

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

THIAGO GABRIEL LUCZINSKI

PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO

Toledo

2019

THIAGO GABRIEL LUCZINSKI

PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Toledo

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Luczinski, Thiago Gabriel
Proteína hidrolisada de frango em dietas para juvenis
tilápia-do-Nilo / Thiago Gabriel Luczinski;
orientador(a), Wilson Rogério Boscolo, 2019.
29 f.

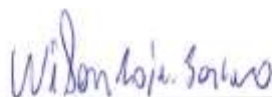
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2019.

I. Hidrolisado . 2. Nutrição . 3. Tilápia. 4. Piscicultura. I. Boscolo, Wilson Rogério. II. Título.

THIAGO GABRIEL LUCZINSKI

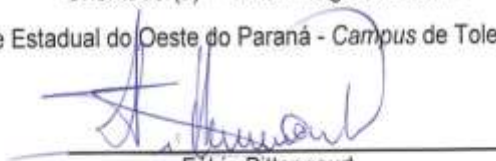
Avaliação da inclusão de proteína hidrolisada de frango em rações para adultos de tilápia do Nilo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, área de concentração Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, linha de pesquisa Aquicultura, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



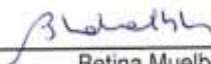
Orientador(a) – Wilson Rogério Boscolo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo (UNIOESTE)



Fábio Bittencourt

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo (UNIOESTE)



Betina Muelbert

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Toledo, 28 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me dado forças para atingir meus objetivos e sempre ter colocado pessoas boas em meu caminho.

A CAPEs pela concessão da bolsa de mestrado.

A Unioeste por disponibilizar estrutura necessária para realização desse estudo.

Ao meu orientador, Prof. Wilson Boscolo, por todo apoio e conhecimento passado durante o mestrado. Muito obrigado!

Aos Professores do GEMAq, Aldi Feiden, Altevir Signor e Fábio Bittencourt, por toda atenção, E ensinamentos nesse período.

A BRF, por todo o suporte necessário para a realização deste estudo.

A todos os amigos e colegas do GEMAq, que contribuíram direta ou diretamente para que esse momento acontecesse.

Aos meus familiares por todo apoio financeiro e emocional nessa caminhada em busca de conhecimento.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, por todo suporte e atenção.

PROTEÍNA HIDROLISADA DE FRANGO EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO

RESUMO

Os efeitos da inclusão da proteína hidrolisada de frango (PHF) sobre o desempenho produtivo, respostas hematológicas e bioquímicas e histologia do fígado, intestino e músculo foram avaliados para juvenis de tilápia-do-Nilo. Peixes com $221,37 \pm 2,58$ g de peso médio (n=240), foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques (420 L cada) e alimentados com dietas contendo 0; 1; 2; 3; 4 e 5% da PHF. O alimento foi ofertado em quatro porções diárias, à vontade, durante período de 30 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e quatro repetições. A dieta contendo 4% da PHF determinou ($P<0,05$) melhores rendimentos de filé e menor peso relativo do intestino comparada a não suplementada. De modo similar, o rendimento de cabeça e peso relativo do intestino foi inferior ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta com 1% da PHF. O teor de lipídeos no filé diferiu ($P<0,05$) entre as dietas contendo 3 e 5% de PHF, sendo menor para o mais alto nível. Reduções significativas foram observadas para os triglicerídeos plasmáticos ao nível de 2% e acima deste. Observou-se aumentos significativos no HDL e concomitante redução no VLDL em peixes alimentados com rações contendo 4 e 5% da PHF. Para espessura do epitélio intestinal diferenças ($P<0,05$) foram verificadas entre as dietas com 1 e 4% da PHF. A inclusão de 4% PHF resultou em aumento no rendimento de filé, modificação morfométrica do intestino e alterações no metabolismo energético, estudos adicionais, avaliando os efeitos da PHF sobre aspectos fisiológicos são necessários para que sejam estabelecidos níveis ideais de inclusão.

Palavras-chave: hidrolisado proteico, nutrição animal, *Oreochromis niloticus*, piscicultura

CHICKEN PROTEIN HYDROLYSATE IN DIETS FOR NILE TILAPIA JUVENILES

ABSTRACT

The effects of graded levels of dietary chicken protein hydrolysate (CPH) inclusion on growth performance, hematological and biochemical responses and liver, gut and muscle histology by juveniles of Nile tilapia were analyzed. Fish with 221.37 ± 2.58 g of average body weight ($n = 240$) were randomly distributed in 24 conical tanks (420 L each) and fed with diets containing 0; 1; 2; 3; 4 and 5% of CPH. The fish were fed four times a day, *ad libitum*, during 30 days. The experimental design was entirely randomized with six treatments and four replicates. The best results ($P < 0.05$) for fillet yield was observed for diets containing 4% CPH when comparing with diet no supplemented. For this diet also was observed lower gut weight ($P < 0.05$). Likewise, head and gut weight were lower ($P < 0.05$) for fish fed 1% CPH diet. The fillet fat was different between diets containing 3 and 5% CPH, being lower for the highest level. Significant reduction was observed for plasma triglycerides at 2% and above this level. Significant increase on HDL and concomitant reduction on VLDL was observed for fish fed 4 and 5% CPH diets. For thickness of the intestinal epithelium effects ($P < 0.05$) was observed between diets containing 1 and 4% CPH. The inclusion of 4% PHF resulted in increased fillet yield, morphometric gut modification and changes in energy metabolism, additional studies evaluating the effects of PHF on physiological aspects are necessary to establish inclusion levels.

Key words: protein hydrolysate, animal nutrition, *Oreochromis niloticus*, fish farming

Dissertação de Mestrado elaborado e formatado conforme as normas da publicação científica da revista Boletim Instituto de Pesca. Disponível em: <
<http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODO	11
Delineamento experimental	12
Análises químicas e perfil de peptídeos	14
Análises histológicas.....	15
Análises hematológicas e bioquímicas	15
Análise estatística	16
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÕES	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23

INTRODUÇÃO

A identificação de apropriadas estratégias de transformação de resíduos tem possibilitado a geração de produtos com amplo espectro de aplicação (Wergedahl et al., 2004), representando importante oportunidade para redução de custos e impacto ambiental associados à disposição dos subprodutos gerados pela indústria alimentícia (Liu et al., 2014; Matinéz-Alvarez et al., 2015; Tonon et al., 2016). Em anos recentes, numerosos estudos demonstraram que a hidrólise enzimática configura processo promissor para se adicionar vantagens à substratos ricos em proteína e de baixo valor agregado e, por isso, aspectos relativos a produção, caracterização e aplicabilidade de diferentes produtos vem recebendo grande atenção (Chalamaiah et al., 2012; Lasekan, et al., 2013; Roslan et al., 2014; Yarnpakdee et al., 2015; Tonon et al., 2016; Lin et al., 2017).

Hidrolisados proteicos obtidos a partir de subprodutos do abate de animais caracterizam-se como potencial aditivo alimentar, fornecendo adequado suplemento de nutrientes a depender do material processado, especificidade da enzima e condições de hidrólise (Liaset e Espe, 2008; Klompong et al., 2009; Foh et al., 2011; Chalamaiah et al., 2012). Além das propriedades nutricionais, podem exibir várias atividades biológicas que estão associadas a uma complexa mistura de peptídeos com ampla diversidade em sequência e composição de aminoácidos (Saadi et al., 2015; Nasri, 2017). Por consequência, o seu uso em rações animais se torna medida atrativa para otimização da produção, principalmente em relação à espécies mais exigentes e ainda dependentes de fontes proteicas insustentáveis.

Na aquicultura, a investigação sobre os efeitos da inclusão de hidrolisados proteicos em dietas é recente e tem se mostrado favorável, resultando em benefícios ao crescimento, imunidade e resistência a doenças, qualificando-os como efetivos substitutos à farinha de peixe (Silva et al., 2017; Lewandowski et al., 2013; Valle et al., 2015; Xu et al., 2016; Bui et al., 2014; Swanepoel e Goosen, 2018). Pequenos peptídeos são esperados estar envolvidos nas respostas positivas relacionadas à produção de peixes, determinando estímulo ao consumo de ração, aumento da atividade de enzimas digestivas, efeito prebiótico e protetivo do epitélio intestinal e modulador do metabolismo lipídico (Wosniak et al., 2016; Santos et al., 2013; Ha et al., 2019; Xu et al., 2016).

Mudanças no tamanho, nível e composição de aminoácidos e peptídeos são importantes características ao manifesto da bioatividade dos hidrolisados (Wu et al., 2003; Tsou et al., 2010). Níveis excessivos podem levar à redução do crescimento, enquanto que níveis baixos podem não ser suficientes para promover efeitos sobre o desempenho e fisiologia (Costa-Bomfim et al., 2017; Ha et al., 2019; Xu et al., 2016; Zheng et al., 2012). Isso torna o

estabelecimento de níveis apropriados de inclusão associados ao conhecimento do perfil de peptídeos de crucial importância à definição das propriedades nutricionais e bioativas de diferentes produtos.

O potencial uso de hidrolisados proteicos em dietas para tilápia-do-Nilo em fase de crescimento ainda tem sido pouco investigada, no entanto, a identificação de fontes proteicas alternativas pode ser vantajosa à sua criação, visto representar uma espécie de importância econômica que demanda constante e adequado suprimento de rações. A proteína hidrolisada de frango (PHF), obtida a partir de subprodutos do abate de aves, tem sido recentemente identificada como promissora em dietas para larvas de tilápia-do-Nilo em estudos preliminares conduzidos em nosso laboratório (dados não publicados). Além disso, identificamos também ser uma fonte proteica altamente digestível, com coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes superior a 90% para esta espécie. Efeitos sobre o desempenho e respostas metabólicas e/ou fisiológicas em fases subsequentes da criação ainda não foram investigados. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de níveis de inclusão da PHF em dietas para tilápia-do-Nilo, em fase de crescimento, sobre as respostas de desempenho, hematológicas e bioquímicas e histologia do fígado, músculo e intestino.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura- GEMAQ, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Campus de Toledo. Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo comitê de ética da instituição.

Dietas experimentais

Seis dietas isoproteicas e isoenergéticas (30% de proteína bruta (PB)/13 kJ de energia digestível (ED) g⁻¹) foram formuladas de modo a conter níveis de inclusão de 0; 1; 2; 3; 4 e 5% da proteína hidrolisada de frango (Tabela 1), tendo como base os dados apresentados no NRC (2011) e por Furuya et al. (2010). Para confecção das rações, os macro-ingredientes foram pesados, homogeneizados e moídos em partículas de diâmetro aproximado de 0,3 mm. Após moagem, foi acrescentado à mistura o hidrolisado, os micro-ingredientes, o suplemento mineral e vitamínico, seguida de homogeneização manual. Posteriormente, as rações foram umedecidas e submetidas ao processo de extrusão, em equipamento de rosca simples, obtendo-se péletes de diâmetro aproximado de 4 mm. As rações foram secas em estufa com ventilação de ar forçada a 55°C por 24 horas e mantidas sob refrigeração (4°C) até sua utilização. A proteína hidrolisada de frango (PHF) em pó foi fornecida pela BRF Ingredients Ltda e incluída nas rações em

substituição à farinha de peixe. A composição proximal e perfil de aminoácidos das rações e da PHF estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Delineamento experimental

Juvenis de tilápia-do-Nilo ($221,37 \pm 2,58$ g; $n = 240$), foram aleatoriamente distribuídos em 24 tanques de formato circular (420 L cada) dotados por sistema de recirculação contínuo, filtro mecânico e biológico, controle de temperatura e aeração. As dietas experimentais foram ofertadas aos animais até a saciedade aparente quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e quatro repetições.

As características físico-químicas da água, como pH ($6,29 \pm 0,03$), oxigênio dissolvido ($3,66 \pm 0,25$ mg L⁻¹), condutividade elétrica ($91,80 \pm 2,48$ μS cm⁻¹) e temperatura ($27,17 \pm 0,59$ °C) foram aferidas regularmente utilizando-se sonda YSI 556® e mantiveram-se dentro das condições de conforto para a espécie (Boyd, 1996).

Ao final de 30 dias experimentais, os animais foram mantidos em jejum por 24 h para esvaziamento do trato gastrointestinal e, posteriormente, os animais foram insensibilizados em benzocaína (100 mg L⁻¹) para realização das medidas individuais de peso e posterior cálculo dos parâmetros zootécnicos. Foram determinados o peso final (g); ganho em peso diário (peso final – peso inicial/dias de experimento; g dia⁻¹); consumo de ração (g peixe⁻¹); conversão alimentar (consumo de ração/ganho em peso); taxa de crescimento específico [(ln peso final – ln peso inicial)/dias de experimento*100] e sobrevivência [(n° peixes final – n° inicial)*100].

Após pesagem, quatro peixes por tanque foram eutanasiados (benzocaína; 200 mg L⁻¹) e dissecados para obtenção do peso da carcaça. Em seguida foi realizada a retirada e pesagem dos órgãos (intestino e fígado), gordura visceral, cabeça e filé para avaliação dos índices somáticos e de rendimentos. Uma porção das amostras de fígado, intestino e músculo foi devidamente preservada para análise histológica. Foram determinados os rendimentos de carcaça [peso da carcaça (g)*100/peso final (g)], cabeça [peso da cabeça (g)*100/peso final(g)] e filé [peso do filé (g)*100/peso final(g)], peso relativo do intestino [peso do intestino (g)*100/peso final(g)] e comprimento do intestino (m), índices hepatossomático [peso do fígado (g)*100/peso final(g)] e de gordura visceral [peso da gordura visceral (g)*100/peso final(g)].

Tabela 1. Formulação e composição analisada das dietas experimentais.

Dietas	0%	1%	2%	3%	4%	5%
<i>Ingredientes (g kg⁻¹)</i>						
Farelo de trigo	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0
Milho	272,9	270,2	267,6	265,0	262,3	259,7
Farelo de soja	171,7	171,1	182,4	187,7	193,0	198,3
Farinha de penas	100,0	96,0	92,0	88,0	84,0	80,0
Farinha de vísceras de aves	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Proteína hidrolisada de frango ¹	0,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0
Farinha de peixe	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0	0,0
Óleo de soja	23,1	22,5	21,9	21,3	20,6	20,0
L-lisina	6,2	6,0	5,8	5,5	5,3	5,1
L-treonina	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
DL-metionina	3,5	3,4	3,4	3,4	3,3	3,3
Fosfato bicálcico	6,1	7,2	8,3	9,3	10,4	11,5
Calcário	3,1	4,2	5,4	6,5	7,6	8,7
NaCl	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Premix mineral e vitamínico ²	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Ácido ascórbico ³	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cloreto de colina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antifúngico ⁴	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Antioxidante ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Análises químicas (g kg⁻¹ matéria seca)</i>						
Matéria seca	946,2	942,5	939,2	946,5	956,6	925,5
Proteína bruta	316,7	316,7	305,3	308,4	313,8	306,6
Extrato etéreo	43,3	43,3	44,3	47,3	46,6	46,3
Cinzas	74,8	75,0	75,7	76,6	74,8	79,1
Energia bruta (kJ g ⁻¹)	18,2	18,2	18,2	18,4	18,4	18,0

¹BRF Ingredients Ltda. Composição analisada (g kg⁻¹ matéria seca): 943,1 matéria seca; 763,4 proteína bruta; 22,5 kJ g⁻¹ energia bruta. Distribuição do peso molecular (% de peptídeos): 200 – 500 Da = 6,06%; 500 – 800 Da = 45,45%; 800 – 1100 Da = 27,27%; > 1000 Da: 21,21%.

²Suplemento mineral e vitamínico (níveis por kg de produto): vitamina A = 500,000 UI; vitamina D3 = 200,000 UI; vitamina E = 5,000 mg; vitamina K3 = 1,000 mg; vitamina B1 = 1,500 mg; vitamina B2 = 1,500 mg; vitamina B6 = 1,500 mg; vitamina B12 = 4,000 mg; ácido fólico = 500 mg; pantotenato de cálcio = 4,000 mg; vitamina C – 15,000 mg; biotina = 50 mg; inositol – 10,000; nicotinamida = 7,000; colina = 40,000 mg; cobalto = 10 mg; cobre = 500 mg; ferro = 5,000 mg; iodo = 50 mg; manganês = 1,500 mg; selênio = 10 mg; zinco = 5,000 mg.

³Vitamina C Rovimix® Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland.

⁴Propionato de cálcio. ⁵Banox®.

Tabela 2. Composição em aminoácidos (g 100 g⁻¹ matéria seca) da proteína hidrolisada de frango (PHF) e dietas experimentais.

AMINOÁCIDOS	PHF	0%	1%	2%	3%	4%	5%
<i>Aminoácidos essenciais</i>							
Arginina	1,9	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
Histidina	1,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Isoleucina	2,7	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4
Leucina	5,0	2,5	2,5	2,6	2,6	2,5	2,6
Lisina	4,9	1,7	1,8	1,9	1,8	1,8	2,0
Metionina	1,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Fenilalanina	2,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6
Treonina	2,2	1,7	1,7	1,7	1,4	1,6	1,6
Valina	3,1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8
<i>Aminoácidos não essenciais</i>							
Alanina	4,4	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8
Ácido aspártico	6,6	2,8	2,8	2,8	2,9	2,7	2,8
Cistina	1,0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8
Ácido glutâmico	9,2	5,0	4,9	5,0	5,0	4,9	4,9
Glicina	4,9	2,3	2,3	2,2	2,2	2,1	2,1
Prolina	3,6	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	2,2
Serina	2,4	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9
Taurina	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tirosina	2,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
∑ AAI	26,2	14,6	14,7	14,9	14,6	14,5	14,9
∑ AAD	34,8	17,9	17,9	17,9	18,0	17,3	17,6
AAI/AAD	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

Análises químicas e perfil de peptídeos da PHF

Foi realizada análise da composição centesimal do filé quanto os teores de matéria seca, matéria mineral, proteína e lipídios, bem como também das dietas incluindo-se a determinação da energia bruta. Para a proteína hidrolisada de frango foi quantificada a matéria seca, proteína e energia. As análises foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) do GEMAq/Unioeste segundo as metodologias descritas na AOAC (2000). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (C200, IKA, Staufen, Alemanha). A determinação do perfil de aminoácidos das rações e da proteína hidrolisada de frango foi realizada no laboratório de análises bromatológicas CBO (Valinhos, SP) de acordo com o preconizado por Hagen et al. (1989) e Bernardo e Sotelo (1980).

Análises histológicas

O material coletado (intestino, musculo e fígado) para análise histológica foi fixado em solução Alfac por 24 h e, posteriormente, conservado em álcool (70%). O processamento das amostras seguiu com a realização de desidratação em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, emblocação em parafina para então realizar os cortes histológicos em micrótomo (Micom, International GmbH 69190) com 5 μm de espessura. As amostras foram dispostas em lâminas de vidro e submetidas à técnica de coloração HE (hematoxilina e eosina). Cada amostra foi analisada em microscópio óptico (Olympus BX 50) com câmera digital (Olympus PMC 35 B) acoplada para captura de imagens. As amostras foram analisadas seguindo a metodologia de histomorfometria adaptada de Almeida et al. (2010). Para avaliação do crescimento das fibras musculares, foram tomadas as medidas de maior diâmetro de 200 dessas estruturas por animal e agrupadas em i) menor que 20 μm (<20 μm), ii) de 20 a 50 μm (20 a 50 μm) e iii) maior que 50 μm (>50 μm). A alteração do tecido hepático foi avaliada pelo número total de hepatócitos em uma área de 20.000 μm^2 . Para determinar as alterações no intestino, foram mensurados a altura e largura da vilosidade, espessura do epitélio e espessura da túnica.

Análises hematológicas e bioquímicas

Após ensaio de desempenho de crescimento, antes da pesagem final dos peixes, foram realizadas as coletas de amostras de sangue para realização do hemograma e quantificação dos parâmetros bioquímicos. Os peixes (quatro peixes por tanque) foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹) e após completa dessensibilização, por punção da veia caudal, foram coletadas de cada peixe alíquotas de sangue com o auxílio de seringas de 1 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%). Após coleta, os animais foram eutanasiados e destinados à obtenção de amostras para análise de rendimentos e coleta de órgãos.

Foram determinados o número de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e quantificados os teores plasmáticos de triglicérides, proteína total, glicose, ureia, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). A contagem do número de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se líquido de Hayem, em pipeta automática, na proporção de 1:200. Os parâmetros plasmáticos foram determinados utilizando-se kits específicos (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG) conforme as instruções do fabricante, sendo feito leitura em espectrofotômetro. O plasma foi

obtido por centrifugação do sangue a 5000 g por 10 minutos, o qual foi devidamente armazenado (-20°C) até realização das análises.

A diferenciação dos leucócitos foi realizada por meio de extensões em lâminas, as quais foram coradas com May-Grünwald Giemsa (duas lâminas/peixe). A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100 vezes. Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (linfócito, neutrófilo e monócito). A contagem total de leucócitos também foi realizada por meio de extensões coradas através da relação eritrócito/leucócito. Em cada extensão foram contadas 2.000 células marcando-se quantos leucócitos e trombócitos apareciam (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade e, quando evidenciado o atendimento dos pressupostos, procedeu-se a análise de variância (ANOVA). Em caso de diferenças estatísticas aplicou-se o teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. Diversos modelos de regressão foram aplicados aos dados para estimativa do nível ideal de inclusão do hidrolisado. As análises foram efetuadas por meio do programa computacional SAEG (1997).

RESULTADOS

Dietas contendo níveis de inclusão da PHF variando de 0 a 5% não determinaram efeitos ($P > 0,05$) sobre os parâmetros de desempenho produtivo, índices somáticos e rendimento de carcaça. No entanto, observou-se que dietas suplementadas com 1% da PHF influenciaram o rendimento de cabeça, sendo este significativamente inferior quando em comparação com a dieta isenta de suplementação. De modo semelhante, observou-se menor peso relativo do intestino para peixes que receberam a dieta contendo 1 e 4% da PHF comparado àqueles que receberam a dieta com 0% de inclusão. Para peixes alimentados com a dieta com 4% da PHF constatou-se maior ($P < 0,05$) rendimento de filé, porém diferindo apenas do tratamento sem inclusão do hidrolisado (Tabela 3).

O ganho em peso diário, consumo de ração, taxa de crescimento específico, sobrevivência, comprimento do intestino, índice hepatossomático, rendimento de carcaça e de gordura visceral variaram de 2,65 a 3,35 g dia⁻¹; 128,49 a 141,33 g peixe⁻¹; 1,02 a 1,25% dia⁻¹; 80,00 a 97,50%; 1,48 a 1,55 m; 1,92 a 2,06%; 89,11 a 89,86% e 2,15 a 2,83%, respectivamente. A aplicação dos modelos de regressão aos dados não revelaram ajuste apropriado ($R^2 < 0,70$).

A composição centesimal do filé não foi alterada comparativamente à dieta contendo 0% da PHF, contudo, o teor lipídico foi influenciado pelos níveis de suplementação avaliados, sendo evidenciada diferenças entre peixes que receberam as dietas com 3 e 5% de inclusão, o qual para este último verificou-se menor deposição ($P < 0,05$) de lipídeos no filé (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros de desempenho produtivo e de rendimentos da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo proteína hidrolisada de frango por 30 dias.

Variáveis*	Dietas					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
PF (g)	321,20 ±7,98	313,54 ±26,15	300,60 ±10,53	322,07 ±13,28	307,15 ±13,67	310,77 ±14,07
GPD (g peixe ⁻¹)	3,35 ±0,31	3,07 ±0,93	2,65 ±0,42	3,34 ±0,36	2,89 ±0,44	2,98 ±0,43
EA	0,78 ±0,04	0,67 ±0,16	0,62 ±0,14	0,73 ±0,05	0,64 ±0,09	0,65 ±0,16
RCAB (%)	29,77 ^a ±1,88	27,96 ^b ±1,06	29,10 ^{ab} ±1,52	28,59 ^{ab} ±1,43	29,16 ^{ab} ±1,75	29,5 ^{ab} ±2,26
RF (%)	32,01 ^b ±2,13	33,59 ^{ab} ±1,58	33,05 ^{ab} ±2,19	33,97 ^{ab} ±1,17	34,17 ^a ±2,37	32,21 ^{ab} ±2,31
INT (%)	4,07 ^a ±1,10	2,94 ^b ±0,68	3,52 ^{ab} ±0,89	3,29 ^{ab} ±0,58	3,08 ^b ±0,65	3,25 ^{ab} ±0,84

*Médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. PF = peso final; GPD = ganho em peso diário; EA = eficiência alimentar; RCAB = rendimento de cabeça; RF = rendimento de filé; INT = peso relativo do intestino.

Tabela 4. Composição centesimal do filé (matéria natural) da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo proteína hidrolisada de frango por 30 dias.

Variáveis*	Dietas					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Umidade (%)	79,22 ±0,51	78,68 ±0,62	79,00 ±0,40	78,42 ±0,83	78,89 ±0,57	79,08 ±0,98
Proteína (%)	18,52 ±0,46	19,00 ±0,50	18,32 ±0,35	18,97 ±0,62	19,00 ±0,44	18,98 ±0,51
Lipídeos (%)	1,50 ^{ab} ±0,27	1,54 ^{ab} ±0,34	1,60 ^{ab} ±0,20	1,72 ^b ±0,55	1,28 ^{ab} ±0,28	0,92 ^a ±0,18
Matéria mineral (%)	1,32 ±0,06	1,31 ±0,07	1,33 ±0,09	1,33 ±0,03	1,28 ±0,03	1,28 ±0,11

*Médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Para os parâmetros bioquímicos do plasma observou-se reduções significativas nas concentrações de triglicerídeos quando os peixes foram alimentados com dietas contendo PHF ao nível de 2% e acima deste, quando comparado a dieta não suplementada. Para as concentrações plasmáticas de HDL, constatou-se aumentos significativos e concomitante redução nos níveis de VLDL para os peixes que receberam as dietas com os maiores níveis de suplementação (4 e 5%) comparativamente à dieta com 0% da PHF (Tabela 5). A proteína total, glicose e ureia não foram influenciadas pelas diferentes dietas e oscilaram entre 3,00 a 3,76; 45,24 a 68,43 e 5,94 a 7,28 mg dL⁻¹, respectivamente. A contagem total e diferencial de leucócitos também não foram influenciadas pelas dietas. O número total de leucócitos e trombócitos variaram entre 33927 a 42992 células μL^{-1} e 3727 a 6104 células μL^{-1} , respectivamente. O percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos apresentaram valores médios de 91,17 a 95,11%; 4,32 a 7,40% e 0,53 a 1,64% entre tratamentos, respectivamente. As variáveis hematológicas mantiveram-se dentro do padrão estabelecido para tilápia (Hubrec e Smith, 2010).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos do plasma da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo proteína hidrolisada de frango por 30 dias.

Variáveis*	Dietas					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Glicose (mg dL ⁻¹)	60,54 ±21,77	45,24 ±24,20	45,82 ±28,45	58,19 ±24,22	65,57 ±24,87	68,43 ±35,98
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	117,96 ^a ±25,62	93,77 ^{ab} ±23,05	64,24 ^b ±15,13	67,73 ^b ±24,79	68,20 ^b ±20,10	69,59 ^b ±17,30
Colesterol (mg dL ⁻¹)	82,17 ±16,37	68,24 ±19,30	73,55 ±25,68	79,50 ±20,48	76,45 ±22,12	63,81 ±17,50
HDL (mg dL ⁻¹)	127,24 ^b ±15,79	143,35 ^{ab} ±7,44	140,50 ^{ab} ±29,60	167,35 ^a b ±27,47	175,58 ^a ±6,51	184,78 ^a ±18,01
LDL (mg dL ⁻¹)	3,65 ±0,76	3,10 ±1,93	4,57 ±1,68	4,10 ±2,62	3,76 ±2,70	1,62 ±1,11
VLDL (mg dL ⁻¹)	22,36 ^b ±4,99	18,75 ^{ab} ±4,61	12,85 ^a ±3,03	15,09 ^{ab} ±6,34	13,64 ^a ±4,02	12,52 ^a ±3,46

*Médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; VLDL = lipoproteína de muita baixa densidade.

A análise histológica do intestino revelou efeitos para a espessura do epitélio, sendo constatado diferenças para as dietas com 1 e 4% de inclusão da proteína hidrolisada de frango. Para a dieta com 4% de suplementação a espessura do epitélio foi significativamente superior ao observado para os peixes alimentados com a dieta com 1% (Tabela 6). A distribuição das fibras musculares e número de hepatócitos não foram afetados pelas dietas fornecidas. Observou-se a ocorrência de fibras entre 20 – 50 μm variando de 63,42 a 75,82% e > 50 μm variando de 24,91 a 34,33%. Para o número de hepatócitos contabilizou-se valores entre 112 a 133 em uma área de 20000 μm^2 .

Tabela 6. Parâmetros da análise histológica do intestino da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo proteína hidrolisada de frango por 30 dias.

Variáveis*	Dietas					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Espessura da túnica (μm)	39,40 $\pm 9,55$	45,08 $\pm 11,19$	47,45 $\pm 9,94$	45,37 $\pm 7,82$	46,24 $\pm 5,56$	37,87 $\pm 7,15$
Espessura do epitélio (μm)	41,07 ^{ab} $\pm 5,06$	38,49 ^b $\pm 2,05$	42,04 ^{ab} $\pm 3,49$	43,10 ^{ab} $\pm 3,82$	45,65 ^a $\pm 3,66$	44,33 ^{ab} $\pm 5,07$
Altura da vilosidade (μm)	233,53 $\pm 48,50$	267,02 $\pm 30,61$	242,62 $\pm 49,68$	240,17 $\pm 25,35$	229,89 $\pm 29,13$	246,91 $\pm 35,28$
Largura da vilosidade (μm)	101,16 $\pm 12,56$	101,48 $\pm 11,36$	100,48 $\pm 5,15$	110,76 $\pm 17,13$	110,14 $\pm 11,10$	95,60 $\pm 16,84$

*Médias na mesma linha seguidas por letras distintas diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

No presente estudo verificou-se que a inclusão da PHF em dietas não promoveu efeitos significativos sobre os parâmetros de crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo, ao que se deve provavelmente as características do produto, que são reconhecidas por influenciar diretamente suas propriedades funcionais e usos como ingrediente alimentar (Kristinsson e Rasco, 2000). Há notável diferença em relação ao tipo e condições de obtenção de hidrolisados identificados como promotores de crescimento em dietas para peixes (Wosniak et al., 2016; Swanepoel & Goosen, 2018; Xu et al., 2016), no entanto, evidências científicas tem demonstrado que a prevalência de peptídeos de baixo peso molecular pode ser essencial ao desempenho biológico (Zheng et al., 2013; Ha et al., 2019; Zheng et al., 2012). Na PHF encontramos maior ocorrência de peptídeos entre 500 – 800 Da (Tabela 1), contrariamente ao que foi observado nos estudos mencionados, os quais constataram nos hidrolisados de coprodutos peptídeos de até 100.000 Da. Isso pode sugerir que a fração peptídica da PHF inclui compostos bioativos que possivelmente não atuam como promotores do crescimento. Estudos avaliando a PHF em dietas para a tilápia na fase de crescimento são pioneiros e investigações futuras sobre a relação entre estes parâmetros são necessárias para confrontar as suposições.

A estratégia de fornecimento do suplemento proteico na forma hidrolisada, representada pela presença de peptídeos de baixo peso molecular, pode ser considerada medida apropriada ao atendimento das exigências fisiológicas dos animais, uma vez que di e tripeptídeos e outros oligopeptídeos podem ser mais facilmente absorvidos e completamente assimilados (Arredondo-Figueroa et al., 2013; Sundell e Rønnestad, 2011). Tal condição, poderia beneficiar funções importantes e repercutir em outros aspectos de desempenho (Gisbert et al., 2018) que,

no presente estudo, provavelmente foi demonstrado como alterações no rendimento de filé. No entanto, apesar da ausência de efeitos significativos entre dietas contendo a PHF, os resultados demonstraram que níveis de inclusão de 4% podem ser necessários para se obter respostas positivas sobre o rendimento em comparação a uma dieta não suplementada. Isso sugere maior biodisponibilidade da proteína da PHF para este nível, resultante, provavelmente, de adequado sincronismo entre as taxas máximas de absorção pelos transportadores de aminoácidos e peptídeos, o que contrariamente, não se pode verificar em níveis elevados de inclusão (Tonheim et al., 2005; Aragão et al., 2004).

Variações na quantidade e qualidade dos nutrientes da dieta frequentemente refletem em adaptações morfológicas do intestino e modificam o perfil e atividade de enzimas digestivas (Lundstedt et al., 2004; Olsson, 2011). A suposta maior biodisponibilidade da PHF ao nível de inclusão de 4% pode estar relacionada também a um provável efeito prebiótico dos peptídeos, capaz de modular a microbiota intestinal e favorecer o processo de digestão por meio do incremento de enzimas proteolíticas, como observado em estudo recente com uma espécie onívora (*Rhamdia quelen*) alimentada com hidrolisado de sardinha (5%) (Ha et al., 2019). Além disso, tem sido demonstrado haver uma correlação positiva entre população microbiana e atividade de membrana da borda em escova e proliferação de células caliciformes (Bates et al., 2006; Merrifield et al., 2010; Reda e Selim, 2015), o que poderia ter favorecido uma melhor captação de nutrientes. Distintos perfis na atividade de proteases também foram verificados em um estudo com a tilápia alimentada com hidrolisado proteico de resíduos do camarão (1,5 e 6%) (Santos et al., 2013). Por consequência, as variações observadas no peso relativo do intestino e espessura do epitélio podem estar relacionadas às eventuais adaptações ocorridas. Estudos futuros avaliando os efeitos da PHF sobre a atividade de enzimas digestivas, morfometria e microbiologia intestinal devem ser encorajados para melhor compreensão de seus efeitos sobre a fisiologia digestiva da tilápia.

Em níveis mais baixos de inclusão (1%) observou-se menores rendimentos de cabeça em relação a dieta não suplementada que poderiam também ter alguma relação com a suposição exposta acima, porém em menor extensão. Embora esta característica possa ser desejável ao percentual quantitativo dos diversos cortes utilizados durante processamento industrial (Souza e Inhamuns, 2011), esta não esteve correlacionada a um rendimento de filé potencial, o que poderia não ser interessante lucrativamente.

Além dos parâmetros de rendimento, neste estudo observou-se também efeitos da PHF sobre a homeostase energética, representada por alterações nas concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol e gordura no filé, o que poderia indicar potencial uso nutracêutico.

Hidrolisados proteicos podem determinar alterações no metabolismo de ácidos biliares e, conseqüentemente, sobre a acumulação de gordura e ganho em peso corporal (Liaset et al., 2009). Para este estudo, a PHF pode ter favorecido a transcrição de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos por ação do incremento plasmático de ácidos biliares, contribuindo para redução dos triglicerídeos, modificações no colesterol (HDL e VLDL) e menor acúmulo de gordura no filé. Efeitos da administração de ácidos biliares sobre a transcrição de genes e obesidade foram descritos em ratos (Watanabe et al., 2006). Por consequência, apesar dos níveis séricos de ácidos biliares não terem sido mensurados neste estudo, e efeito modulador do metabolismo lipídico para os níveis mais altos de inclusão pode ter contribuído para as respostas de rendimento de filé e peso final, notavelmente para o nível de 4%, indicando um provável efeito poupador da proteína devido a modulação metabólica, porém sem determinar diferenças no crescimento.

Mecanismos de supressão *in vitro* da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), enzima envolvida na diferenciação de adipócitos, pela fração peptídica (1300-2200 Da) da proteína hidrolisada de soja também foram descritos, demonstrando efeito anti-adipogênico, o que gera a inibição do acúmulo de lipídeos por pré-adipócitos (Tsou et al., 2010). Essa característica poderia ter sido evidenciada para a PHF devido a presença de peptídeos >1000 Da (21,21%) e atuado conjuntamente com o mecanismo de ação sugerido, determinando impactos sobre a gordura do filé. Estudos avaliando os efeitos do suplemento proteico hidrolisado na transcrição de genes e atividade de enzimas do metabolismo energético são necessários para clarificar as funções regulatórias de peptídeos bioativos de baixo peso molecular.

As respostas obtidas para este estudo representam importante resultado, indicando a PHF como interessante fonte proteica alternativa com capacidade de fornecer adequado suplemento de aminoácidos (Tabela 1) comparável à farinha de peixe (Furuya et al., 2010; NRC, 2011). Os componentes de baixo peso molecular presentes na PHF podem não exercer efeitos sobre o crescimento, no entanto, possivelmente promovem alterações fisiológicas e metabólicas suficientes para impactar índices produtivos de interesse ao planejamento e desenvolvimento do setor industrial. Isso torna atrativo o desenvolvimento de estudos futuros que avaliem os efeitos da PHF para tilápia na fase de terminação.

CONCLUSÕES

A inclusão de 4% de PHF resultou em aumento no rendimento de filé, modificação morfométrica do intestino e alterações no metabolismo energético.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos adicionais, avaliando os efeitos da PHF sobre aspectos fisiológicos são necessários para que sejam estabelecidos níveis ideais de inclusão.

AGRADECIMENTOS

À BRF Ingredients por disponibilizar o ingrediente para estudo e pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Aksnes, A.; Hope, B.; Høstmark, Ø.; Albrektsen, S. 2006. Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 261: 1102-1110.
- Almeida, F.L.A.; Carvalho, R.F.; Pinhal, D.; Padovani, C.R.; Martins, C.; Dal Pai-Silva, M. 2010. Differential Expression of Myogenic Regulatory Factor MyoD in Pacu Skeletal Muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during Juvenile and Adult Growth Phases. *Micron*, 39: 1306-1311 110.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.
- Aragão, C.; Conceição, L.E.C.; Fyhn, H.J.; Dinis, M.T. 2004. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 242: 589–605.
- Arredondo-Figueroa, J.L.; Ponce-Palafox, J.T.; Shirai-Matsumoto, K., Pérez-Zavaleta, Á.; Barriga-Sosa, I.D.L.Á.; Luna, A.R. 2013. Effects of including shrimp protein hydrolysate in practical diets on the growth and survival of redclaw crayfish hatchlings *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Aquaculture Research*, 44: 966–973.
- Bates J.M.; Mittege, E; Kuhlman, J; Baden, K.N.; Cheesman, S.E. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebra fish gut differentiation. *Developmental Biology* 297:374–386.
- Bernardo, L.; Sotelo, A. 1980. Effect of alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of puré proteins and food. *Analytical Biochemistry*, 109: 192-197.

- Boyd, C.E. 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Bui, H.T.D.; Khosravi, S.; Fournier, V.; Herault, M.; Lee, KYEONG-JUN. 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418-419: 11-16.
- Chalamaiah, M.; Kumar, D.; Hemalatha, R.; Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.
- Clare, D. A.; Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83: 1187–1195.
- Costa-Bomfim, C.N.; Silva, V.A.; De Bezerra, R.S.; Druzian, J.I.; Cavalli, R.O. 2017. Growth, feed efficiency and body composition of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) fed increasing dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquaculture Research*, 48: 1759-1766.
- Foh, M.B.K.; Kamara, M.T.; Amadou, I.; Foh, B.M.; Wenshui, X. 2011. Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, 5: 21-36.
- Furuya, W.M.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M.; Boscolo, W.R.; Cyrino, J.E.P.; Furuya, V.R.B.; Feiden, A. 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.
- Gisbert, E.; Fournier, V.; Solovyev, M.; Skalli, A.; Andree, K.B. 2018. Diets containing shrimp protein hydrolysates provided protection to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected by a *Vibrio Pelagius* natural infection outbreak. *Aquaculture*, 495: 136-143.
- Ha, N.; Jesus, G.F.A.; Gonçalves, A.F.N.; Oliveira, N.S.; Sugai, J.K.; Pessatti, M.L.; Mouriño, J.L.P.; Fabregat, T.E.H.P. 2019. Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. *Aquaculture*, 500: 99-106.
- Hagen, Sr.; Frost, B.; Augustin, J. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acid in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72: 912-916.
- Hrubec, T.C.; Smith, S. 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. (Ed). *Schalm's veterinary hematology*. USA: Wiley-Blackwell, p. 994-1003.

- Khosravi, S.; Bui, H.T.D.; Rahimnejad, S.; Herault, M.; Fournier, V.; Kim, Sung-Sam.; Jeong, Joon-Bum, Lee, Kyeong-Jun. 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 435: 371-376.
- Klompong, V.; Benjakul, S.; Kantachote, D.; Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102: 1317-1327.
- Klompong, V.; Benjakul, S.; Yachai, M.; Visessanguan, W.; Shahidi, F.; Hayes, K.D. 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal Food Science*, 74: 126-133.
- Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43–81.
- Lasekan, A.; Bakar, F.A.; Hashim, D. 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management*, 33: 552-564.
- Lewandowski, V.; Decarli, J.A.; Pedron, F.A.; Feiden, A.; Signor, A.; Boscolo, W.R. 2013. Hidrolisados cárneos na alimentação do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*). *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, 20: 222-226.
- Liaset, B.; Espe, M. 2008. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochemistry*, 43: 42-48.
- Liaset, B.; Madsen, L.; Hao, Q.; Criales, G.; Mellgren, G.; Marschall, Hanns-Ulrich; Hallenborg, P.; Espe, M.; Frøyland, L.; Kristiasen, K. 2009. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791: 254-262.
- Lin, Hsin-Chieh; Alashi, A.M.; Aluko, R.E.; Pan, B.S.; Chang, Yu-Wei. 2017. Antihypertensive properties of tilapia (*Oreochromis spp.*) frame and skin enzymatic protein hydrolysates. *Food & Nutrition Research*, 61: 1-11.
- Liu, Y.; Li, X.; Chen, Z.; Yu, J.; Wang, F.; Wang, J. 2014. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, 151: 459-465.
- Lundstedt L.M.; Melo, J.F.B.; Moraes, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition.

Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 137:331–339.

Matínez-Alvarez, O.; Chamorro, S.; Brenes, A. 2015. Protein hydrolysates from animal by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: a review. Food Research International, 73: 204-212.

Meisel, H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. Biofactors, 21: 55–61.

Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Baker, T.M.; Davies, S.J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. Aquaculture Nutrition, 16: 496-503.

Nasri, M. 2017. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health. Advanced in Food and Nutrition Research, 81: 109-159.

NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp Washington: DC. National Academies Press. 376p.

Olsson, C. 2011. The gut – gut anatomy and morphology. In: Farrell, A.P.; Jr, J.J.C.; Richards, J.G.; Stevens, E.D. (Ed). Vol 2. Encyclopedia of fish physiology from genome to environment. Academic Press, London. p. 1268-1275.

Ranzini-Paiva, M.J.T.; Pádua, S.B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M.I. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 140p.

Reda, R.M.; Selim, K.M. 2015. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture International, 23: 203-217.

Roslan, J.; Yunos, K.F.M.D.; Abdullah, N.; Mazlina, S.; Kamal, M. 2014. Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2: 312-319.

Saadi, S.; Saari, N.; Anwar, F.; Hamid, A. A.; Mohd Ghazali, H. 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. Biotechnology Advances, 33: 80–116.

SAEG, 1997. Sistema de Análise Estatística e Genética. Universidade Federal de Viçosa.

Santos, J.F.; Castro, P.F.; Leal, A.L.G.; Freitas Júnior, A.C.V.; Lemos, D.; Carvalho Jr, L.B.; Bezerra, R.S. 2013. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*,

L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquaculture International*, 21: 563-577.

Silva, T.C.; Rocha, J.D.M.; Moreira, P.; Signor, A.; Boscolo, W.R. 2017. Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52: 485-492.

Souza, A.F.L.; Inhamuns, A.J. 2011. Análise de rendimento cárneo das principais espécies de peixes comercializadas no Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 41: 289-296.

Sundell, K.S.; Rønnestad, I. 2011. Intestinal absorption. In: Farrell, A.P.; Jr, J.J.C.; Richards, J.G.; Stevens, E.D. (Ed). Vol 2. *Encyclopedia of fish physiology from genome to environment*. Academic Press, London. p. 1311-1321.

Swanepoel, J.C.; Goosen, N.J. 2018. Evaluation of fish protein hydrolysates in juveniles African catfish (*Clarias gariepinus*) diets. *Aquaculture*, 496: 262-269.

Tonheim, S.K.; Espe, M.; Hamre, K.; Ronnestad, I. 2005. Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321: 19–34.

Tonon, R.V.; Santos, B.A.; Couto, C.C.; Mellinger-Silva, C.; Brígida, A.I.S.; Cabral, L.M.C. 2016. Coupling of ultrafiltration and enzymatic hydrolysis aiming at valorizing shrimp wastewater. *Food Chemistry*, 198: 20-27.

Tsou, May-June; Lin, Wan-Teng; Lu, His-Chi; Tsui, Yung-Ling; Chiang, Wen-Dee. 2010. The effect of limited hydrolysis with Neutrased and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein. *Process Biochemistry*, 45: 217-222.

Valle, B.C.S.; Dantas Jr, E.M.; Silva, J.F.X.; Bezerra, R.S.; Correia, E.S.; Peixoto, S.R.M.; Soares, R.B. 2015. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 21: 105-112.

Watanabe, M.; Houten, S.M.; Matak, C.; Christoffolete, M.A.; Kim, B.W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J.W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A.C.; Auwerx, J. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439: 484–489.

Wergedahl, H.; Liaset, B.; Gudbrandsen, O.A.; Lied, E.; Espe, Z.M.; Mørk, S.; Berge, R.K. 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *Journal of Nutrition*, 134: 1320–1327.

- Wosniak, B.; Melim, E.W.H.; Ha, N.; Uczay, J.; Pilatti, C.; Pessatti, M.L.; Fabregat, T.E.H.P. 2016. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). Latin American Journal of Aquatic Research, 44: 957-966.
- Wu, H.C.; Chen, H.M.; Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949–957.
- Xu, H.; Mu, Y.; Zhang, Y.; Li, J.; Liang, M.; Zheng, K.; Wei, Y. 2016. Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. Aquaculture, 454: 140-147.
- Yarnpakdee, S.; Benjakul, S.; Kristinsson, H.G.; Kisshimura, H. 2015. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-and-two-step hydrolysis. Journal Food Science Technology, 52: 3336-3349.
- Zheng, K.; Liang, M.; Yao, H.; Wang, J.; Chang, Q. 2012. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture Nutrition, 18: 297-303.
- Zheng, K.; Xu, T.; Qian, C.; Liang, M.; Wang, X. 2013. Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. Aquaculture Nutrition, 20: 372-380.