)	NS (p = 0,64)
EV (µm)	44,95 (±6,69)	46,10 (±5,73)	45,98 (±7,22)	NS (p = 0,87)

Legenda: µm = Micrômetro; ATV = Altura Total das Vilosidades; AV = Altura das Vilosidades; LV = Largura das Vilosidades; EV = Espessura do epitélio das Vilosidades (EV); DP = Desvio Padrão. NS = Não Significativo. Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Nos peixes que receberam 2,5% de inclusão de pólen na dieta, tiveram número de células caliciformes significativamente maior (P<0,001) que o observado no grupo controle e o tratamento 1,5%. Esses valores podem ser vistos na Figura 5.

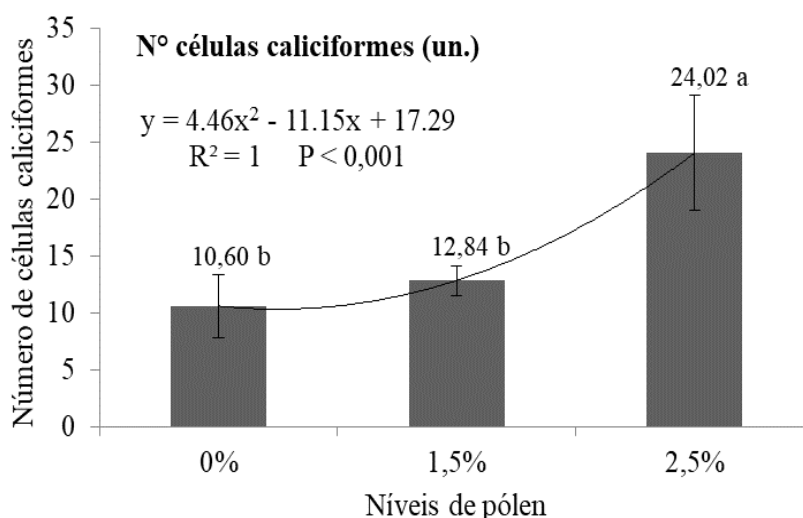


Figura 5. Contagem do número de células caliciformes (CC) de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Adicionalmente, na Figura 6 podem ser observadas as variáveis estudadas neste experimento de acordo com o nível de inclusão de pólen: áreas médias dos hepatócitos (Fig. A, B e C), vilosidades intestinais (Fig. D, E e F) e a contagem de células caliciformes.

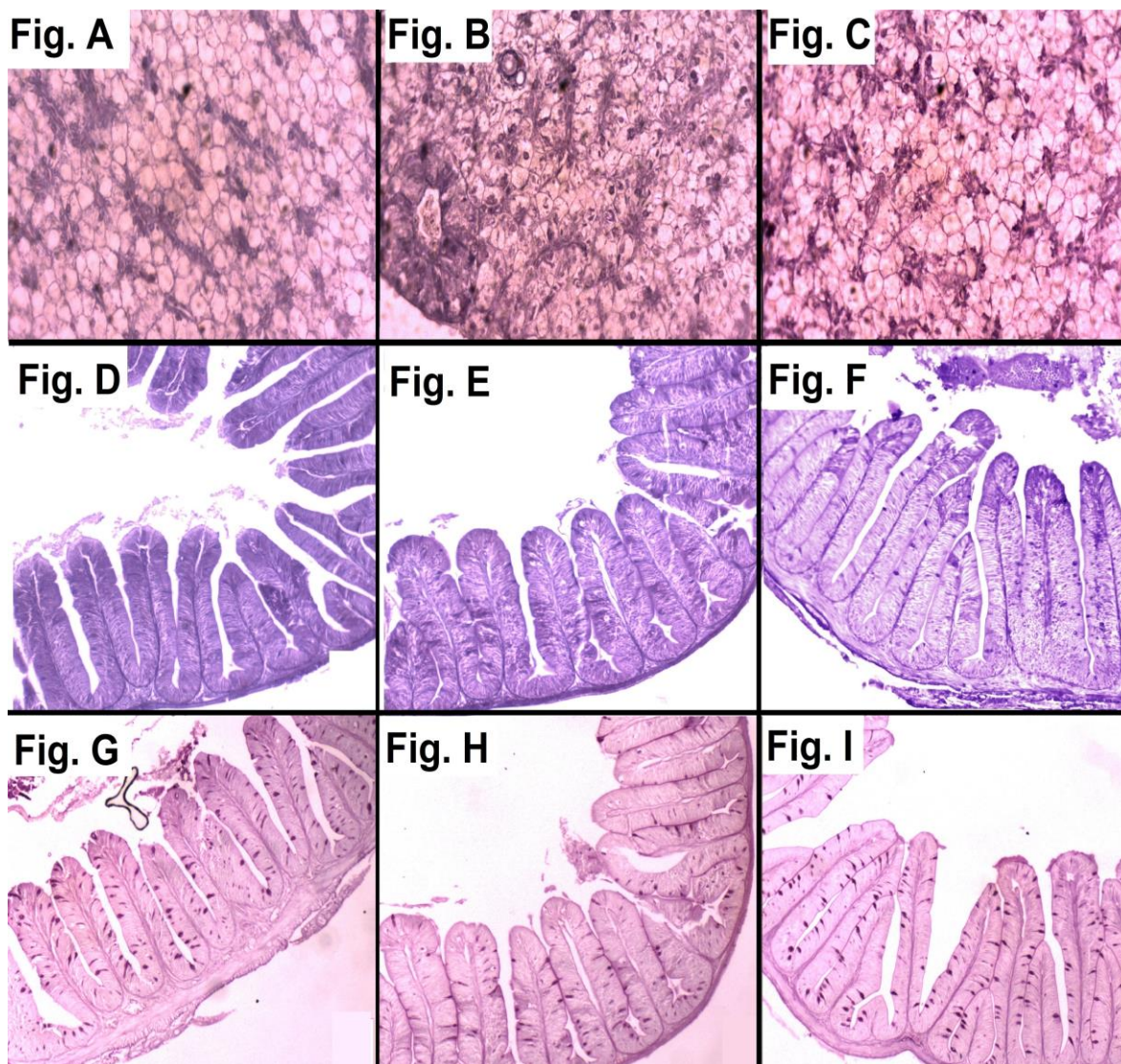


Figura 6. Variáveis hepáticas e intestinais de alevinos de Tilápias-do-Nilo após 26 dias de alimentação com e sem pólen apícola.

Legenda: **Fig. A** (0% ou controle), **B** (1,5% inclusão de pólen) e **C** (2,5% inclusão de pólen) = Área média dos hepatócitos ($AMH/\mu m^2$), Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), Objetiva: 40x; **Fig. D** (0% ou controle), **E** (1,5% inclusão de pólen) e **F** (2,5% inclusão de pólen) = Vilosidades intestinais, Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), Objetiva: 10x; **Fig. G** (0% ou controle), **H** (1,5% inclusão de pólen) e **I** (2,5% inclusão de pólen) = Células caliciformes, Coloração: Periodic Acid-Schiff (PAS), Objetiva: 40x.

4. Discussão

4.1 Qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água não sofreram oscilações significativas ao longo do período experimental. A temperatura, pH e oxigênio dissolvido se mantiveram dentro do

esperado para a espécie (El Sayed, 2006). As médias dos compostos nitrogenados encontrados são considerados normais e os demais valores (alcalinidade e ortofosfato) também ficaram de acordo com o esperado para tilápias (El Sayed, 2006). Já que todas essas variáveis se mantiveram dentro da faixa ótima para a espécie, acredita-se que os demais resultados foram influenciados diretamente pela alimentação fornecida, ou seja, pela inclusão de pólen às dietas.

4.2 Análises zootécnicas e índices organossomáticos

Aditivos alimentares são importantes para a nutrição animal, pois auxiliam na melhoria do desempenho, da saúde e ainda, no aproveitamento dos nutrientes pelos animais e a qualidade dos seus subprodutos (Brasil, 2004; Ribeiro et al., 2012). Diferentes aditivos têm sido empregados para tilápias em diferentes fases com o intuito de proporcionar principalmente melhores índices zootécnicos e de saúde animal (Schwarz et al., 2010; Schwarz et al., 2011; Abass et al. 2012; El-Asely et al., 2014; Freccia et al., 2016).

Neste sentido, Abbass et al., (2012) avaliaram o pólen como aditivo alimentar no desempenho zootécnico de tilápias do Nilo (~45 g) em sistema aberto com troca contínua de água. Os autores verificaram que a adição de 2,5% de própolis ou pólen na dieta melhorou a taxa de crescimento específico, o ganho médio diário e a eficiência alimentar das tilápias. El-Asely et al., (2014) também em sistema aberto ao investigarem a ação do pólen em tilápias-do-Nilo infectadas experimentalmente por *Aeromonas hydrophila*, observaram melhoras nos parâmetros zootécnicos como peso corporal, comprimento, ganho diário médio, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência alimentar. No presente estudo não foram observadas melhoras no desempenho dos animais com a inclusão do pólen, estas diferenças de resultados podem se justificar pelas diferenças entre pesos iniciais (~45g e ~29g respectivamente, *versus* ~1,25g do presente estudo), acarretando em diferentes curvas de crescimento. Além disso, a duração dos experimentos e as diferentes formulações entre as rações também podem ter contribuído para tais diferenças. Diferentes estudos avaliando o desempenho zootécnico com outras categorias animais tais como codornas (Faria et al., 2008), frangos de corte (Oliveira et al. 2015) e caipira (Araújo et al.,

2017) demonstraram que a inclusão de pólen não afetou negativamente a performance dos animais.

Altas taxas de sobrevivência foram observadas no presente estudo em todos os tratamentos (~92,8%). Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Freccia et al., (2016) que avaliou farinha de inseto em dietas de alevinos de tilápias (2,84 ± 0,35 g) nas mesmas condições experimentais que o presente estudo (RAS). El-Asely e colaboradores (2014) verificaram que a suplementação com pólen reduziu a mortalidade das tilápias desafiadas por *A. hydrophila*. Provavelmente, essa proteção é atribuída a atividade antibacteriana, ao aumento das respostas imunes e efeitos antioxidantes do pólen produzidos por seus flavonóides (Pietta, 2000).

Apesar do pólen ter contribuído para alterações morfométricas benéficas na mucosa intestinal e na morfologia hepática (seções 4.3 e 4.4), a adição deste não contribuiu para melhora da conversão alimentar aparente (CAA) dos animais. O mesmo foi observado com outros aditivos alimentares como *Bacillus subtilis* e MOS (Carvalho et al., 2011), levedura de *Saccharomyces cerevisiae* (Schwarz et al., 2016) e produto comercial à base de algas (Garcia et al., 2009). Acredita-se que o fornecimento de dietas com inclusão de pólen por um período maior possa acarretar em efeito mais proeminente em relação a CAA.

No presente estudo, não houve aumento ou diminuição significativa no IVS e IHS nas tilápias suplementadas, corroborando com os demais índices zootécnicos que não apresentaram oscilações. Schwarz et al., (2011), também não encontraram diferenças no IHS de larvas de tilápia alimentadas com MOS. Por outro lado El-Asely et al., (2014), verificaram um aumento significativo de IVS em juvenis de tilápia alimentadas com pólen. As características intrínsecas de cada dieta (níveis de nutrientes e suas formulações) certamente interferem nesses índices. Os resultados do presente estudo são satisfatórios, uma vez que, não alteram a dinâmica de reserva de nutrientes (IHS), bem como na qualidade da carcaça indiretamente expressada pela IVS.

4.3 Análise hepática

O parênquima hepático é 80% constituído de células compostas por hepatócitos (Cavichiolo, 2009). Esses hepatócitos estão distribuídos em dois cordões (arranjo cordonal)

entre dois sinusóides e apresentam, em condições adequadas, um ou dois núcleos arredondados e centralizados constituídos internamente por um ou mais nucléolos proeminentes (Vicentini et al., 2005, Cavichiolo, 2009). Essas células hepáticas normalmente se encontram lotadas de glicogênio ou gordura, no entanto, quando em situação de subalimentação e/ou inanição, podem estar com menor volume e todo o órgão hepático com pigmentos ceróides amarelados (Roberts, 2012).

No presente estudo, a maioria parte dos hepatócitos possuía aspectos normais com núcleo único em posição mais periférica e sem nucléolos visíveis (Figura 6). Houve acréscimo significativo da área dos hepatócitos nos tratamentos com inclusão de 1,5% e 2,5% quando comparados ao controle. Neste sentido, a inclusão de pólen refletiu no aumento da área dos hepatócitos que se pode traduzir em um aumento no estoque de nutrientes para essas células. Uma hipótese é que os aminoácidos essenciais presentes no pólen (Campos et al., 2008), após suprirem a exigência dos peixes para estes nutrientes, poderiam ser metabolizados e acumular-se nas células hepáticas como reserva de energia na forma de glicogênio e/ou lipídeo (Wolf et al., 2015). Isto é comum quando os peixes cultivados são alimentados com dietas, por exemplo, com altos níveis de energia, sendo o fígado (mais precisamente o citoplasma dos hepatócitos) o responsável pela estocagem de energia em excesso (Wolf et al., 2015) sendo este espécie/dieta dependente (Takashima e Hibiya, 1995; Wolf et al., 2015). Neste sentido, a inclusão dietética do pólen apícola alterou as células hepáticas aumentando suas reservas. Adicionalmente, Abbass et al. (2012) em estudo com juvenis de tilápia nilótica (~45g) alimentados com pólen e própolis sugerem uma atividade protetora hepática proporcionada pela inclusão desses aditivos às dietas, além disso, também foi observado um efeito protetor adicional contra lesões renais.

4.4 Análises intestinais - mensurações nas vilosidades e contagem de células caliciformes

O desenvolvimento da mucosa do intestino é representado pelo aumento no número de células epiteliais, como enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas, atrelado ao aumento na altura e densidade dos vilos epiteliais do intestino (Maiorka, 2002; Mello et al., 2013). Mucosas mais íntegras dotadas de vilosidades maiores possuem melhor capacidade absorptiva de nutrientes oriundos da alimentação (Junqueira e Carneiro, 2004;

Garcia, 2008), refletindo no desempenho e saúde dos peixes (Silva et al., 2010 e Jobling, 1995).

A análise histomorfométrica do intestino das tilápias no presente estudo (Tabela 4) demonstrou que os peixes alimentados com dietas contendo pólen apresentaram maior altura das vilosidades ($P<0.05$) quando comparado aos peixes alimentados com a dieta controle. Essas alterações positivas nos tratamentos com suplementação evidencia um caráter benéfico do pólen sobre a morfometria da mucosa epitelial, que podem colaborar para uma maior área de absorção e uma possível maior retenção de nutrientes, como corroborado e observado nas células hepáticas do presente estudo. Todos esses efeitos propiciam melhor condição homeostática dos animais, atuando na sobrevivência (Mello et al., 2013) em virtude do favorecimento da defesa do animal por meio de um maior número de células caliciformes produtoras de muco excretando substâncias antibacterianas (Noga, 1995).

A contagem de células caliciformes evidenciaram algumas ponderações relevantes, observando que a função primordial dessas células é a produção de muco (Noga, 1995). O muco, composto maiormente por glicoproteínas, é lotado de substâncias anti-bacterianas através da presença de lisozimas e ácidos graxos de baixo peso molecular (Noga, 1995) que servem para proteção e a lubrificação do revestimento intestinal (Junqueira e Carneiro, 2008). Sabe-se que a elevação da população de células caliciformes intestinais de peixes, bem como, seu incremento de produção de muco, estão associados a diversos fatores de ordem nutricional ou ambiental, como exposição a agentes patogênicos (Noga, 1995; Schwarz et al., 2010). Neste sentido, a adição de pólen no presente estudo contribuiu para o aumento do número de células caliciformes e, dessa forma, possivelmente também para a produção de muco incrementando a defesa intestinal contra a agressão, por exemplo, de microrganismos patogênicos.

Corroborando com o nosso estudo, diferentes aditivos alimentares têm demonstrado resultados benéficos quanto a morfologia intestinal de peixes como tilápias (Schwarz et al., 2011; Honorato et al., 2014) e lambaris-do-rabo-amarelo (Lima, 2014) e trazendo benefícios a saúde dos animais. A inclusão do pólen não é diferente e sua suplementação dietética em outros animais já foram observados como frangos de corte (Wang et al., 2007), coelhos (Attia et al., 2011a) e ratos (Hajková et al., 2013). Estes autores atribuem as

vitaminas, minerais e enzimas ou coenzimas existentes no pólen uma ação na melhoria digestiva dos alimentos (Wang et al., 2007; Xu et al., 2009; Attia et al., 2011a; Hajková et al., 2013).

Em suma, as diferenças significativas na histomorfometria intestinal e na morfologia hepática das tilápias suplementadas com pólen (principalmente no T 2,5%), podem ser atribuídas a ação e benefícios múltiplos, tais como, estimulador da saúde intestinal, aumento da área absorptiva, bem como, aumento da defesa pelo incremento do número de células caliciformes produtoras de muco. Mesmo com diversos benefícios demonstrados no presente trabalho, a suplementação dietética do pólen não refletiu em melhoras no desempenho zootécnico. Certamente futuros estudos com maior tempo de suplementação são necessários para melhor elucidar esta questão. Além disso, estudos relacionados à viabilidade econômica quanto à utilização deste aditivo poderão auxiliar na melhor definição dos níveis de suplementação em cultivos comerciais para fases jovens.

5. Conclusão

A inclusão de até 2,5% de pólen apícola em dietas aquícolas comerciais extrusadas para alevinos de tilápia-do-Nilo impactou positivamente na histomorfometria hepato-intestinal acarretando em aumento na altura das vilosidades intestinais e no número de células caliciformes. Além disso, promoveu maior área de absorção e retenção de nutrientes como observado nas células hepáticas sem causar efeito deletério no desempenho zootécnico dos animais.

Agradecimentos: Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina FAPESC (projetos 2013TR3406 e 2015TR453), ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (UNIEDU) pela bolsa de estudos da primeira autora e as equipes dos Laboratórios de Aquicultura e Patologia Veterinária do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE) pelo apoio e parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

- Abbass, A. A., El-Asely, A. M. Kandiel, M. M. M. 2012 Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Orochromis niloticus*. 2012. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12: 851-859 doi: 10.4194/1303-2712-v12_3_13
- Attia, Y.A., Al-Hanoun, A. and Bovera, F. 2011a. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95: 17- 26.
- Attia, Y.A., Al-Hanoun, A., El-Din, A.E., Bovera, F. and Shewika, Y.E. 2011b. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95: 294-303.
- Basim, E; Basim, h; Özcan, M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering., v. 77, n.4, p. 992-996.
- Bogdanov, S. 2004. Quality and standards of pollen and Beeswax. *Apiacta*, n. 38, p. 334-341.
- Brasil. Instrução Normativa nº 13 de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-13-de-30-de-novembro-de-2004.pdf/view> Acesso em: 23 nov. 2018.
- Campos, M.G.R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. Journal of Apicultural Research. 47:154-161.
- Carpes, S. T.; Cabral, I. S. R.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Masson, M. L. 2009. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 2, p. 271-277.
- Carvalho, J.V., Lira, A. D. Costa, D. S. P., Moreira, E. L. T. Pinto, L. F. B., Abreu, R. D., Albinati, R. C. B., Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de

- 538 tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. Revista
539 Brasileira de Saúde e Produção Animal. 12:176-187, 2011.
- 540 Cavichiolo, F. 2009. Histology: relevant tool for studies in cultured fish = Histologia:
541 ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. p. 602-324. In: Tavares-
542 Dias, M., ed. Management of Health and Safety in Fish Farming = Manejo e
543 Sanidade de Peixes em Cultivo. EMBRAPA, Macapá, AP, Brazil (in Portuguese).
- 544 Costa, D.V.D. 2015. Partição e destino metabólico do 14C-glicerol dietético em tecidos-
545 alvo de juvenis de tilápia. 2015. Tese (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) –
546 Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 547 Dias, D. M. B.; Oliveira, M. C.; Silva, D. M.; Bonifácio, N. P.; Claro, D. C.; Marchesin, W.
548 A. 2013. Bee pollen supplementation in diets for rabbit does and growing rabbits.
549 Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 35, n. 4, p. 425-430. doi:
550 10.4025/actascianimsci.v35i4.18950.
- 551 El-Asely, A. M., Abbass, A. A., Austin, B. 2014. Honey bee pollen improves growth,
552 immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection
553 with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, 40, 500-506.
- 554 El-Sayed, E.M., 2006. Tilapia culture. CABI publi. ed. Massachusetts, USA.
- 555 Faria, B. F., Freitas Neto, I. L., Gonçalves, B.N., Gonçalves, A. C., Bastos, S.S., Machado,
556 M.G., Oliveira, M.C., Lima, M. C. Desempenho de codornas japonesas submetidas
557 a dietas contendo pólen apícola. IV Jornada e III Mostra Científica da Faculdade de
558 Medicina Veterinária – Universidade de Rio Verde. Rio Verde – Go. 2008.
- 559 Food and Agriculture Organization (FAO). 2018. The state of World Fisheries and
560 Agriculture - Meeting the sustainable development goals. Disponível em:
561 <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2018.
- 562 Feás, X.; Vázquez-Tato, M. P.; Stevinho, L.; Seijas, J. A.; Iglesias, A. 2012. Organic Bee
563 Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds. Antioxidant
564 Activity and Microbiological Quality. Molecules, v. 17, n. 7, p. 8359-8377. doi:
565 10.3390/molecules17078359.
- 566 Freccia, A., Meuer, E.S., Filho, J.C., Jerônimo, G.T, Emerenciano, M.G.C. 2016. Farinha
567 de inseto em dietas de alevinos de tilápia. Archivos de Zootecnia, 65(252), 541-547.
568 doi: 10.21071/az.v65i252.1923

- 569 Garcia, F. 2008. Suplementação alimentar com β -glucano e mananoligossacarídeo
570 para tilápias do Nilo em tanques-rede. Tese de Doutorado em Aquicultura, Centro
571 de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 100p.
- 572 Garcia, F. Abimorad, E. G., Schalch, S. H. C., Onaka, E. M., Fonseca, F. S., 2009. Growth
573 performance of Nile tilapia fed on a diet supplemented with algae products. *Bioikos*,
574 Campinas, 23(2):83-89.
- 575 Geyman, J. P. 1994. Anaphylactic reaction after ingestion of bee pollen. The Journal of the
576 American Board of Family Practice, v. 7, n. 3, p. 250-252.
- 577 Hajkova, Z., Toman, R., Hluchý, S., Gálik, B., Bíro, D., Martiniaková, M., Omelka, R.,
578 Boboňová, I. 2013. The effect of pollen on the structure of the small intestine in rats
579 after an experimental addition in diet. *Animal Science and Biotechnologie*, 46
580 (1):232-237
- 581 Henriques, J. K.S, Pucci, L. E. A., Uczay, J., Lazzari, R., Uczay, M., Batistella, Molinari,
582 M., Rodrigues, R. B., Durigon, E. G. 2014. Efeito do pólen apícola sobre a
583 morfometria intestinal de frangos de corte. In: XXIV Congresso Brasileiro de
584 Zootecnia. Vitória/ES, Anais... A Zootecnia Fazendo o Brasil Crescer, 3p.
- 585 Honorato, C.A., Cruz, C., Carneiro, D.J., Machado, M.R.F., Nascimento, C.A., Saturnino,
586 K.C. 2014. Histology and histochemical the medium intestine in Nile tilapia
587 (*Oreochromis niloticus*) fed diets with fish silage. *Brazilian Journal of Veterinary*
588 *Research and Animal Science*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 281-288.
589 doi:10.1590/S0100-736X2014001300012
- 590 Jobling, M. Environmental biology of fishes. 1995. Fish and Fisheries Series 16. London:
591 Chapman & Hall, 455p.
- 592 Junqueira, L.C.U., Carneiro, J. 2004. Histologia básica. 10. ed. Guanabara Koogan S.A., p.
593 324-334.
- 594 Junqueira, L.C.U., Carneiro, J. 2008. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara
595 Koogan, 524p.
- 596 Lima, F. W. 2014. Colonização e morfometria intestinal de Lambaris-do-rabo-amarelo
597 (*Astyanax altiparanae*) alimentados com dietas contendo levedura (*Saccharomyces*
598 *cerevisiae*) como probiótico. Tese de Mestrado em Biologia Animal. Universidade
599 Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais. 50p.

- 600 Maiorka, A. 2002. Efeito da idade da matriz e do agente trófico (glutamina) sobre o
 601 desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos
 602 de corte na primeira semana. Tese (Zootecnia) Universidade Estadual Paulista.
 603 Jaboticabal.
- 604 Mello, H., Moraes, J. R. E., Niza, I.G, Moraes, F.R., Ozório, R.O.A., Shimada, M., Tie,
 605 E.F., Jair, R, Claudiano, G.S. 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de
 606 juvenis de Tilápia-do-Nilo. Pesquisa Veterinária Brasileira, 33(6), 724-730. doi:
 607 10.1590/S0100-736X2013000600006
- 608 Nascimento, J. R., Medeiros, F. M., Miranda, L. M. B., Lendengue, G. M. A., Melo, R. V.,
 609 Goulart, C. C., Bastos-Leite, S. C., Rolim e Vasconcelos, P. 2015. Efeito do uso de
 610 pólen de abelhas do gênero *Scaptotrigona* sp em substituição ao antibiótico no
 611 desempenho de frango de corte. In: XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia.
 612 Fortaleza/CE, Anais... Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia, 3p.
- 613 Noga E.J. 1995. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, St Louis.
 614 367p.
- 615 Nunes, C. S., Cinsa, L. A. 2016. Princípios do processamento histológico de rotina. Revista
 616 Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 8, n. único, p. 31-40. Disponível em: <
 617 <https://riee.ufjf.emnuvens.com.br/riee/article/download/2884/1081>> Acesso em: 20
 618 nov. 2018.
- 619 Oliveira, M. C., Locha, F. C., Silva, D. M., Martins, P. C., Teixeira, A. S., Claro, D. C.
 620 2015. Uso del polen de abeja en la alimentación de pollos de engorda: Revista
 621 Mexicana de Ciencias Pecuárias. ;6(3):263-276. ISSN 2448-6698
- 622 Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L. M. 2014. Biological
 623 activities of comercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and
 624 anti-inflammatory. Food and Chemical Toxicology, v. 63, p. 233-239. doi:
 625 10.1016/j.fct.2013.11.010.
- 626 Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. 63: 1035-1042.
- 627 Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L. H. 1992. Laboratory Methods in
 628 Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279 p
 629 ISBN 1-881041-00-X
- 630 Ribeiro, P. A. P., Melo, D. C., Costa, L. S. Teixeira, E. A. 2012. Manejo nutricional e

- 631 alimentar de peixes de água doce. 1. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, v. 1. 89p.
- 632 Roberts, R. J. 2012. Fish Pathology. Wiley-Blackwell, London, 583p.
- 633 Rodrigues, R. B; Pucci, L. E. A; Uczay, J; Molinari, M; Lazzari, R; Uczay, M. 2018. Pólen
- 634 apícola como aditivo em dietas para frangos de corte. Pesquisas Agrárias e
- 635 Ambientais. v.6, n. 5, p. 551-556. doi: <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v6i5.5865>
- 636 Sampaio, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:
- 637 Universidade Federal de Minas Gerais, p.221.
- 638 Schwarz, K. K., Furuya, W. M., Natali, M.R.M., Michelato, M., Gaudezi, M. C. 2010.
- 639 Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. Acta Scientiarum -
- 640 Animal Sciences, v.32, n.2, p.197-203. doi:10.4025/actascianimsci.v32i2.7724
- 641 Schwarz, K. K., Furuya, W. M., Natali, M.R.M., Gaudezi, M. C., Lima, P. A. G. 2011.
- 642 Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. Revista Brasileira de
- 643 Zootecnia, 40(12), 2634-2640. doi:10.1590/S1516-35982011001200003
- 644 Schwarz, K. K., Nascimento, J C., Gomes, V. A. A., Da Silva, C. H., Salvador, J. G. ,
- 645 Fernandes, M. R., Nunes, R. M. 2016. Desempenho zootécnico de alevinos de
- 646 tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com levedura de
- 647 *Saccharomyces cerevisiae*. Holos, ano 32, Vol. 3. doi: 10.15628/holos.2016.1869
- 648 Selmanoğlu, G., Hayretdağ, S., Kolankaya, D., Tuylu, A.O., Sorkun, K. 2009. The Effect of
- 649 Pollen on Some Reproductive Parameters of Male Rats. Pesticides &
- 650 Phytomedicine (Belgrade). 24: 59-63. UDC: 638.178.2:615.9(496.02)
- 651 Sokal, R.R.; F.J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles of statistics in biological research.
- 652 New York, Freeman, 887p.
- 653 Silva, L.C.A.R., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Schamber, C.R., Santos, L.D., Vidal,
- 654 L.V.O. 2010. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo
- 655 alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. Brazilian
- 656 Journal of Animal Science, 39(6), 1175-1179. doi: 10.1590/S1516-
- 657 35982010000600002
- 658 Takashima, F., Hibiya, T. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological
- 659 features. 2ed. Fisher, New York, NY, USA.
- 660 Tessaro, L., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Krause, R.A., Meurer, F., Natali, M.R.M.,
- 661 Bombardelli, R.A. 2012. Growth and reproductive characteristics of Rhamdia

- 662 quelen males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase.
 663 Aquaculture 326, 74–80. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.012
- 664 Tolosa, E. M. C., Junqueira, R. C., Behmer, O. A., Freitas Neto, A. G. 1976. Manual de
 665 técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, 256p.
- 666 Vicentini, C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Bombonato, M. T. S., Bertolucci, B., Lima,
 667 S. G., Santos, A. S. 2005. Morphological Study of the Liver in the Teleost
 668 *Oreochromis niloticus*. International Journal of Morphology, 23(3), 211-21.
 669 Disponível em: <[https://pdfs.semanticscholar.org/cb00/621a86729e48321afd43](https://pdfs.semanticscholar.org/cb00/621a86729e48321afd433aed03063ab64cf6.pdf)
 670 [3aed03063ab64cf6.pdf](https://pdfs.semanticscholar.org/cb00/621a86729e48321afd433aed03063ab64cf6.pdf)> Acesso em: 13 out. 2018.
- 671 Xu, X.; Sun, L., Dong, J., Zhang, H. 2009. Breaking the cells of rape bee pollen and
 672 consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide. Innovative
 673 Food Science & Emerging Technologies; 10:42e6.
- 674 Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. second ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- 675 Zeedan, Kh. I. I., Battaa, A. M., El-Neney., Abuoghaba, A. A. A. A., El-Kholy, K. H. 2017.
 676 Effect of bee pollen at different levels as natural additives on immunity and
 677 productive performance in rabbit males. Egyptian Poultry Science Journal, Vol. 37
 678 Issue 1, p213-231. 19p.
- 679 Wang, J., LI, S. H., Wang, Q. F., Xin, B. Z., Wang, H. 2007. Trophic effect of bee pollen
 680 on small intestine in broiler chickens. Journal of Medicinal Food 10 (2): 276-280.
 681 doi: 10.1089/jmf.2006.215
- 682 Wolf, J., Baumgartner, W.A., Blazer, V.S., Camus, A.C., Engelhardt, J.A., Fournie, J.W.,
 683 Frasca, S., Groman, D.B., Kent, M.L., Khoo, L.H., Law, J.M., Lombardi, E.D.,
 684 RuehlFehlert, C., Segner, H.E., Smith, S.A., Spitsbergen, Weber, K., Wolfe, M.J.,
 685 2015. Nonlesions, misdiagnosis, missed diagnosis, and other interpretive challenges
 686 in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors reviewers and
 687 readers. Toxicology Pathology. 43(3):297-325. doi: 10.1177/0192623314540229

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de até 2,5% de pólen apícola em dietas aquícolas comerciais extrusadas para alevinos de tilápia-do-Nilo impactou positivamente na histomorfometria hepato-intestinal acarretando em aumento na altura das vilosidades intestinais e no número de células caliciformes. Além disso, promoveu maior área de absorção e retenção de nutrientes como observado nas células hepáticas sem causar efeito deletério no desempenho zootécnico dos animais.

4. RECOMENDAÇÕES E FUTURAS PESQUISAS

- Estudos com maior tempo de suplementação de pólen;
- Estudos em outras fases no cultivo das tilápias (por exemplo a pré-engorda, engorda e para reprodutores);
- Estudos relacionados à viabilidade econômica quanto à utilização do pólen apícola em cultivos comerciais;
- Estudos deste aditivo em diferentes sistemas de produção, como por exemplo, em sistemas de bioflocos.

5. REFERÊNCIAS

ABBASS, A. A. et al. Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Orochromis niloticus*. 2012. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 12: 851-859 (2012) DOI: 10.4194/1303-2712-v12_3_13

ALBUQUERQUE, D. M. et al. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 08, p. 1503-1508, 2013.

ALI, M. et al. Maintenance/submaximum feeding schedules for reducing solid wastes and improving feed conversion in aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.41, n.3, p.319-331, 2010.

ALMARAZ-ABARCA, N. et al. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora* Leguminosae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p.119-124, 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.105-111, 2005.

ARAÚJO, H. et al. Pólen de abelhas nativas como aditivo natural para frangos de diferentes linhagens caipira de 1 a 63 dias de idade. **Anais...** Zootec Santos-SP. 2017.

ARRUDA, V. A. Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. **Journal of Apicultural Research**, 2017.
doi:1080/00218839.2017.1307715

BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial microbiota isolated from fish digestivetracts. **Aquaculture International**, v. 10, 109–121, 2002.

BARRETO, L. M. R. C. et al. **Produção de pólen no Brasil**. Taubaté, SP: Cabral Universitária, 2006. 100p.

BASIM, E. et al. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n.4, p. 992-996, 2006.

BEVERIDGE, M. C. M.; McANDREW, B. J. Tilapias: biology and exploitation. **Kluwer Academic Publishers**: Dordrecht, Netherlands, 493p. 2000.

BOCK, C. L. et al. Phytase in diets for Nile tilapia in the growth period. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, supl. p. 1455-1461, 2007.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and Beeswax. **Apiacta**, n. 38, p. 334-341, 2004.

BOSCARDIN, N.R. **Produção Aquícola**. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. (org). Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília, p.27-72, 2008.

BOSCOLO, W. R. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 2001; (30/5): 1391-6.

BOSCOLO, W. R. et al. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**., 2002, (31/2): 539-545.

BRASIL. **Instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. 2001. Disponível em: <
http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GTA/Legislacao/Legislacoes_Manual_Fiscalizacao_Transito_Agropecuario/IN_Mapas_03_2001.pdf> Acesso em: 01 dez. 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 13 de 2004**. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. 2004. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-13-de-30-de-novembro-de-2004.pdf/view> Acesso em: 23 mar. 2018.

BRASIL. **Produção de tilápia cresce mais de 200% em dez anos no Brasil**. 2017. Disponível: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/04/producao-de-tilapia-cresce-200-em-dez-anos-no-brasil>. Acesso em: 28 abr. de 2018.

BREGNBALLE, J. **A guide to recirculation Aquaculture: An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems**. FAO: Roma e EUROFISH: Copenhagen. 2015, 95 p.

CARDOSO, I. L. **Ácido cítrico em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidades de Mato Grosso do Sul: Araquidua, 2016.

CARPES, S. T.; et al. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 271-277, 2009.

CARVALHO, J.V. et al. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 12:176-187, 2011.

COSTA, D.V.D. **Partição e destino metabólico do 14C-glicerol dietético em tecidos-alvo de juvenis de tilápia**. 2015. Tese (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

DA SILVA, R. F. et al. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres**. 55(4): 352-355, 2008. ISSN 0034-737X

DIAS, D. M. B.; et al. Bee pollen supplementation in diets for rabbit does and growing rabbits. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 35, n. 4, p. 425-430, 2013. doi: 10.4025/actascianimsci.v35i4.18950.

EL-ASELY, A.M et al. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. 2014. **Fish & Shellfish Immunology**, 40 (2014) 500-506.

EL-SAYED, E.M., 2006. **Tilapia culture**. CABI publi. ed. Massachusetts, USA.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO, 2014.

_____. **The state of world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all**. Roma: FAO 200 p, 2016.

_____. **The state of World Fisheries and Agriculture - Meeting the sustainable development goals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2018.

FARIA, B. F. et al. Desempenho de codornas japonesas submetidas a dietas contendo pólen apícola. **IV Jornada e III Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária** – Universidade de Rio Verde. Rio Verde – Go. 2008.

FÉAS, X.; et al., Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds. Antioxidant Activity and Microbiological Quality. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8359-8377, 2012. doi: 10.3390/molecules17078359.

FILIPETTO, J. E. S. et al. Substituição de fígado bovino por glúten de milho, glúten de trigo e farelo de soja em rações para pós-larvas de piavas (*Leporinus obtusidens*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 192-197, 2005.

FITZSIMMONS, K. et al. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet? In: Liu, L.P., Fitzsimmons, K. (Eds.), Proceedings of the **9th International Symposium on tilapia in Aquaculture**, Shanghai, pp. 1–8, 2011.

FURUYA, W.M. et al. Fitase na Alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.): desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.30, n.3, p.924-929, 2001.

GEYMAN, J. P. Anaphylactic reaction after ingestion of bee pollen. **The Journal of the American Board of Family Practice**, v. 7, n. 3, p. 250-252, 1994.

GILDBERG, A.; et al. Probiotic effect of latic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v. 352, p. 279-285, 1997.

GOODMAN, L.J. **Form and function in the honey bee**. Cardiff: International Bee Research Association, 2003. 220p.

GRAM, L.; et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969-973, 1999.

GRANADA, L. et al. Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? A review. **Reviews in Aquaculture**. 2016, 8, 283–300.

HAYASHI, C. et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 823-828, 2002.

HENRIQUES, J. K. S. Efeito do pólen apícola sobre a morfometria intestinal de frangos de corte. In: XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Vitória/ES, **Anais... A Zootecnia Fazendo o Brasil Crescer**, 3p. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. 2015.

IWASHITA, M. K. P. et al. **Incorporação de aditivos na ração de peixes**. Palmas: Embrapa, 2014. 4 p. (Embrapa. Circular Técnica, 1).

KIM, K. W. et al No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 12, p. 1055-1058, 2003.

KIRKAN, S. et al. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatcheries farms. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, p. 339-342, 2003.

KROGDAHL, A. et al., Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v.11, 103–122, 2005.

KUBITZA, F. Sistemas de Recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reúso da água. **Revista Panorama da Aquicultura**, maio/junho, 2006.

KUBITZA, F. Manejo da Produção de Peixes: Parte 2: O uso eficiente da aeração. **Revista Panorama da Aquicultura**, setembro/outubro, 2008.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2ª ed; Jundiaí: Kubitza, 2011.

KULMAR, V. et al. Phytato and phytase in fish nutrition. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 96 (2012) 335–364, 2011.

LANDER, T.R. et al. Characterization of the suspended organic particles released from salmon farms and their potential as a food supply for the suspension feeder, *Mytilus edulis* in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) systems. **Aquaculture** 2013, 406–407, 160–170.

LEENHOUWERS, J.I., Fermentability of carbohydrates in an in vitro batch culture method using inocula from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Nutrition** 14, 523–532, 2008.

LEIRA, M. H. et al. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública.**, v. 3, n. 1, p. 044-059, 2016.

LEMIEUX, H. et al. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology Biochemistry**, v.20, 293–303, 1999.

MARCHINI, L. C. et al. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

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

MARTINS, C.I.M. et al. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability. **Aquaculture Engineering**, v.43, n.3, p.83–93, 2010.

MELLO, H. et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 33(6):724-730, junho 2013.

MELO, K.D.M.; et al. Adição de fitase em rações para tilápia-do-Nilo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 107(581-582): 85-89, 2012.

MEUER, F. et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**; (31/2): 566-73. 11, 2002.

MODRO, A. F. H. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.8, p.1057-1065, ago. 2007.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira** – 2015/2020. Brasília/DF: 2015.

NASCIMENTO, J. R. et al. Efeito do uso de pólen de abelhas do gênero *Scaptotrigona* sp em substituição ao antibiótico no desempenho de frango de corte. In: XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Fortaleza/CE, **Anais...** Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia, 3p. 2015.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research** 41, 1553–1573, 2010.

NIKOSKELANEN, S.; et al. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2430-2435, 2001.

OLIVEIRA, M. C. D. et al. Uso del polen de abeja en la alimentación de pollos de engorda: **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**. ;6(3):263-276, 2015.

OSTRENSKY, A.; et al. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. In: BOSCANDIN, N.R. Espécies cultivadas na aquicultura continental. Brasília, 2008. p. 56-57.

ÖZCAN, M. et al. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. **Nahrung-Food**. v. 48, n.1, p.188-194, 2004.

PASCOAL, A.; et al. Biological activities of comercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 233-239, 2014. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.010.

PEIXE BR. **Associação Brasileira de Piscicultura**. 2018. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/peixe-br-cumpre-agenda-de-reunioes-em-brasilia-df/>> Acesso em: 02 dez. 2018.

PINHO, S.M. et al. Effluent from a biofloc technology (BFT) tilapia culture on the aquaponics production of different lettuce varieties. **Ecological engineering**. v.103, p.146-153, 2017.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. **Status report to commercial tilapia producers on monosex ingerling productions techniques**. In: AQUICULTURA BRASIL, Recife, BR., 1998. Anais... Recife, BR: Associação Brasileira de Aqüicultura, 1998. p. 127-145.

RAWLS, J.F. et al. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. **PNAS** **101**, 4596–4601, 2004.

RAY, A.K. et al. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, 465–492, 2012.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aqüicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aqüicultura no Brasil. Aquabrazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 52-57, 2009. (Supl. especial).

RIBEIRO, P. A. P.; et al. **Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce**. 1. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, v. 1. 89p. 2012.

RIDHA, M.T.; CRUZ, E.M. Effect of biofilter media on water quality and biological performance of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. reared in a simple recirculation system. **Aquaculture Engineering**, v.24, n.2, p.157-166, 2001.

RINGØ, E. et al. Intestinal microbiota of salmonids, a review. **Aquaculture Research**, v 26, 773–789, 1995.

_____; BIRKBECK, T.H. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v,30, 73–93, 1999.

_____; OLSEN, R.E. The effect of diet on aerobic bacterial microbiota associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, 22–28, 1999.

_____; et al. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with distal of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture Research**, v. 37, 891–897, 2006a.

_____; et al. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, v. 261, 829–841, 2006b.

_____; et al. Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. **Aquaculture Research**, v. 39, 1087–1100, 2008.

RODRIGUES R. B et al. Pólen apícola como aditivo em dietas para frangos de corte. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**. v.6, n. 5, p. 551-556, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v6i5.5865>

SAHA, A.K.; RAY, A.K. Cellulase activity in rohu fingerlings. **Aquaculture International**, v. 6, 281–291, 1998.

SAHA, S. et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon Idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**. v.37, 380–388, 2006.

SCORVO FILHO, J. D. et al. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 112-118, 2010. (Supl. especial).

SINDIRAÇÕES – Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. **Posicionamento da Indústria de Alimentação Animal**. 2011. Disponível em: <www.sindiracoes.org.br> Acesso em: 07 dez. 2018.

TAL, Y. et al. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. **Aquaculture**, v.286, n.1–2, p.28–35, 2009.

TIMMONS, M.B.; EBELING, J.M., Recirculating Aquaculture Systems. 3^a ed. **Northeastern Regional Aquaculture Center**, New York. 2007.

XU, X. et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 10:42e6, 2009.

YIN, G., et al. Chinese herbs (*Lonicera japonica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. p. 269-282, 2008. In Bondad- Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). **Diseases in Asian Aquaculture VI**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

YOGEV, U. et al. Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v.467, p.118-126, 2017.

WALLER, U. et al. Integrated multi-trophic aquaculture in a zero-exchange recirculation aquaculture system for marine fish and hydroponic halophyte production. **Aquaculture International**. 2015, 23, 1473–1489.

CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA

Certificado de Aprovação CEUA/UNIBAVE

ceua <ceua@unibave.net>

qua 04/07/2018 10:34

Para: picoli.zootecnista@hotmail.com <picoli.zootecnista@hotmail.com>;

Bom dia Fernanda,

Certificado de Aprovação CEUA/UNIBAVE

Certificados que a proposta intitulada "Inclusão de pólen de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de recirculação de água (RAS): desempenho zootécnico e histomorfometria hepato-intestinal", protocolada sob o CEUA nº 004/2018 (Protocolo 004), que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com Decreto 6.889 de 15 de julho de 2009, bem como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE), na reunião de 02/07/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica).

Vigência da Proposta: de 07/2018 a 07/2019. Área: Ciência Animal

Local do experimento: os peixes serão mantidos durante o experimento em uma área restrita do Centro Universitário Barriga Verde (UNIBAVE), do Laboratório de Aquicultura, campus Orleans/SC. A etapa histológica e histométrica será realizada no Hospital Veterinário do UNIBAVE (HVU), campus Orleans/SC.

André Freccia

Coordenador CEUA/UNIBAVE

Nº CIAEP 01.0519.2018

ANEXOS

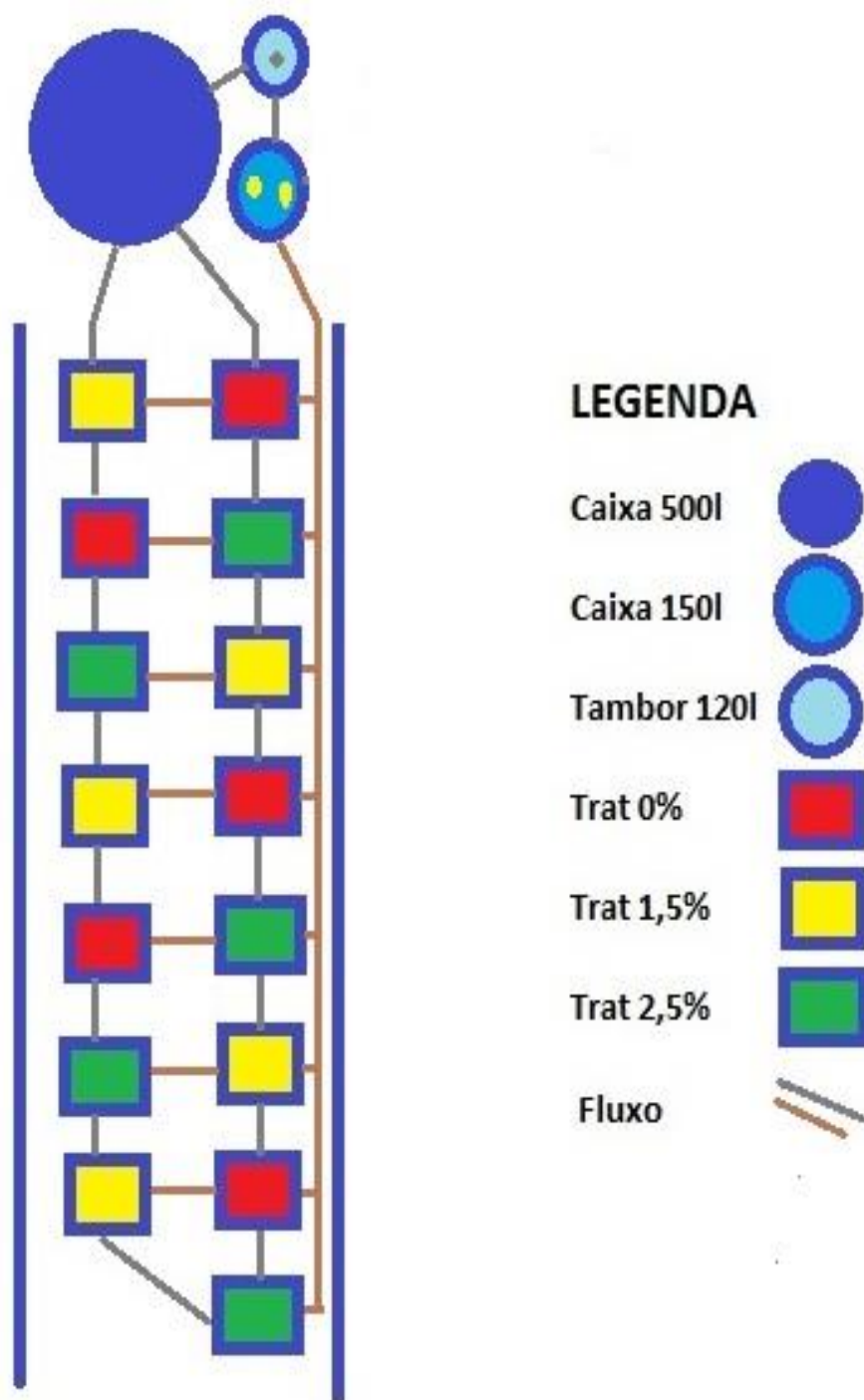


Figura 1. Esquema do dispositivo experimental.
Fonte: Autor.



Figura 2. Pólen apícola utilizado no experimento.
Fonte: Autor.



Figura 3. Biometria realizada no experimento.
Fonte: Autor.

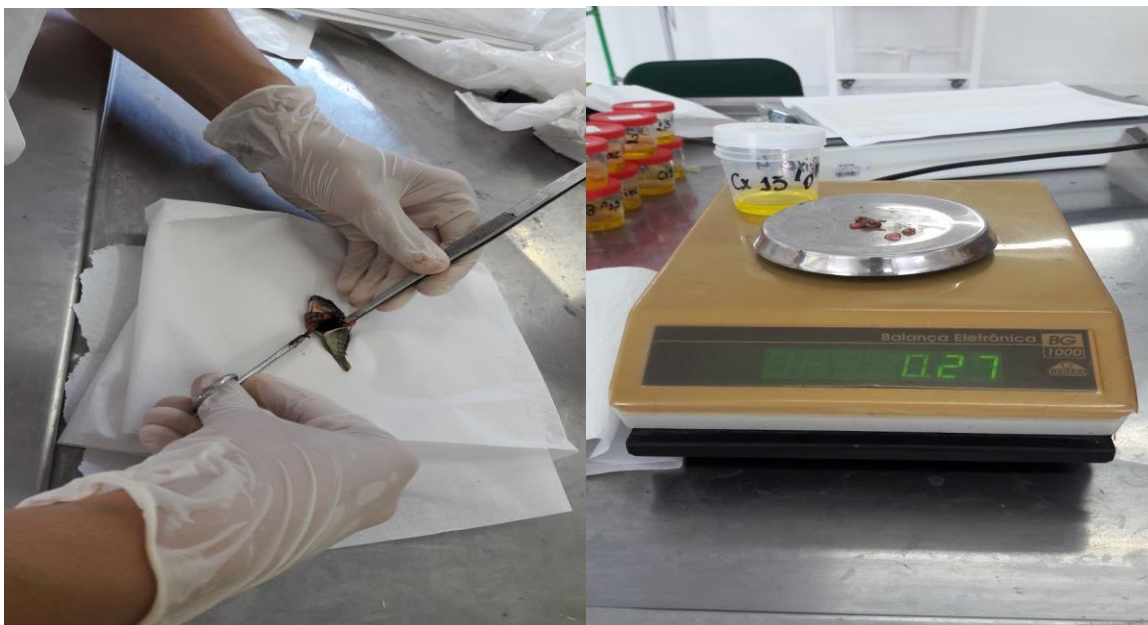


Figura 4. Coleta e pesagem dos órgãos.
Fonte: Autor.

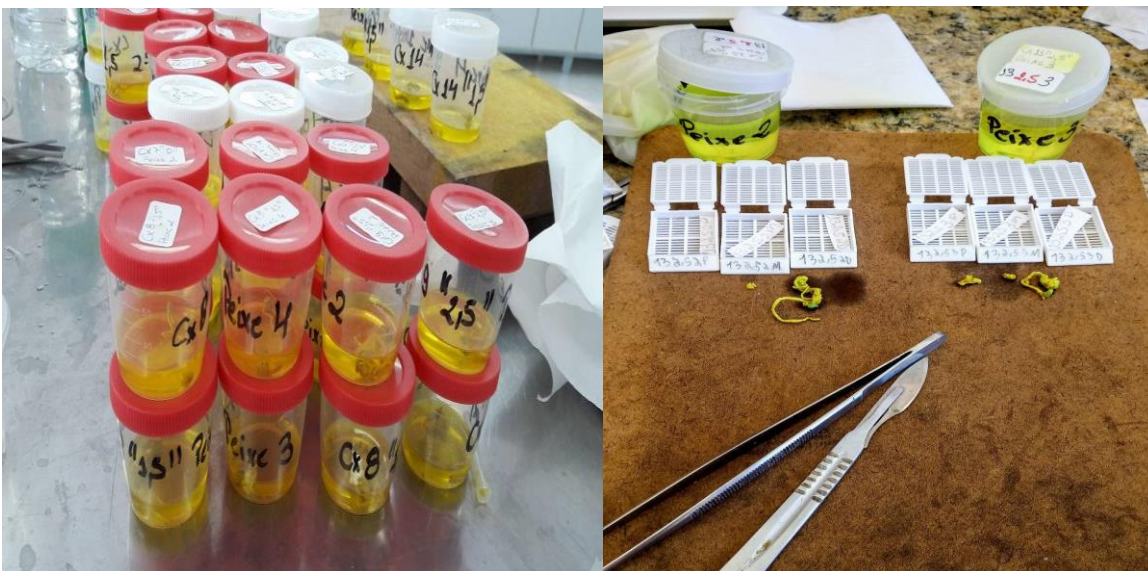


Figura 5. Preparo das amostras intestinais e hepáticas para análises histológicas.
Fonte: Autor.



Figura 6. Amostras intestinais e hepáticas para análises histológicas.
Fonte: Autor.



Figura 7. Equipe de trabalho - UNIBAVE.
Fonte: Autor.