

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

HERIVELTO BECK DE SOUZA

DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PESCADO EM DIETAS
PARA PÓS-LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

Toledo
2020

HERIVELTO BECK DE SOUZA

**DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PESCADO EM DIETAS
PARA PÓS-LARVAS 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: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Altevir Signor

Toledo

2020

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

Souza, Herivelto Beck Diferentes condições de hidrólise de resíduos de pescado em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo / Herivelto Beck Souza; orientador(a), Altevir Signor, 2020.
33 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, 2020.

1. Nutrição animal. 2. Ingrediente alternativo. 3. Hidrolisados Proteicos. 4. Tilápia do Nilo. I. Signor, Altevir. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

HERIVELTO BECK DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de 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, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Altevir Signor

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Fábio Bittencourt

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester

Universidade Federal do Paraná

Aprovado em: 22 de abril de 2020.

Local de defesa: Online

Dedico a minha mãe, Renilda Beck de Souza, que não mediu esforços para me ajudar, me ensinou desde sempre que o esforço vale a pena e que sempre devemos correr atrás dos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Institucionais

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Toledo e a Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* de Laranjeiras do Sul, pela estrutura laboratorial fornecida.

Especiais

Agradeço aos envolvidos na idealização e realização do presente estudo: ao professor Altevir Signor, pela concepção da ideia e toda orientação durante o período da pós-graduação; as amigas Débora Tatyane Oliveira Xavier e Janaina Fernanda Rosseto pelo caminho compartilhado durante a execução das experimentações.

Além disso, um agradecimento aos membros do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAQ) que auxiliaram da melhor maneira possível durante a realização dos experimentos, seja em relação a outros experimentos (Jean e Adriano) ou para o presente estudo (Juliana) e equipes de trabalho. A professora Luisa Helena Cazarolli e alunos de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Jéssica, Milena e Luís pela disponibilidade laboratorial e auxílio na execução de parte do experimento, juntamente com todo o esforço direcionado durante as análises. Sem vocês, tudo seria mais difícil, obrigado!

DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DE RESÍDUOS DE PESCADO EM DIETAS PARA PÓS-LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

RESUMO

Neste estudo foi avaliado a influência de hidrolisados proteicos de resíduo de pescado (HPF) com três condições de grau de hidrólise (GH) no desempenho produtivo, composição corporal e respostas histológicas e bioquímicas em pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Um total de 3150 pós larvas de tilápia do Nilo ($0,02 \pm 0,01$ g) foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em 21 aquários com volume útil de 120L, totalizando sete tratamentos com três repetições. Os peixes foram alimentados até saciedade aparente seis vezes ao dia durante quatro semanas, com dietas sem a inclusão de HPF (controle), três dietas contendo níveis de inclusão de 4,75% para cada HPF (HPF1, HPF2, HPF3) e GH de 16,28%, 22,43% e 28,56%, respectivamente, e outras três com metade da inclusão de cada um dos HPF. A inclusão de 2,375% do HPF3 melhorou o desempenho produtivo e o nível de proteína corporal em pós-larvas de tilápia do Nilo, além de influenciar positivamente na histomorfometria intestinal e na capacidade de absorção de nutrientes pelos peixes. As análises bioquímicas de enzimas digestivas no intestino e fígado revelaram que a suplementação de HPF com diferentes graus de hidrólise incrementam positivamente a capacidade de absorção de nutrientes e adaptação bioquímica em enzimas oxidativas do fígado pela tilápia do Nilo.

Palavras-chave: ingrediente alternativo; carcaça de tilápia; efeito antioxidante.

DIFFERENT CONDITIONS FOR HYDROLYSIS OF FISH RESIDUES IN DIETS OF POST-LARVAE OF NILE TILAPIA

ABSTRACT

In this study was evaluated the influence of waste fish protein hydrolysates (HPF) with three conditions of degree hydrolysis in the diet under productive performance, body composition and histological and biochemical responses in post-larvae of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). A total of 3150 post-larvae Nile tilapia (0.02 ± 0.01 g) were distributed in a completely randomized design in 21 aquariums with a useful volume of 120L, totaling seven treatments with three replications. The fish were fed until apparent satiety six times a day for four weeks, with diets without the inclusion of HPF (control), three diets containing inclusion levels of 4.75% for each HPF (HPF1, HPF2, HPF3) and GH of 16.28%, 22.43% and 28, 56%, respectively, and other three with half the inclusion of each of the HPF. The inclusion of 2.375% of HPF3 improved the productive performance and the level of body protein in Nile tilapia post-larvae, in addition to positively influencing the intestinal histomorphometry and the nutrient absorption capacity by fish. Biochemical analyzes of digestive enzymes in the intestine and liver revealed that supplementation of HPF with different degrees of hydrolysis positively increases the capacity for nutrient absorption and biochemical adaptation in oxidative enzymes of the liver by Nile tilapia.

Key words: alternative ingredient; tilapia carcass; antioxidative effect.

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas da publicação científica do Boletim do
Instituto de Pesca. Disponível em:
<[https://www.pesca.sp.gov.br/publicacoes/proceed
ings-simcope/normas-para-publicacao](https://www.pesca.sp.gov.br/publicacoes/proceedings-simcope/normas-para-publicacao)>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.	RESULTADOS	19
4.	DISCUSSÃO	25
5.	CONCLUSÃO	28
6.	REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mensurações da histomorfometria intestinal de pós-larvas de tilápia do Nilo para os diferentes níveis de inclusão de hidrolisado proteico. (A) Altura da vilosidade; (B) Largura das vilosidades; (C) Espessura das vilosidades; e (D) Espessura da túnica..... 17
- Figura 2.** Parede do intestino medial de pós-larvas de tilápia do Nilo para os diferentes níveis de inclusão de hidrolisado proteico de pescado com diferentes graus de hidrólise nas dietas. Coradas em H.E. Fotografias realizadas na lente objetiva de 40x..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação das dietas utilizadas no experimento de desempenho produtivo de pós-larvas de tilápia do Nilo contendo hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de hidrólise.....	14
Tabela 2. Valores de desempenho produtivo médios de pós-larvas de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo hidrolisados proteicos de pescado (HPF's) com diferentes graus de hidrólise	19
Tabela 3. Valores referentes a composição centesimal corporal de peixes alimentados com dietas suplementadas com hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de hidrólise. Valores expressos com base na matéria seca.....	20
Tabela 4. Histomorfometria intestinal de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de hidrólise	22
Tabela 5. Atividade enzimática de enzimas digestivas no intestino e fígado das pós-larvas de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de hidrólise.....	23

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1. INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desperta grande interesse para a piscicultura principalmente pelo seu hábito alimentar variado, grande potencial de mercado, fácil manejo, resistência a oscilações térmicas, podendo ser cultivada em altas densidades de estocagens e baixas taxas de oxigênio (DUARTE, 2017).

Neste contexto, um dos fatores que apresenta uma despesa significativa na piscicultura é a ração (MILANEZ et al., 2019). Por consequência disso, fontes alternativas oriundas de processos industriais que favoreçam o custo benefício da ração são utilizadas como forma de atender as exigências nutricionais dos peixes (DECARLI et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Atualmente os hidrolisados proteicos representam um alimento alternativo nas dietas dos peixes, por ser uma excelente fonte nutricional e de alta digestibilidade (DECARLI et al., 2016; SILVA et al., 2017). Hidrolisados proteicos podem ser obtidos por meio da digestão prévia das proteínas presentes na matéria-prima pelo processo de hidrólise enzimática, ou seja, realiza-se a adição de proteases em suas condições ótimas de temperatura e pH ocorrendo a fragmentação das proteínas em aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular, possibilitando uma maior absorção dessas partículas pelos peixes (ZARAVEZE et al., 2009). Diferentes enzimas têm sido relatadas como eficientes para hidrolisar proteínas de pescado, quando utilizada, a alcalase, endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*, consegue uma hidrólise efetiva em proteínas oriundas de pescado e elevado grau de hidrólise sem afetar o sabor do ingrediente (SILVA et al., 2014; MARTINS et al., 2009).

O grau de hidrólise (GH) é a medida utilizada para mensurar a fragmentação da proteína em peptídeos de tamanhos menores que expressa a relação entre a quantidade de proteínas totais e a quantidade de proteínas solúveis, determinadas a partir de métodos de Kjeldahl e Lowry que demonstram a eficiência do processo hidrolítico (ALVES et al., 2015), ou seja, é considerado o parâmetro bioquímico mais relevante da proteólise, visto que é capaz de alterar as propriedades nutricionais da matéria-prima além de características sensoriais e funcionais dos alimentos (NGUYEN et al., 2011).

Diante do exposto, objetivou-se desenvolver e avaliar a influência da inclusão de hidrolisados proteicos de resíduos de pescado com diferentes condições de hidrólise no desempenho produtivo e seus efeitos na composição corporal, morfologia intestinal e na atividade enzimática para pós-larvas de tilápia do Nilo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMaQ) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Toledo/PR, Brasil com duração de 30 dias. Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Protocolo N° 16/19).

Elaboração das rações experimentais

Os hidrolisados proteicos de peixe aplicados no presente estudo possuíram os seguintes graus de hidrólise: 16,28% (HPF1), 22,43% (HPF2) e 28,56% (HPF3). Foram elaboradas sete rações experimentais, sendo a dieta basal, T₁: controle (sem a adição do HPF) controle e os níveis de inclusão dos hidrolisados proteicos de pescado obtidos após a hidrólise enzimática: T₂: 4,75% do HPF1, T₃: 4,75% do HPF2, T₄: 4,75% do HPF3, T₅: 2,37% do HPF1 (MH1), T₆: 2,37% do MH2 (MH2) e T₇: 2,37% do HPF3 (MH3). As rações foram formuladas de maneira a serem isoproteicas (38,6 % proteína bruta) e isoenergéticas (3500 kcal de energia digestível/kg) para atenderem os valores nutricionais recomendados para a espécie, na fase de desenvolvimento em que se encontravam. O cálculo da quantidade de inclusão do hidrolisado líquido nas dietas foi baseada na matéria seca do produto, considerando-se os resultados obtidos por SILVA *et al.* (2014) (Tabela 1).

68 **Tabela 1.** Formulação das dietas utilizadas no experimento de desempenho produtivo
 69 de pós-larvas de tilápia do Nilo contendo hidrolisados proteicos de pescado com diferentes
 70 graus de hidrólise.

Ingredientes (%)	Níveis de suplementação do hidrolisado proteico com diferentes Graus de hidrólise ¹						
	Controle	HPF1	HPF2	HPF3	MH1	MH2	MH3
Farelo de soja 45	49,22	54,58	54,58	54,58	51,61	51,61	51,61
Peixe Farinha tilápia	23,78	20,01	20,01	20,01	21,89	21,89	21,89
Arroz quirera	13,43	8,20	8,20	8,20	10,82	10,82	10,82
Milho Far. Glúten	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16	8,16
Ingrediente Teste	0,00	4,75	4,75	4,75	2,38	2,38	2,38
Óleo de soja	3,39	1,46	1,46	1,46	2,42	2,42	2,42
Suplemento min. e vit. ²	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vit. C	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Antifúngico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
L-treonina	0,04	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02
Fosfato bicálcico	0,01	0,36	0,36	0,36	0,19	0,19	0,19
Calcário	0,00	0,50	0,50	0,50	0,25	0,25	0,25
Nutrientes (%) ³							
Amido	17,38	14,15	14,15	14,15	15,77	15,77	15,77
Arginina total	3,01	2,98	2,98	2,98	2,99	2,99	2,99
Histidina total	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98
Isoleucina total	1,78	1,80	1,80	1,80	1,79	1,79	1,79
Leucina total	3,61	3,62	3,62	3,62	3,61	3,61	3,61
Lisina total	2,34	2,48	2,48	2,48	2,41	2,41	2,41
Metionina total	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Triptofano total	0,45	0,48	0,48	0,48	0,46	0,46	0,46
Valina total	1,95	1,94	1,94	1,94	1,95	1,95	1,95
Fenil total	2,04	2,06	2,06	2,06	2,05	2,05	2,05
Fosforo total	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Cálcio	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Composição química (% Matéria Seca) ⁴							
Matéria Seca	96,79	97,74	96,25	95,42	97,18	97,44	95,09
Matéria Mineral	14,23	12,96	12,86	12,83	13,83	13,77	13,38
Proteína Bruta	34,88	37,52	32,39	37,95	34,10	39,29	36,02
Etrato Etéreo	5,59	6,57	9,01	7,14	6,12	5,40	8,83
Fibra bruta	2,77	3,03	3,03	3,03	2,90	2,90	2,90
Energia Bruta (Kcal Kg ⁻¹)	4370	4500	4880	5010	4780	4870	4990

71 ¹HPF1: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 16,28%; HPF2: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise
 72 de 22,43% e HPF3: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%, MH1: 2,375% de inclusão do hidrolisado com grau
 73 de hidrólise de 16,28%, MH2: 2,375% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 22,43% e MH3: 2,375% de inclusão do hidrolisado
 74 com grau de hidrólise de 28,56%. ² Suplemento mineral e vitamínico - Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.750.000UI;
 75 Vit. D3, 375.000UI; Vit. E, 20.000UI; Vit. K3, 500mg; Vit. B1, 2.000mg; Vit.B2, 2.500mg; Vit.B6, 2.500mg; Vit. B12, 5.000mg; Ac. Fólico,
 76 625mg; Pantotenato Ca, 7.500mg; Vit. C, 37.500mg; Biotina, 50mg; Inositol, 12.500mg; Niacina, 8.750mg; Co, 50mg; Cu, 1.250mg; Fe,
 77 15.000mg; I, 100mg; Mn, 3.750mg; Se, 75mg; Zn, 17.500mg. ³ Valores calculados na formulação. ⁴Valores analisados.

78

79

80 Todos os ingredientes foram inicialmente triturados (0,3 mm) em um moinho tipo
81 martelo (modelo MCs 280, Vieira Moinhos e Martelo, Tatuí-SP, Brasil), e peneirados. Após
82 isso, seguiu-se o procedimento de homogeneização durante o período de 15 minutos em um
83 misturador mecânico do tipo “Y” (modelo MA 200, Marconi Equipamentos Laboratórios,
84 Piracicaba-SP, Brasil).

85 As dietas foram então extrusadas, com umidade de 20%, em matriz de 1,0 mm de
86 diâmetro em um equipamento modelo Ex-Micro® com capacidade de 10 kg h⁻¹ (Exteec
87 Máquinas, Ribeirão Preto-SP, Brasil). Após a extrusão, as dietas foram alocadas em estufa
88 ventilada por 24 h a 55 ° C (modelo TE-394/3-D, Tecnal Equipamentos Científicos para
89 Laboratórios, Piracicaba-SP, Brasil). Após secagem (55°C por 24 h), incorporou-se óleo de soja,
90 na forma de banho com auxílio de pulverizador manual. As dietas foram armazenadas em
91 câmara fria (4°C) até sua utilização.

92

93 **Delineamento Experimental**

94

95 O experimento foi efetivado sob condições laboratoriais, utilizando 3.150 exemplares
96 de tilápia do Nilo com peso inicial médio de $\mu = 0,02 \pm 0,01\text{g}$ e comprimento total e padrão de
97 $1,08 \pm 0,02\text{cm}$. Proveniente de piscicultura comercial e previamente aclimatado por sete dias.
98 Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em 21 caixas
99 polietileno com volume útil para 210 litros, em sete tratamentos com três repetições,
100 totalizando 150 animais por unidade experimental, 450 por tratamento.

101 Realizou-se o arraçoamento seis vezes ao dia (08h00, 10h00, 12h00, 14h00, 16h00 e
102 18h00), até a saciedade aparente. Ao final do dia, as excretas e restos alimentares e filtros foram
103 sifonados. O sistema foi equipado com recirculação de água, filtro mecânico, sistema de
104 aeração e aquecimento constante e realizou-se sifonamento diário. Durante o período
105 experimental, variáveis físicas e químicas da água foram monitoradas utilizando um
106 multiparâmetro portátil (modelo YSI-PRO PLUS), observando-se: Temperatura ($\mu = 27,27 \pm$
107 $0,15^\circ\text{C}$), Oxigênio Dissolvido Saturado ($\mu = 37,55 \pm 2,06 \%$), Oxigênio Dissolvido ($\mu = 2,95 \pm 0,17$
108 mg/L), condutividade elétrica ($\mu = 185,69 \pm 1,2 \mu\text{S/cm}$) e pH ($\mu = 6,95 \pm 0,03$), observando-se
109 que as taxas de oxigênio foram menores que os limites estabelecidos como satisfatórios para o
110 cultivo de peixes tropicais de água doce, (ARANA et al.,2004), porém, não houve interferência
111 em relação a sobrevivência e taxa de alimentação para as pós-larvas de tilápia do Nilo.

112 Ao final do período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24
113 horas e, após este período, foram eutanasiados em solução de benzocaína 100 mg L⁻¹

114 (OKAMURA et al., 2010) para a determinação de medidas individuais de peso (g) e
115 comprimento total (cm) e coleta de órgãos (estômago, intestino e fígado) para futuras
116 análises. Os cálculos de desempenho zootécnico foram determinados pelas seguintes
117 equações (NRC, 2011): Ganho em peso (GP)= (peso final - peso inicial); Ganho em peso
118 diário (GPD) = (peso final - peso inicial)/tempo (dias); Conversão alimentar aparente
119 (CAA) = consumo de alimento/ganho em peso total; Taxa de crescimento específico
120 (TCE) = (ln peso final - ln peso inicial) x 100/tempo; Taxa de eficiência proteica (TEP) =
121 ganho em peso vivo/proteína bruta consumida e Sobrevivência (S).

122

123 **Análises bromatológicas**

124

125 Os HPF's utilizados, as dietas experimentais e os peixes foram submetidos a análise de
126 composição centesimal (umidade, proteína, extrato etéreo, cinzas e energia), de acordo com a
127 metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz, exceção da energia bruta determinada,
128 apenas para as dietas, com o auxílio de uma bomba calorimétrica (Ika Works, modelo
129 C2000). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA)
130 do GEMaQ.

131 A partir da análise centesimal com base na matéria seca dos HPF's utilizados no
132 presente estudo, tais produtos revelaram-se isoproteicos com 56,23%, 57,90% e 56,94% e não
133 foram observadas diferenças na matéria mineral, 5,18%, 5,16%, 5,01%, para HPF1, HPF2 e
134 HPF3, respectivamente. em relação a composição lipídica observou-se um aumento na
135 quantidade de lipídeos ($p > 0,05$) possivelmente relacionada com o incremento de alcalase e
136 grau de hidrólise nos ingredientes testes para os hidrolisados de pescado, correspondendo a
137 30,59%, 53,56% e 57,29%, para HPF1, HPF2 e HPF3, respectivamente.

138

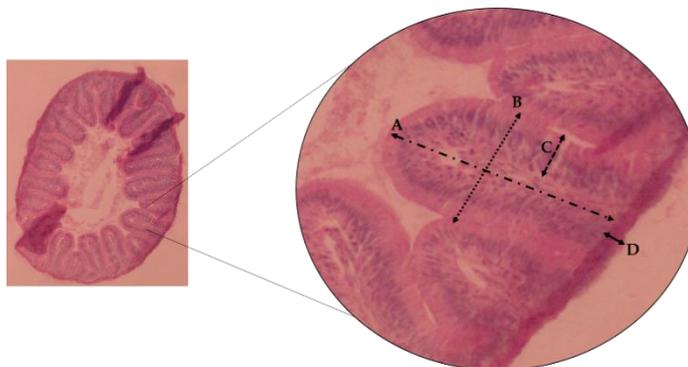
139 **Análises histológicas**

140

141 Para as análises histomorfométricas das vilosidades intestinais, três peixes de cada
142 caixa foram eutanasiados em solução de benzocaína 100 mg L⁻¹ (OKAMURA et al., 2010) sendo
143 retirado um segmento transversal da porção medial dos intestinos de cada peixe,
144 posteriormente fixados em solução de Alfac durante seis horas e conservadas em álcool 70°
145 para remoção do fixador até serem processadas.

146 Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados em
147 xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos por secções seriadas de 7µm

148 e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), em seguida as lâminas foram analisadas em
149 microscopia de luz mensurando a altura dos vilos (distância do topo das vilosidades ao início
150 da camada muscular), largura dos vilos (distância do topo de um enterócito ao topo do
151 enterócito do lado oposto), espessura dos vilos (distância entre as extremidades dos
152 enterócitos) e espessura da túnica (distância total da camada muscular circular e longitudinal)
153 na lente objetiva de 40X, pelo software cellSens Standard 1.15®.



154
155 **Figura 1.** Mensurações da histomorfometria intestinal de pós-larvas de tilápia do Nilo
156 para os diferentes níveis de inclusão de hidrolisado proteico. (A) Altura da vilosidade; (B)
157 Espessura das vilosidades; (C) Espessura das vilosidades; e (D) Espessura da túnica.
158

159 **Análises bioquímicas enzimáticas**

160
161 Os peixes foram eutanasiados em solução de benzocaína 100 mg L⁻¹ (OKAMURA et al.,
162 2010) para retirada imediata do fígado e intestino. Em seguida o material coletado foi
163 congelado individualmente em nitrogênio líquido e conservado a -80°C para posteriores
164 análises da atividade das enzimas do metabolismo intermediário destes órgãos.

165 Para as análises bioquímicas da atividade de enzimas nos órgãos, as amostras foram
166 homogeneizadas em tampão HEPES (Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico) 20 mM,
167 pH 7,4 e centrifugado a 20.000 g por 30 min (4 °C), o sobrenadante foi utilizado para a
168 determinação das atividades enzimáticas e a quantificação dos níveis totais de proteína foram
169 determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como
170 padrão. As amostras foram diluídas e normalizadas (1 µmol.mg proteína⁻¹) em solução tampão
171 TBE (Tris-Borato-EDTA) para padronização e determinação dos parâmetros bioquímicos.

172 Os ensaios enzimáticos foram realizados em um volume final de 500 µL, com exceção
173 da atividade da catalase (AEBI, 1984), cujo volume final será de 1 mL, onde as seguintes
174 enzimas foram avaliadas no intestino das pós-larvas de tilápia do Nilo: tripsina e
175 quimotripsina (HUMMEL, 1959), amilase, lipase e maltase via kit comercial da marca gold
176 Analisa®. Já no fígado, as seguintes enzimas foram avaliadas: transaminase glutâmico-

177 oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) via kit comercial da marca gold
178 Analisa®, e análise da peroxidação de lipídeos (LPO/TBARS) seguindo metodologia proposta
179 por FEDERICI *et al.* (2007).

180

181

182

183 **Análises estatísticas**

184

185 Os dados de desempenho produtivo, bromatológicos, histológicos e atividade
186 enzimática, atendendo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foram
187 submetidos à análise de variância ANOVA para verificar a interação entre os níveis de
188 inclusão dos hidrolisados proteicos e seus graus de hidrólise, quando significativas as médias
189 foram comparadas pelo teste de Fischer a 5% com o auxílio do software Statistica 7.0®

190

191 **3. RESULTADOS**

192

193

194 Com relação ao desempenho zootécnico com os diferentes níveis de inclusão dos HPF's
195 nas dietas (Tabela 2), observou-se que a inclusão destes hidrolisados foram satisfatórios em
196 relação a vários parâmetros produtivos, caracterizando-se potenciais alimentos alternativos
197 como fonte de proteína para pós-larvas de tilápia do Nilo. A combinação dos resultados
198 referentes ao consumo de ração (CR), ganho em peso (GP), conversão alimentar (CAA) e taxa
199 de eficiência proteica (TEP) da suplementação de 2,375 do HPF3 com um grau de hidrólise de
200 28,56% revelou-se uma opção de aplicação na formulação de dietas para peixes como fonte
201 proteica.

202

203

204

205

206

207

208

209 **Tabela 2.** Valores de desempenho produtivo médios de pós-larvas de tilápia do Nilo,
 210 alimentados com rações contendo hidrolisados proteicos de pescado (HPF's) com diferentes
 211 graus de hidrólise.

Parâmetro	Tratamentos*						
	Controle	HPF1	HPF2	HPF3	MH1	MH2	MH3
¹ PI (g)	0,02±0,003	0,02±0,003	0,02±0,003	0,02±0,003	0,02±0,003	0,02±0,003	0,02±0,003
² GP (g)	5,82±0,35 ^{abc}	5,73±0,33 ^{bc}	6,33±0,52 ^{ab}	5,64±0,32 ^{bc}	5,89±0,71 ^{abc}	5,30±0,74 ^c	6,59±0,14 ^a
³ PF (g)	5,83±0,35 ^{abc}	5,75±0,33 ^{bc}	6,34±0,52 ^{ab}	5,66±0,32 ^{bc}	5,91±0,71 ^{abc}	5,32±0,74 ^c	6,61±0,14 ^a
⁴ GPD(g.dia ⁻¹)	0,19±0,01 ^{ab}	0,19±0,01 ^{bc}	0,21±0,02 ^a	0,19±0,01 ^b	0,2±0,02 ^{ab}	0,18±0,02 ^b	0,22±0,01 ^a
⁵ CR (g)	880,2±10,26 ^c	882,8±11,6 ^c	870,4±3,88 ^{bc}	875,3±19,46 ^{ab}	845,0±21,78 ^{ab}	845,9±10,58 ^{ab}	857,5±10,79 ^a
⁶ CAA	1,14±0,09 ^{ab}	1,17±0,13 ^{ab}	1,06±0,04 ^{ab}	1,13±0,10 ^{ab}	1,14±0,17 ^{ab}	1,22±0,24 ^b	0,98±0,07 ^a
⁷ TEP (%)	2,54±0,20 ^{abc}	2,30±0,24 ^c	3,00±0,22 ^a	2,35±0,22 ^{bc}	2,60±0,39 ^{abc}	2,16±0,48 ^c	2,86±0,20 ^a
⁸ TCE	13,84±0,85	13,64±0,79	15,07±1,23	13,43±0,75	14,03±1,68	12,62±1,77	15,69±0,33
⁹ S (%)	89,11±2,14	88,44±3,42	89,11±0,77	92±3,71	85,33±5,93	89,78±9,46	89,56±,95

212 Valores médios seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Fischer (P<0,05). ¹Peso
 213 Médio Inicial (PMI); ²Peso Médio Final (PMF); ³Ganho em Peso (GP); ⁴Ganho em peso diário (GPD); ⁵Consumo de Ração (CR);
 214 ⁶Conversão Alimentar Aparente (CAA); ⁷Taxa de Eficiência Proteica (TEP); ⁸Taxa de Crescimento Específico (TCE); ⁹Sobrevivência
 215 (S). * HPF1: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 16,28%; HPF2: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de
 216 hidrólise de 22,43% e HPF3: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%, MH1: 2,375% de inclusão do hidrolisado
 217 com grau de hidrólise de 16,28%, MH2: 2,375% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 22,43% e MH3: 2,375% de inclusão do
 218 hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%.

219
 220 Quando incluídos nas dietas experimentais, a elevada carga de proteína dos
 221 hidrolisados proteicos de pescado disponibilizada nas dietas apresentou efeitos sobre a
 222 composição corporal das pós-larvas de tilápia do Nilo (p>0,05) (Tabela 3). A quantificação de
 223 lipídeos aumentou em relação ao grupo controle, como supracitado, os HPF apresentam
 224 valores elevados de lipídeos.

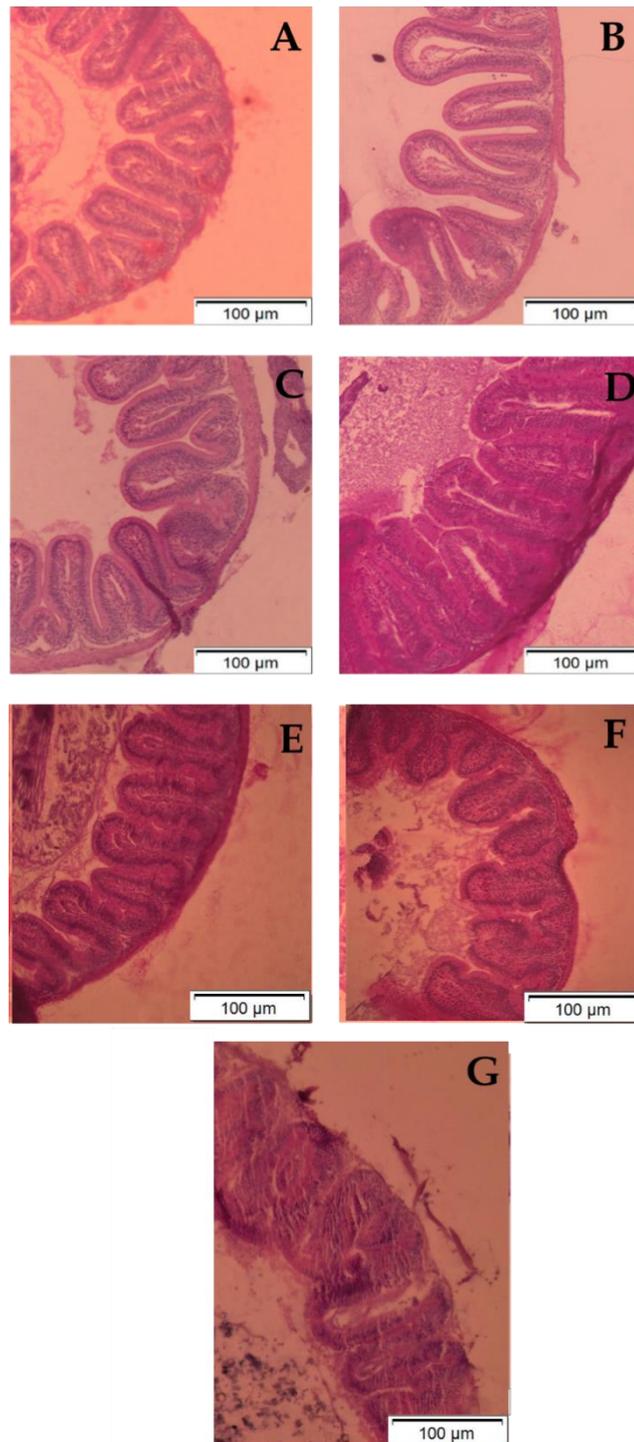
225 **Tabela 3.** Valores referentes a composição centesimal corporal de peixes alimentados
 226 com dietas suplementadas com hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de
 227 hidrólise. Valores expressos com base na matéria seca.

Parâmetro (%)	Tratamentos*						
	Controle	H1	H2	H3	MH1	MH2	MH3
Umidade	74,99±0,17	75,52±0,46	72,28±0,67	75,13±0,23	75,43±0,58	74,49±0,17	75,43±0,58
Proteína	59,84±0,60 ^c	60,11±0,29 ^{bc}	55,43±0,03 ^d	49,76±0,90 ^c	61,5±0,45 ^a	60,88±0,35 ^{bc}	60,6±0,75 ^{abc}
Lipídeos	22,44±1,12 ^b	23,69±2,90 ^{ab}	25,94±1,35 ^a	23,81±1,84 ^{ab}	22,15±0,80 ^b	23,61±0,78 ^{ab}	24,63±0,41 ^{ab}
Cinzas	12,59±0,02 ^a	10,94±0,06 ^d	11,36±0,13 ^c	11,29±0,09 ^c	11,5±0,24 ^c	12,07±0,08 ^b	11,05±0,16 ^d

228 Valores médios seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Fischer
 229 ($P < 0,05$). * HPF1: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 16,28%; HPF2: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau
 230 de hidrólise de 22,43% e HPF3: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%, MH1: 2,375% de inclusão do hidrolisado
 231 com grau de hidrólise de 16,28%, MH2: 2,375% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 22,43% e MH3: 2,375% de inclusão do
 232 hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%.

233
 234 Ao avaliar a histomorfometria das vilosidades intestinais das pós-larvas alimentadas
 235 com HPF com diferentes graus de hidrólise (Figura 2; Tabela 4), não foram observadas
 236 diferenças significativas sobre a largura e espessura da túnica. Em contrapartida, a altura das
 237 vilosidades e a espessura foram influenciadas pela inclusão dos hidrolisados proteicos de
 238 pescado ($p > 0,05$), observando-se uma diminuição sobre a altura de acordo com a inclusão dos
 239 hidrolisados proteicos e alteração significativa na espessura das vilosidades com a inclusão de
 240 2,375 de H3 com 28,56% de grau de hidrólise. Tais características para a inclusão do HPF3
 241 foram sustentadas pelo melhor desempenho produtivo em relação ao ganho em peso, ou seja,
 242 não prejudicou a absorção de nutrientes pelas pós-larvas de tilápia do Nilo.

243
 244
 245
 246
 247
 248



249

250

251

252

253

254

255

Figura 2. Parede do intestino medial de pós-larvas de tilápia do Nilo para os diferentes níveis de inclusão de hidrolisado proteico de pescado com diferentes graus de hidrólise nas dietas. Coradas em H.E. Fotografias realizadas na lente objetiva de 40x. *Letras correspondem aos tratamentos: (A) Controle; (B) HPF1; (C) HPF2; (D) HPF3; (E) Metade da inclusão do hidrolisado HPF1; (F) Metade da inclusão do hidrolisado HPF2; (G) Metade da inclusão do hidrolisado HPF3.*

256 **Tabela 4.** Histomorfometria intestinal de pós-larvas de tilápia do Nilo alimentados com
 257 rações contendo hidrolisados proteicos de pescado com diferentes graus de hidrólise.

Parâmetro (mm)	Tratamentos*						
	Controle	H1	H2	H3	MH1	MH2	MH3
Altura	200,2±86,14 ^b	140,16±46,93 ^a	134,26±48,82 ^a	193,01±50,90 ^b	152,78±46,36 ^{ab}	181,33±57,31 ^{ab}	141,04±31,64 ^a
Espessura	31,87±9,04 ^a	30,84±5,21 ^a	33,57±9,41 ^a	35,05±12,44 ^a	33,75±11,25 ^a	34,83±9,85 ^a	49,78±20,62 ^b
Largura	75,21±21,27	76,86±10,9	73,68±17,30	75,44±9,35	82,17±24,94	81,7±20,68	70,79±17,01
Túnica	17,64±3,52	15,65±4,17	17,15±4,93	17,33±3,91	18,4±5,37	17,08±3,63	18,49±4,76

258 Valores médios seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Fischer
 259 (P<0,05). *H1: hidrolisado A em condições de temperatura de 45°C, pH de 5,5 e concentração de enzima/substrato de 0,05; H2: hidrolisado
 260 B com condições de temperatura de 55°C pH de 6,5 e enzima/substrato de 0,15 e H3: hidrolisado C com condições de temperatura de 65°C, pH
 261 de 7,5 e enzima/substrato de 0,25, MH1: metade da inclusão do hidrolisado H1, MH2: metade da inclusão do hidrolisado H2 e MH3: metade
 262 da inclusão do hidrolisado H3

263
 264 Os resultados das análises histomorfométricas revelaram que a inclusão de HPF's têm
 265 influência na espessura das vilosidades intestinais para pós-larvas de tilápia do Nilo, visto que
 266 a velocidade de absorção de aminoácidos livres e pequenos peptídeos possivelmente
 267 aumentou devido a fatores como competição e transportes destes nutrientes, acarretando em
 268 uma menor altura e maior espessura das vilosidades.

269 Poucos estudos foram desenvolvidos com ensaios enzimáticos envolvendo a
 270 suplementação de hidrolisados proteicos de pescado em tilápia do Nilo. Ao avaliar a atividade
 271 de enzimas no intestino e fígado das pós-larvas de tilápia do Nilo, observou-se que os HPF's
 272 em diferentes graus de hidrólise podem interferir na atividade catalítica das enzimas.

273 Dentre as enzimas digestivas do intestino, não foram observadas alterações
 274 significativas na atividade de amilase e maltase. A lipase, a tripsina e a quimotripsina
 275 presentes no intestino dos peixes apresentaram diferenças significativas em relação a inclusão
 276 dos HPF (p<0,05) (Tabela 5). Quando comparadas a dieta controle, a atividade de
 277 quimotripsina foi menor para os tratamentos com inclusão de 4,750% do HPF3 e para a
 278 inclusão de 2,375% do HPF1. Entretanto, a atividade de tripsina aumentou com a inclusão dos
 279 HPF nas dietas em todos os tratamentos, com destaque para a inclusão da 2,375 do HPF1. A
 280 atividade da lipase apresentou-se maior para a inclusão do mesmo nível destacado acima, tais
 281 resultados são relacionados com a inclusão de HPF em diferentes graus de hidrólise, visto que

282 elevaram os valores referentes as composições lipídicas das rações e composição centesimal
 283 das carcaças das pós-larvas de tilápia do Nilo.

284

285 **Tabela 5.** Atividade enzimática de enzimas digestivas no intestino e fígado das pós-
 286 larvas de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo hidrolisados proteicos de pescado
 287 com diferentes graus de hidrólise.

288

Intestino Enzima ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína)	Tratamentos*						
	Controle	HPF1	HPF2	HPF3	MH1	MH2	MH3
Amilase	69,55 \pm 39,84	58,57 \pm 27,26	86,72 \pm 39,13	64,84 \pm 35,50	87,32 \pm 56,81	66,74 \pm 38,69	44,16 \pm 38,33
Maltase	6192,86 \pm 466,06	6021,54 \pm 385,78	5975,28 \pm 187,53	6060,57 \pm 649,15	5726,31 \pm 662,21	5703,27 \pm 659,77	6109,46 \pm 772,82
Lipase	355,15 \pm 24,59 ^{ab}	350,04 \pm 19,87 ^{ab}	367,72 \pm 12,29 ^{ab}	354,06 \pm 19,75 ^{ab}	374,37 \pm 33,21 ^a	348,46 \pm 24,66 ^b	351,01 \pm 33,68 ^{ab}
Quimotripsina	8,69 \pm 2,13 ^a	8,69 \pm 3,29 ^a	6,61 \pm 1,16 ^{ab}	5,19 \pm 1,12 ^b	5,84 \pm 1,16 ^b	8,91 \pm 2,97 ^a	7,00 \pm 2,17 ^{ab}
Tripsina	212,50 \pm 48,98 ^a	243,06 \pm 55,22 ^{ab}	250,00 \pm 63,08 ^{ab}	259,72 \pm 73,90 ^{ab}	288,43 \pm 59,59 ^b	225,00 \pm 31,20 ^{ab}	251,85 \pm 49,74 ^{ab}

Fígado							
Enzima	Controle	HPF1	HPF2	HPF3	MH1	MH2	MH3
Glicose	0,17 \pm 0,01 ^a	0,21 \pm 0,03 ^c	0,24 \pm 0,04 ^d	0,2 \pm 0,02 ^{bc}	0,16 \pm 0,03 ^a	0,17 \pm 0,02 ^a	0,16 \pm 0,01 ^a
¹ TGO	1,45 \pm 0,18	1,56 \pm 0,14	1,47 \pm 0,21	1,56 \pm 0,22	1,51 \pm 0,25	1,47 \pm 0,11	1,36 \pm 0,22
² TGP	3,53 \pm 0,40	3,7 \pm 0,43	3,89 \pm 0,61	3,8 \pm 0,59	3,6 \pm 0,63	3,66 \pm 0,39	3,62 \pm 0,39
³ Catalase	0,034 \pm 0,003 ^a	0,032 \pm 0,008 ^{ac}	0,034 \pm 0,008 ^a	0,036 \pm 0,006 ^a	0,023 \pm 0,006 ^b	0,026 \pm 0,008 ^{bc}	0,024 \pm 0,006 ^b
⁴ LPO/TBARS	0,036 \pm 0,01	0,039 \pm 0,03	0,042 \pm 0,04	0,042 \pm 0,02	0,043 \pm 0,03	0,037 \pm 0,02	0,033 \pm 0,01

289 Valores médios seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Fischer
 290 ($P < 0,05$). * HPF1: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 16,28%; HPF2: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau
 291 de hidrólise de 22,43% e HPF3: 4,750% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%, MH1: 2,375% de inclusão do hidrolisado
 292 com grau de hidrólise de 16,28%, MH2: 2,375% de inclusão do hidrolisado com grau de hidrólise de 22,43% e MH3: 2,375% de inclusão do
 293 hidrolisado com grau de hidrólise de 28,56%. ¹Transaminase glutâmico-oxalacética ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína); ²Transaminase glutâmico pirúvica
 294 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína); ³ Atividade de Catalase Peroxidase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína); ⁴ Análise da peroxidação de lipídeos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$
 295 proteína).

296

297 Resultados significativos também foram observados nas atividades enzimáticas no
 298 fígado das pós-larvas referente a glicose e catalase ($p > 0,05$), em relação a glicose, observou-se
 299 valores elevados quando a inclusão foi de 4,750% para todos os HPF's, revelando que em taxas
 300 elevadas, a inclusão de HPF's para pós-larvas elevam os níveis de glicose nos fígados da tilápia

301 do Nilo, visto que, quando em metade de sua inclusão, não observou-se diferenças em relação
302 ao grupo controle. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e
303 peróxido de hidrogênio (WOHLAERT et al., 2004), sendo observado o acompanhamento da
304 atividade de catalase de acordo com a atividade de glicose, onde a inclusão de 4,750% dos
305 HPF'S revelaram maior atividade desta enzima, quando comparada a metade da inclusão. As
306 demais enzimas mantiveram-se constantes com a inclusão de HPF's em dietas de pós-larvas
307 de tilápia do Nilo.

308

309

4. DISCUSSÃO

310

311 Os valores elevados na composição lipídica dos HPF's utilizados no presente estudo
312 são possivelmente relacionados com o incremento de alcalase e o grau de hidrólise nos
313 ingredientes testes para os hidrolisados de pescado. SOUZA *et al.* (2014) apresentaram 54,06%
314 de lipídeos em hidrolisados proteicos de pescado, com matéria-prima de carcaça de tilápia e
315 20% de sardinha, em se tratando apenas de resíduos de carcaça tilápia, SILVA *et al.* (2017)
316 apresentaram valores de 44,66%. Valores elevados de lipídeos são justificáveis pelo método da
317 hidrólise enzimática, pois há uma precipitação simultânea das proteínas insolúveis e solúveis,
318 devido à temperatura aplicada a hidrólise, interferindo nessa separação total de lipídeos e
319 proteínas. De acordo com MARTINS *et al.* (2009), diminuir o conteúdo de lipídios de
320 hidrolisados proteicos contribui para uma melhor estabilidade da oxidação lipídica.

321 Em relação a comparação entre os HPF's em diferentes graus de hidrólise, as dietas
322 contendo 2,375 do HPF3 revelaram-se mais eficazes ao ganho em peso (GP) para as pós-larvas
323 de tilápia, justificando-se com a relação consumo de ração e ganho em peso diário (CRxGPD),
324 ocorrendo menor consumo de ração e maior ganho em peso que os demais tratamentos
325 ($p < 0,05$). Ao utilizar hidrolisado de resíduos de peixes, SILVA *et al.* (2017) apresentaram
326 melhor desempenho produtivo para o nível de inclusão de 4,75 %, porém, apesar de não
327 informarem o grau de hidrólise, no estudo supracitado aplicou-se 0,5 % de alcalase para a
328 hidrólise enzimática na obtenção do hidrolisado proteico, logo, o grau de hidrólise tende a ser
329 maior que o presente estudo.

330 A inclusão de hidrolisados proteicos de pescado já demonstraram ser uma excelente
331 fonte de proteína, com bom valor nutritivo, podendo ser adicionado a rações de peixes em
332 fases iniciais de vida (CHOTIKACHINDA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). Os resultados
333 favoráveis em relação a conversão alimentar aparente (CAA), ganho em peso (GP), ganho em
334 peso diário (GPD), e peso final (PF) das pós-larvas de tilápia do Nilo suplementadas com HPF

335 no presente estudo foram influenciados positivamente ($p>0,05$), sugerindo-se uma possível
336 fonte de proteína a partir de resíduos de pescado para implementação em dietas de pós-larvas
337 de tilápia do Nilo.

338 Na análise centesimal da composição corporal dos peixes após o período experimental,
339 observaram-se melhores resultados para o nível de inclusão de 2,375 do HPF1 com grau de
340 hidrólise de 16,28% em relação a quantidade de proteína. Valores menores foram obtidos por
341 ROCHA *et al.* (2014) ao avaliarem a inclusão de hidrolisado proteico de pescado em dietas para
342 alevinos de tilápia, não observando diferenças significativas no teor de proteínas para os níveis
343 de inclusão de 0 a 4% de hidrolisado proteico de pescado.

344 Quanto maior o grau de hidrólise, maior a quantidade de fragmentação da proteína em
345 peptídeos de tamanho menores (ALVES *et al.*, 2015), os aminoácidos livres são absorvidos
346 rapidamente apenas no intestino delgado proximal, enquanto os dipeptídeos e tripeptídeos
347 têm uma taxa de absorção rápida tanto na região proximal quanto na distal (FRENHANI &
348 BURINI, 1999; RONNESTAD & MORAIS, 2008). Com isso, na tentativa de aperfeiçoar o
349 aproveitamento dos ingredientes ingeridos, os peixes apresentam capacidade de adaptação
350 dos processos digestivos, tais como: secreção enzimáticas e absorção e transporte de nutrientes
351 (HONORATO, 2011).

352 O intestino é um órgão envolvido em importantes funções fisiológicas, possibilitando
353 a avaliação microscópica de suas vilosidades, cuja função é intrínseca a área superficial do
354 tecido para absorção de nutrientes (CARVALHO *et al.*, 2011; BALDISSEROTO *et al.*, 2009). A
355 musculatura intestinal pode atuar como indicativo de desempenho nutricional de acordo com
356 as alterações no tecido que revelam sobre a capacidade de absorção dos nutrientes pelos peixes
357 (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005). A análise da morfologia intestinal e os resultados obtidos
358 no presente estudo foram satisfatórios, visto que, observou-se adaptações dos intestinos dos
359 peixes para otimização da absorção dos nutrientes oferecidos pelos ingredientes,
360 principalmente os peptídeos de baixo peso molecular disponibilizados pela hidrólise
361 enzimática.

362 Com o intestino comparativamente mais longo que o de espécies carnívoras, a tilápia
363 do Nilo possibilita que o alimento ingerido seja transportado por mais tempo em seu trato
364 intestinal, com isso, o contato com as enzimas digestivas é elevado (BALDISSEROTTO, 2014).
365 As avaliações de atividades enzimáticas fornecem informações sobre a fisiologia nutricional e
366 na capacidade de tomar vantagem das diferentes frações nutricionais dos alimentos ingeridos
367 pelos peixes (GIODA *et al.*, 2017; LAZZARI *et al.*, 2019). Uma abordagem para estudar a
368 capacidade de um organismo em usar proteína na dieta é a caracterização e quantificação de

369 enzimas responsáveis pela digestão, juntamente com os estudos da influência das dietas na
370 regulação bioquímica do sistema digestivo (GARCIA-CARREÑO et al., 2002).

371 A habilidade de um organismo para digerir partículas de alimento depende da
372 presença e da quantidade apropriada de enzimas digestivas (SEIXAS-FILHO, et al., 1999).
373 Neste estudo, visto a influência do HPF com diferentes graus de hidrólise na absorção dos
374 nutrientes pelo intestino, as avaliações bioquímicas realizadas corroboram com os resultados
375 observados. A atividade de enzimas digestivas é variável conforme quantidade e qualidade
376 dos nutrientes, ou seja, os peixes apresentam capacidade de adequação dos seus processos
377 digestivos (BALDISSEROTTO, 2009). Segundo BALDISSEROTTO (2002), as espécies
378 omnívoras não apresentam problemas de digerir o amido por secretarem a amilase em todas
379 as regiões do intestino. A formulação das dietas com inclusão dos HPF's com diferentes graus
380 de hidrólise foi realizada de modo a ter quantidades próximas de amido, justificando a
381 atividade regular de amilase e maltase para todos os tratamentos.

382 Quando avaliadas as atividades de tripsina e quimotripsina em dietas para *Rhamdia*
383 *quelen*, LOVATTO et al. (2013) sugeriram que a inclusão de alimentos fibrosos pode alterar a
384 viscosidade do intestino e dificultar o acesso das enzimas aos substratos e igualmente dos
385 alimentos digeridos à borda do intestino. Foram observadas diferenças significativas nas
386 atividades das enzimas digestivas tripsina e quimotripsina. Estas enzimas são endopeptidases
387 proteolíticas com ações muito específicas, atuando no final do ciclo de digestão de proteínas
388 no intestino (LOVATTO et al., 2013). A tripsina hidrolisa as ligações peptídicas de
389 grupamentos carbonila pertencentes a resíduos de lisina ou arginina, sendo a única enzima
390 capaz de se auto ativar e ativar outras enzimas digestivas (DE SILVA & ANDERSON, 1995;
391 NAZEMROAYA et al., 2015), enquanto que a quimotripsina hidrolisa as ligações peptídicas
392 de grupos carbonila providos de fenilalanina, triptofano e tirosina (DE SILVA & ANDERSON,
393 1995). Visto que a atuação das enzimas digestivas é alterada de acordo com a região intestinal
394 avaliada, e no presente estudo avaliou-se o intestino como um todo, sugere-se que em futuros
395 estudos relacionados a atividade de enzimas digestivas, realiza-se a coleta das regiões distal,
396 medial e proximal dos intestino para uma melhor visualização da atividade enzimática local e
397 possível caracterização do mesmo.

398 Observou-se diferenças significativas em duas potenciais enzimas no fígado
399 envolvidas no estresse oxidativo: glicose e alcalase. O metabolismo da glicose é uma das
400 principais fontes energéticas para as células dos peixes, podemos relacionar os resultados
401 obtidos na atividade de glicose com a atividade da catalase, visto que o produto da atividade
402 da glicose no fígado, o peróxido de hidrogênio, é o substrato para a atividade da catalase

403 (BARBOSA, et al. 2010). Quando em excesso, o peróxido de hidrogênio culmina em danos
404 oxidativos aos organismos (FERREIRA, 1997). A catalase está envolvida nas principais defesas
405 antioxidantes que atuam no metabolismo, encarregada por fazer a conversão de altas
406 concentrações de peróxido de oxigênio em água e oxigênio (BARBOSA, et al. 2010). Os valores
407 apresentados no presente estudo para a atividade da catalase foram próximos aos observados
408 em estudos que avaliaram efeitos antioxidantes em dietas para tilápia do Nilo, nos quais os
409 valores variavam entre 0,18 a 0,36 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína (ABDELKHALEK et al., 2017;
410 GHAFARI, et al., 2017).

411 Apesar de não apresentar diferenças significativas quanto a inclusão de HPF para
412 tilápia do Nilo, a avaliação da atividade das enzimas TGO (Transaminase glutâmico-
413 oxalacética) e TGP (Transaminase glutâmico pirúvica) é fundamental, visto que elas
414 desempenham papel essencial tanto na degradação quanto na síntese de aminoácidos
415 (BECKER, 2018). Segundo Ferreira, *et al.* (1997), a atividade de LPO/TBARS é relacionada a
416 alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares devido à ação dos
417 radicais livres, interferindo em atividades de redução e oxidação das células, não sendo
418 observada nenhuma alteração quanto a inclusão de hidrolisados proteicos para a tilápia do
419 Nilo. Assim, para o acompanhamento da saúde dos peixes a avaliação da atividade dessas
420 enzimas podem ser utilizadas como marcadores de estresse oxidativo para os peixes.

421 A partir dos dados obtidos no presente estudo, observou-se que a inclusão de HPF em
422 diferentes graus de hidrólise apresenta efeitos significativos no desempenho produtivo de
423 pós-larvas de tilápia do Nilo, além de benefícios em relação ao incremento de proteína na
424 composição corporal dos peixes, podendo ser utilizado em outras fases de desenvolvimento
425 da tilápia a fim de buscar maiores ganhos de peso e rendimento de filé. A partir das análises
426 bioquímicas do intestino e fígado das pós-larvas de tilápia do Nilo foi possível determinar
427 uma relação com a carga de nutrientes disponibilizados na ração com a capacidade de
428 absorção destes pelos organismos dos peixes, direcionando a absorção para melhor
429 aproveitamento da alta carga de aminoácidos livres disponibilizada e adaptações capazes de
430 evitar danos oxidativos para as pós-larvas suplementadas com os HPF's em diferentes graus
431 de hidrólise.

432

433

434

435

5. CONCLUSÃO

436

437 O nível de inclusão de 2,375% do HPF em condições de grau de hidrólise de 28,56%
438 apresentou melhores resultados sobre o desempenho produtivo e bom aproveitamento dos
439 nutrientes disponibilizados pela dieta elevando a quantidade de proteína na composição
440 corporal de pós-larvas de tilápia do Nilo.

441 A inclusão de 2,375% do HPF3 com condições de grau de hidrólise de 28,56% diminuiu
442 a altura e aumentou a espessura da vilosidade intestinal sem interferir no desempenho
443 produtivo e na absorção de nutrientes pelos peixes.

444 A partir das análises bioquímicas das enzimas digestivas no intestino observou-se um
445 incremento na capacidade de absorção de nutrientes advindos da suplementação de HPF's
446 com diferentes graus de hidrólise nas dietas de pós-larvas de tilápia do Nilo.

447 As pós-larvas de tilápia do Nilo apresentaram adaptações enzimáticas para controle de
448 estresse oxidativo decorrente da alta carga de suplementação dos hidrolisados proteicos em
449 diferentes graus de hidrólise.

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

6. REFERÊNCIAS

470

471 ALVES, D. R. S., OLIVEIRA, S. R., LUCZINSKI, T. G., BOSCOLO, W. R.,
472 BITTENCOURT, F., SIGNOR, A., & DETSCH, D. T. (2020) Attractability and palatability of
473 liquid protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles. *Aquaculture Research*. 00.1-8.
474 <https://doi.org/10.1111/are.14514>

475

476 ALVES, G. K. Uso de Papaína e Bromelina para obtenção de Hidrolisados Proteicos de
477 Fígado de Suíno. Florianópolis, 2015. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –
478 Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

479

480 ARANA, L. V. 2004 Fundamentos de aquicultura. Universidade Federal de Santa
481 Catarina – UFSC, p.349.

482

483 BALDISSEROTTO, B. 2009 Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. 2 ed. Santa
484 Maria, UFSM.

485

486 BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. 2014 Biologia e fisiologia de
487 peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP. NLM.

488

489 BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. de C. G., DE PAULA, S. O.,
490 MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. 201) Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores
491 modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23 (4), 629–643. [https://doi.org/10.1590/S1415-](https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013)
492 [52732010000400013](https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013)

493

494 BRADFORD, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of
495 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
496 *Biochemistry*, v. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

497

498 CARVALHO J.V., LIRA A. D., COSTA D. S. P., MOREIRA E. L. T., PINTO L. F. B. &
499 ALBINATI R. C. B. 2011 Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de
500 tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou nanoligossacarídeo. *Revista Brasileira de*
501 *Saúde e Produção Animal*, v.12, 176-187.

502

503 CHOTIKACHINDA, R.; TANTIKITTI, C.; BENJAKUL, S.; RUSTAD, T.; KUMARNSIT,
504 E. 2013 Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as

505 feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, v.19, 773-784
506 <https://doi.org/10.1111/anu.12024>

507

508 DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. 2000 Replacement of fish meal in practical diets for the
509 Pacific White shrimp, *Litopennaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 235, 291-298.
510 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00354-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00354-3)

511

512 DECARLI, J. A., PEDRON, F. A., LAVARRI, R., SIGNOR, A., BOSCOLO, W. R.,
513 FEIDEN, A. 2016 Hidrolisado proteico na alimentação do jundiá. *Revista brasileira de Ciências*
514 *Veterinária*, v. 23,168 – 173. <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2016.051>

515

516 DE SILVA, S. S., ANDERSON, T. 1995 Fish nutrition in aquaculture. London: Chapman
517 & Hall, 319p.

518

519 DUARTE, O. S. Caracterização da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida a
520 dieta suplementadas com óleo de peixe. Goiânia, 2017. 195p. Tese (Doutorado em Ciência
521 Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, 2017.

522

523 FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. 2007 Toxicity of titanium dioxide
524 nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other
525 physiological effects. *Aquatic Toxicology*, v. 84, 415-430.
526 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

527

528 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. 1997 Radicais livres: conceitos, doenças
529 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*. v.43(1).
530 <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

531

532

533 FRENHANI, P. B & BURINI, R. C. 1999 Mecanismos de absorção de aminoácidos e
534 oligopeptídios: Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arquivos de Gastroenterologia*
535 [online]. v.36, n.4, 227-237. <https://doi.org/10.1590/S0004-28031999000400011>.

536

537 GARCÍA-CARREÑO F. L., CAVALCANTI C. A., ZANIBONI-FILHO E.. 2002
538 Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects

539 of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. v. 132. 343-352.
540 [https://doi.org/ 10.1016/S1096-4959\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00038-6)

541
542 GIODA, C. R., PRETTO, A., FREITAS, C. S., LEITEMPERGER, J., LORO, V. L.,
543 LAZZARI, R., LISSNER, L. A., BALDISSEROTTO, B., SALBEGO, J. 2017 Different feeding
544 habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural*, 47(3).
545 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160113>

546
547 HONORATO, C. A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D. J.; MACHADO, M. R. F. 2011
548 Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
549 alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*
550 *Animal Science*, v. 48, n. 4, 281- 288

551
552 HOYLE, N.; MERRITT, J. H. 1994 Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring
553 (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. V. 59. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x)
554 [2621.1994.tb06901.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x)

555
556 HUMMEL, B.C.W. 1959 A modified spectrophotometric determination of
557 chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37 n.12,
558 1393-1399. <https://doi.org/10.1139/o59-157>

559
560 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 2008 Histologia básica. 11.ed. Rio de Janeiro:
561 Guanabara Koogan S.A., 524p.

562
563 KRISTINSSON, H. G. 2006 The production, properties, and utilization of fish protein
564 hydrolysates. In: SHETTY, K.; PALIYATH, G.; POMETTO, A.; LEVIN, R. E. *Food Biotechnology*.
565 New York: Taylor & Francis Group. p.1111-1133.

566
567 LAZZARI, R., UCZAY, J., HENRIQUES, J.K.S., DURIGON, E.G., KUNZ, D.F.,
568 PEIXOTO, N.C., & FRONZA, D. 2019 Growth and digestive enzymes of silver catfish fed diets
569 containing fruit residue. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71(1), 323-330.
570 <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10343>

571

572 LOVATTO, N. M.; Silva, L.P.; LOUREIRO, B.B.; GOULART, F. R.; PRETTO, A.;
573 SPERONI, C.S.; NETO, J.R.; LORO, V. L. 2014 Efeitos de dietas contendo concentrados proteicos
574 vegetais no desempenho e atividade de enzimas digestivas de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Semina*.
575 *Ciências Agrárias* (Online) v. 35. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p1071>

576
577 LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. 1951 Protein
578 measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemical*. v.193(1), 265-75.

579
580 MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V. PRENTICE-HERNANDEZ, C. 2009 Hidrolisado
581 protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias*
582 *furnieri*). *Química Nova* [online]. v.32, n.1. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100012>

583
584 MARTÍNEZ-ALVAREZ, O., CHAMORRO, S., BRENES, A. 2015 Protein hydrolysates
585 from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal
586 feeding: A review. *Food Research International*, 73, 204-212.
587 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>

588
589 NAZEMROAYA, S.; YAZDANPARAST, R.; NEMATOLLAHI, M. A.; FARAHMAND,
590 H.; MIRZADEH, Q. 2015 Ontogenetic development of digestive enzymes in sobaity sea bream
591 Sparidentex hasta larvae under culture condition. *Aquaculture*. v.448, 545-551.
592 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.038>

593
594 NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The
595 National Academies Press, Washington, D.C. 392p. 2011

596
597 RAVALLEC-PLÉ R., CHARLOT C., PIRES C., BRAGA V., BATISTA I., WORMHOUDT
598 A.V., LE GAL Y., FOUCHEREAUPÉRON M. 2001 The presence of bioactive peptides in
599 hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the*
600 *Science of Food and Agriculture*, v. 81: 1120-1125. <https://doi.org/10.1002/jsfa.921>

601
602
603 ROCHA, J. D. C. Hidrolisado proteico de pescado em dietas para alevinos de tilápia do
604 Nilo. 2014. 41 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) -
605 Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2014

606

607 RONNESTAD, I.; MORAIS S. DIGESTION. 2008 In: R.N. Finn, B.G. Kapoor. Fish larval
608 physiology. Science Publishers: USA. p. 741.

609

610

611 SEIXAS-FILHO, J. T., OLIVEIRA, M. G. A., DONZELE, J. G., GOMIDE, A. T. M., &
612 MENIN, E. 1999 Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixes teleostei
613 de água doce. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28(5), 907-913. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000500001)
614 [35981999000500001](https://doi.org/10.1590/S1516-35981999000500001)

615

616 SILVA, J. F. X., RIBEIRO, K., SILVA, J.F., CAHU, T., BEZERRA, R. 2014 Utilization of
617 tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and*
618 *Technology*, v.196. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010>

619

620 SILVA, T. C.; ROCHA, J. D. M.; MOREIRA, P.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W. R. 2017
621 Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*,
622 v.52, 485-492. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2017000700002>

623

624 OKAMURA, D. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos
625 peixes na anestesia e na recuperação de tilápias do Nilo. 2010 *Revista Brasileira de Zootecnia*
626 [online]. v.39, n.5, 971-976. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500005>

627

628 ZARAVEZE, E.R; SILVA, C.M.; SALAS-MELLADO, M. 2009 Funcionalidade de
629 hidrolisados proteicos de cabrina (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases
630 microbianas. *Química Nova*, v. 32, n. 7, 1739 - 1743. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700011)
631 [40422009000700011](https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700011)