

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

DÉBORA TATYANE OLIVEIRA XAVIER

Proteína hidrolisada enzimática de penas em dietas para tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Toledo
2022

DÉBORA TATYANE OLIVEIRA XAVIER

Proteína hidrolisada de penas em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Tese 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 Doutora em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Altevir Signor

Coorientadora: Prof. Dr. Luisa Helena Cazarolli

Toledo

2022

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

Tatyane Oliveira Xavier, Débora

Proteína hidrolisada enzimática de penas em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Débora Tatyane Oliveira Xavier; orientador Altevir Signor; coorientadora Luisa Helena Cazarolli. -- Toledo, 2022.

106 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2022.

1. Aquicultura. 2. Exigências nutricionais. 3. Nutrientes. 4. Piscicultura. I. Signor, Altevir, orient. II. Helena Cazarolli, Luisa, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DÉBORA TATYANE OLIVEIRA XAVIER

Proteína hidrolisada enzimática de penas em dietas para tilápia do Nilo

(Oreochromis niloticus)

Tese 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 Doutor (a) 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- UNIOESTE (Presidente)

Prof. Dr. Luisa Helena Cazarolli

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) (Coorientadora)

Prof. Dr. Aldi Feiden

Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE (Presidente)

Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE

Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Prof. Dr. Lian Valente Brandão

Instituto Federal De Educação, Ciência E Tecnologia Do Pará- IFPA

Dr. José Uebi Maluf

Gerente P&D e do CIEX da BRF - Brasil Foods.

Aprovada em:

Local de defesa:

Dedico este trabalho ao meu Deus. A Ele devo toda honra e glória. Aos meus familiares, amigos e meu querido orientador que me deram apoio e foram compreensivos durante o período dedicado aos estudos. Todos parente e amigos que tive a infelicidade de perder, durante esse período de pandemia (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Institucionais

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, durante o período necessário;

A Unioeste pela estrutura necessária para realização das pesquisas e todos que fazem parte do corpo de funcionários;

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca pela formação e capacitação. Aos meus queridos mestres Altevir, Wilson, Aldi e Fábio;

A BRF Ingredients Ltda, empresa parceira deste estudo, por disponibilizar o produto, análises e auxiliar na divulgação dos resultados, em especial a Thais Andrade e José Maluf pela confiança.

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por disponibilizar os laboratórios para a realização de análises fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

A Primato cooperativa agroindustrial, pela oportunidade na inclusão do mercado de trabalho.

Especiais

A Deus, por me livrar, guiar e proteger durante esse tempo delicado para toda a nação.

Aos meus pais, Francisco Xavier e Paula Giovania, por todo o ensinamento e amor. Mesmo a 3.200 km de distância que nos separam, estamos conectados diariamente, sendo forte o suficiente para que juntos alcancemos mais um sonho. Amo vocês imensamente. Esse título é nosso!

Ao meus irmãos, Andressa Xavier e Francisco Junior, por serem meus melhores amigos!

Aos meus avós, Maria Avelino, Maria Inês, Jose Miguel (*in memoriam*), Expedito Xavier, amo imensamente cada um de vocês.

Ao meu orientador, Altevir Signor por ser tão compreensivo, amigo e disposto a ajudar a todos os momentos. Você sempre será uma inspiração em minha vida, obrigada professor! Sentirei falta do “É ISSO AI MOÇADA”.

A minha coorientadora, Luisa Cazarolli, por todo apoio e ajuda, obrigada!

Ao Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo, por ser essa referência no setor aquícola, por sua humildade em nos repassar tantos conhecimentos. Serei sempre grata por tudo!

Ao Prof. Dr. Aldi Feiden, por sempre lembrar que “Alguém tem que trabalhar”, por nos contemplar todos os dias com uma gargalhada super saudável. Obrigada por sua amizade e seus incentivos durante esses anos. Obrigada por tudo professor!

Ao Prof. Dr. Fábio Bittencourt, um profissional íntegro e com vasto conhecimento, sempre disposto a nos ajudar. Mesmo não gostando de tereré (cherry and ice) eu tenho um carinho imenso por você, obrigada por tudo professor!

Aos amigos de pesquisa em especial Thais, Tayna, Herivelton, Janaina, Grace, Suzana, Valdir, Juliana, Leone, Francisco, Rayana, Karla, Lucas, Jean, Jessica e Milena (obrigada meninas). . Aos amigos que conquistei em Toledo, principalmente equipe AGRO: Thamirys, Wesley, Lucas, Daiane, Fernandinho, Diego, Renan, Junior, Janaina, Débora, Juliano, Marcio, Maico, Marciele, etc.. A Fernanda Pohl, por ser a pessoa mais inteligente e legal do sul do mundo, amo todos.

A Carla Muerer e Uilian Simões que não pouparam esforços para nos atender de forma ágil. Obrigada assistentes do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Mais que especial!

Ao Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – GEMAq, que contém um time de docente que idealizarem, agem e colocam em prática incansavelmente, trabalhos e ações para o desenvolvimento e sucesso profissional de todos aqueles que passaram por esse grupo de pesquisa nesses mais de 15 anos de existência. Somos parte dessa linda história de desenvolvimento da cadeia produtiva do pescado, principalmente no oeste do Paraná, parabéns a todos os envolvidos.

Tenho orgulho em fazer parte dessa família Gemaq, sentirei saudades.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Proteína hidrolisada enzimática de penas em dietas para tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

A atividade piscícola apresenta elevados índices de produtividades, investimentos financeiros e renda, consistindo em intensificação dos sistemas de criação, demandando novas tecnologias e alimentos alternativos que possam melhor disponibilizar os nutrientes das dietas e atender as exigências nutricionais dos animais cultivados. Desta forma os respectivos estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a inclusão de proteína hidrolisada de penas (PHP) em dietas para tilápia do Nilo sobre os aspectos de desempenho produtivo, histológico e enzimático em diferentes fases de cultivo. As pesquisas foram realizadas com larvas e alevinos em três diferentes momentos, todos com níveis crescentes (Controle (0%), 1%, 2%, 3%, 4% e 5%) de inclusão de proteína hidrolisada de penas (BRF[®]) nas dietas e um controle negativo com ração comercial utilizada nas unidades de produção. As rações foram formuladas de forma a conterem 38% e 34% de proteína digestível, respectivamente, ambas com 3400 kcal de energia digestível/kg de dieta. Valores nutricionais recomendados para a espécie objeto de estudo na fase de desenvolvimento em que se encontram. O **Estudo I**, foram distribuídos ao acaso 2.520 larvas com peso médio inicial de $0,017 \pm 0,002$ g em 21 aquários de polietileno (120 litros de volume útil), totalizando sete tratamentos com três repetições. Com duração de 15 dias de experimentais. O **Estudo II** constituiu-se de um prolongamento do experimento I. Ao finalizar o estudo I (15 dias de experimentação), as larvas encontravam-se na fase de alevino, padronizou-se o peso dos animais experimentais mantendo-se os respectivos tratamentos e o mesmo delineamento, readequando a densidade, sendo 30 alevinos por aquário. Para esse estudo utilizou-se 630 peixes com peso médio de $\mu = 1,67 \pm 0,05$ g, 90 peixes por tratamento, sendo 35 dias experimentais. Para o **Estudo III** obtiveram-se alevinos obtidos diretamente da granja de criação na mesma fase de desenvolvimento do Estudo II. Para o Estudo III eliminou-se o controle negativo que correspondia a ração comercial, por tanto, seu delineamento experimental consistiu em seis tratamentos e quatro repetições, correspondendo 24 unidades experimentais de 150 litros, com 30 peixes por aquário, totalizando 720 animais com peso médio de $1,96 \pm 0,03$ g. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente (8h, 10h, 12h, 14h, 16h e 18h00) com as rações experimentais contendo os diferentes níveis de inclusão de hidrolisados por 30 dias. Os parâmetros de qualidade de água foram aferidos semanalmente, através de aparelho eletrônico multiparâmetro. Ao final do experimento, verificou-se os parâmetros de desempenho produtivo dos animais experimentais. A inclusão de hidrolisado

proteico de penas nas dietas melhorou aspectos zootécnicos de larvas e alevinos de tilápia do Nilo que receberam o ingrediente teste desde os primeiros dias de vida. Assim, recomenda-se a inclusão de 2% e 1% respectivamente do referido produto para melhor desempenho produtivo nas fases de criações supracitadas. Para a fase de alevinagem no estudo III não foram observadas diferenças estatísticas no desempenho de tilápia do Nilo alimentadas com PHP. Assim, o ingrediente alternativo demonstrou ser potencial para substituição da farinha de peixe na dieta, sem comprometer os parâmetros de desempenho produtivo dos alevinos de tilápia do Nilo.

Palavra-chave: Aquicultura, cadeia produtiva, *Oreochromis niloticus*, coproduto.

Enzyme hydrolyzed protein from feathers in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

SUMMARY

The fish farming activity has high levels of productivity, financial investments and income, consisting in the intensification of farming systems, demanding new technologies and alternative foods that can better provide the nutrients in the diets and meet the nutritional requirements of farmed animals. Thus, the respective studies were carried out with the objective of evaluating the inclusion of hydrolyzed feather protein (PHP) in diets for Nile tilapia on the aspects of productive, histological and enzymatic performance in different stages of cultivation. The researches were carried out with larvae and fingerlings at three different times, all with increasing levels (Control (0%), 1%, 2%, 3%, 4% and 5%) of inclusion of hydrolyzed feather protein (BRF®) in the diets and a negative control with commercial ration used in the production units. The rations were formulated to contain 38% and 34% of digestible protein, respectively, both with 3400 kcal of digestible energy/kg of diet. Recommended nutritional values for the species under study at the stage of development in which they are. In Study I, 2,520 larvae with a mean initial weight of 0.017 ± 0.002 g were randomly distributed in 21 polyethylene aquariums (120 liters of useful volume), totaling seven treatments with three replications. With a duration of 15 days of trials. Study II was an extension of experiment I. At the end of study I (15 days of experimentation), the larvae were in the fingerling stage, the weight of the experimental animals was standardized, maintaining the respective treatments and the same design, readjusting the density, with 30 fingerlings per aquarium. For this study,

630 fish with an average weight of $\mu = 1.67 \pm 0.05$ g were used, 90 fish per treatment, with 35 experimental days. For Study III, fingerlings were obtained directly from the breeding farm at the same stage of development as in Study II. For Study III, the negative control corresponding to commercial feed was eliminated, therefore, its experimental design consisted of six treatments and four replications, corresponding to 24 experimental units of 150 liters, with 30 fish per aquarium, totaling 720 animals with average weight of 1.96 ± 0.03 g. The fish were fed until apparent satiation (8:00 am, 10:00 am, 12:00 pm, 2:00 pm, 4:00 pm and 6:00 pm) with experimental diets containing different levels of hydrolysate inclusion for 30 days. The water quality parameters were measured weekly, using a multi-parameter electronic device. At the end of the experiment, the parameters of productive performance of the experimental animals were verified. The inclusion of feather protein hydrolyzate in the diets improved the zootechnical aspects of Nile tilapia larvae and fingerlings that received the test ingredient from the first days of life. Thus, it is recommended the inclusion of 2% and 1% respectively of the referred product for better productive performance in the aforementioned breeding phases. For the nursery stage in study III, no statistical differences were observed in the performance of Nile tilapia fed with PHP. Thus, the alternative ingredient proved to be potential for replacing fish meal in the diet, without compromising the parameters of productive performance of Nile tilapia fingerlings.

Keywords: Aquaculture, production chain, *Oreochromis niloticus*, co-product.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
Introdução	14
Avicultura	15
Aditivos dietéticos	16
Peptídeos bioativos	17
Hidrolisados proteicos.....	18
Referências.....	21
Objetivos	30
Objetivo geral.....	30
Objetivos específicos	30
CAPÍTULO 2	31
HIDROLISADO PROTEICO DE PENAS EM DIETA PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO	31
Resumo	31
Abstract.....	31
Introdução	32
Metodologia.....	33
Resultados e discussão.....	39
Conclusão.....	44
Referências.....	45
CAPÍTULO 3	50
DESEMPENHO PRODUTIVO, HISTOLÓGICO, CAPACIDADE DIGESTIVA E METABÓLICA DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS COM PROTEINA HIDROLISADA DE PENAS	50
Resumo	50
Abstract.....	50
Introdução	51
Metodologia.....	52
Resultados e discussão.....	59
Conclusão.....	71
Referências.....	72
CAPÍTULO 4	79
PROTEINA HIDROLISADA DE PENAS COMO ADITIVO EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	79

Resumo	79
Abstract	79
Introdução	80
Metodologia	81
Delineamento experimental	81
Estrutura experimental	81
Ingrediente alternativo	82
Arraçoamento.....	85
Qualidade de água.....	85
Análises bromatológicas	85
Desempenho produtivo	86
Análises histológicas - Fígado	87
Análises histológicas – Músculo.....	87
Estresse ao ar.....	89
Análises estatísticas	89
Conclusão.....	100
Referências.....	102

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Introdução

A aquicultura demonstra um alto potencial de desenvolvimento, resultando na produção de proteínas de alto valor nutricional (SABBAG et al., 2018). Considera-se um setor produtor de alimentos importante e emergente (HOSAIN; LIANGYI, 2020), que continua a crescer em todo o mundo mais rapidamente do que outros setores importantes de produção animal (FAO, 2018).

Conforme a legislação brasileira Portaria IBAMA nº 145/98 art. 2º, a aquicultura é o cultivo ou criação de organismos que o ciclo de vida se dá inteiramente em meio aquático em ambiente confinado e controlado e é de interesse humano. Como: Piscicultura, criação de peixes; Carcinicultura, criação de camarões; Ranicultura, criação de rãs; Malacocultura, criação de moluscos; Algicultura, cultivo de algas; Quelonicultura, criação de tartarugas, cágados; Jacaricultura, criação de jacarés (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017). Com predominância para a atividade piscícola.

Na piscicultura, destaca-se o cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Apresenta-se como uma das espécies mais cultivadas no mundo, sendo a grande responsável pela expansão da atividade aquícola (FAO, 2018).

Caracterizada como espécie de águas tropicais (FAO, 2017), de crescimento rápido, facilidade de manuseio, adaptabilidade, principalmente em locais tropicais e subtropicais, onde tais condições climáticas são consideradas favoráveis para a reprodução (TAKISHITA et al., 2009; BRITO et al., 2017). Além disso, a tilápia apresenta grande adaptabilidade a diferentes tipos de cativeiro (FONDEPES, 2004), hábito alimentar onívoro (EL-SAYED, 2006), precocidade, prolificidade, tolerância a altas densidades, resistência a doenças e sua grande adaptação à policultura.

Os preços da alimentação para organismos aquáticos estão elevando dramaticamente, o que resultará no aumento do custo total necessário para a produção (EL BASUINI et al. 2016, HOSSAIN et al. 2016). Com isso, estratégias estão sendo aplicadas para substituir os ingredientes alimentares tradicionais por ingredientes não convencionais, que promovam o aumento da eficiência alimentar e a taxa de crescimento dos peixes, além de não causar danos ao meio ambiente (LARA-FLORES et al., 2003; YAMASHITA et al., 2015)

Entre esses alimentos, encontra-se os coprodutos das empresas alimentícias. Estima-se que o volume de coprodutos seja de, 18 a 28% na avicultura, 55% na bovinocultura, 48% na

suinocultura e 50 a 70% na piscicultura em relação ao peso do animal vivo (MULLEN et al., 2017; VILLAMIL et al., 2017)

Na avicultura, as penas representam 7-10% do peso corporal total das aves e constituem o material queratinoso mais abundante na natureza (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017). Grande quantidade deste material tem sido gerado como resíduo inevitável durante o processamento de aves (CALLEGARO; WELTER; DAROIT, 2018). Com isso, encontra-se a necessidade de buscar alternativas para agregar valor e reduzir os impactos ambientais causados por esse material.

As penas obtidas do processamento de abate de aves apresentam cerca de 80-90% de proteína, sendo que 85-90% dessa proteína bruta é formada por queratina (TESFAYE et al., 2017), um coproduto difícil de hidrolisar ou degradar devido à composição. Para utilizar a proteína das penas como um ingrediente para a nutrição animal, estas devem ser hidrolisadas através de processamento, o qual pode ser físico, químico (MUSTĂȚEA; UNGUREANU; IORGA, 2019) ou através de processos enzimáticos (MAZOTTO et al., 2017).

O processo enzimático ocorre sob condições de reação mais brandas e não requer a utilização de reagentes nocivos ao ambiente (MARTINEZ et al., 2020). Sendo assim, os hidrolisados de penas podem ser utilizados em substituição parcial ou total às fontes proteicas convencionais para diferentes espécies de hábito carnívoro e onívoro (PACHECO et al., 2016).

Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo utilizar o coproduto, hidrolisado de penas, na composição de dietas para tilápia do nilo, buscando avaliar seus efeitos nos parâmetros de desempenho produtivo, nas fases de larvas e alevinos.

Avicultura

Nos últimos anos a indústria avícola brasileira tem se destacado no mercado internacional, sendo o segundo tipo de carne mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da carne suína. De acordo com o IBGE (2020), o Brasil mantém em média uma produção anual de aproximadamente 5,7 bilhões de cabeças de frangos abatidos desde 2015 até 2019.

Em 2019, foram 5,81 bilhões de frangos abatidos, totalizando 13,57 milhões de toneladas de carcaças, ocupando assim o 3º lugar no ranking mundial de produção de carne de frango (IBGE, 2020).

Como o Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango no mundo (SCHMIDT e SILVA, 2018), os subprodutos do processamento das carcaças resultam em milhares de toneladas de matéria prima, uma vez que as vísceras representam cerca de 37 % do peso vivo (MEEKER, 2009).

O processamento de aves engloba desde a criação das aves, abate até a embalagem e armazenamento da carne. O processo leva à produção de subprodutos não comestíveis e comestíveis (TESFAYE; SITHOLE; RAMJUGERNATH, 2017). O abate tem como finalidade a remoção de componentes indesejáveis tais como sangue, pés, penas e vísceras e o retardo do desenvolvimento de microrganismos e diminuição da contaminação, especialmente patogênicos, tornando o alimento apto para consumo. Penas são os principais componentes dos subprodutos não comestíveis.

Penas contêm elevados teores de proteína (~90%, base seca), sendo constituídas basicamente por queratinas (DAROIT; BRANDELLI, 2014). As α -queratinas estão presentes em proporções superiores (41-67%) em relação à β -queratina (33-38%), e também estão presentes queratinas amorfas (LANGE et al., 2016). Esta composição confere às penas um caráter hidrofóbico e resistência frente a diversos fatores bióticos e abióticos (KORNILŁOWICZ-KOWALSKA; BOHACZ, 2011).

O alto teor de proteína das penas (90%, m/m) indica que estes subprodutos são potencialmente úteis para a produção de hidrolisados proteicos (LASEKAN et al., 2013), caracterizados como misturas complexas de peptídeos e aminoácidos resultantes da clivagem de ligações peptídicas em proteínas (HOU et al., 2017).

Aditivos dietéticos

Define-se como aditivos ingredientes não nutritivos, que são incluídos nas formulações para influenciar as propriedades físicas ou químicas das rações (BARROWS, 2000; COUTTEAU, 2016). O principal objetivo do uso de aditivos funcionais na aquicultura é não só melhorar a saúde dos organismos criados, mas também o desempenho zootécnico.

Entre as ações dos aditivos, encontra-se o melhoramento que eles causam no sistema digestório, onde afetam favoravelmente o melhoramento da morfologia dos intestinos, da atividade enzimática e do ambiente para o desenvolvimento da flora gastrointestinal.

Portanto, tornar eficientes a absorção de nutrientes, digestibilidade, eficiência alimentar, taxa de conversão do alimento e ganho de peso é também uma das principais razões do uso dos aditivos funcionais na aquicultura.

Para a alimentação animal, as dietas são suplementadas em pequenas quantidades (isoladamente ou em combinação) para uma finalidade específica, como melhorar a qualidade do peixe como produto final, preservar a qualidade física e química da dieta ou manter a qualidade do ambiente aquático (BAI et al. 2015).

Peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos são definidos como aminoácidos de comprimentos de cadeia curta de funcionalidades biológicas (LIMA e PEDRIALI MORAES, 2018; SANCHEZ e VAZQUEZ, 2017), compostas principalmente de 2-20 resíduos de aminoácidos (CHALAMAIAH et al., 2019).

Um peptídeo é apenas declarado como bioativo quando descoberto que confere benefício(s) a saúde. Alguns efeitos benéficos e desejáveis conhecidos dos peptídeos incluem efeitos antimicrobiano (YANG e YOUSEF, 2018), antioxidante (IBRAHIM, ISONO e MIYATA 2018), antitrombótico, anti-hipertensivo (SHOBAKO et al., 2018) e atividades imunomoduladoras (LOPEZ et al. 2016). Promovem propriedades funcionais não nutricionais nos alimentos, tais como solubilidade, retenção de água, retenção de óleo e capacidade emulsificante (FOH et al., 2010; HE et al., 2013; KHALED et al., 2014). Exercem atividades regulatórias nas funções corporais, reduzindo o risco de doenças ou aumentando uma determinada função fisiológica (HOU et al., 2017; KAUR et al. 2019).

Peptídeos bioativos podem ser liberados de suas sequências parentais por cinco formas, basicamente: a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, b) fermentação por cultivos microbianos, c) proteólise por enzimas provenientes de microrganismos ou plantas, d) durante o processamento de produtos alimentícios, e) hidrólise química, utilizando ácidos ou álcalis (KORHONEN & PIHLANTO, 2003; LORENZO et al., 2018).

In vitro, os peptídeos de alimentos podem ser liberados por hidrólise de proteínas com o uso de enzimas proteolíticas de grau alimentar e também durante o processamento de alimentos (cozimento, amadurecimento e fermentação), pequenos fragmentos de peptídeos bioativos podem ser obtidos em hidrolisados (ABDEL-HAMID et al. 2016).

Os peptídeos bioativos podem ser utilizados em dietas para animais de produção, atuando como promotores de crescimento (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015), inibidores da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) e inibidor da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (GHRIBI et al., 2015; NONGONIERMA, LALMAHOMED, PAOLELLA, & FITZGERALD, 2017; URAIPONG & ZHAO, 2018; VENUSTE ET AL., 2013). Além de serem uma forma simples de produzir alimentos funcionais, a geração e aplicação de peptídeos bioativos de diferentes fontes é uma forma eficaz de lidar com o excesso de subprodutos gerados pela indústria de alimentos (CORRÊA et al., 2011; FONTOURA et al., 2014; HALIM, YUSOF & SARBON, 2016; RYDER et al., 2016).

Possivelmente a forma mais vantajosa de gerar peptídeos bioativos é a hidrólise enzimática, uma vez que essa é mais específica, menos provável de gerar substâncias tóxicas e reduzir o valor nutricional das proteínas, além de ocorrer em condições mais brandas de pH e temperatura em comparação à hidrólise química (HIJAZIN, SIMÕES & SILVEIRA, 2010; LORENZO et al., 2018). Nesse contexto, o uso de enzimas hidrolíticas obtidas de microrganismos como forma de produzir peptídeos bioativos é uma tendência crescente (CORRÊA et al., 2014; BRANDELLI, SALA & KALIL, 2015; AGUILAR & SATO, 2018).

Hidrolisados proteicos

A importância das proteínas na dieta é amplamente certificada, uma vez que já se reconhece a relação entre dieta e saúde como um fator chave na prevenção e no combate a doenças e promoção do bem-estar. As proteínas são um dos componentes de alimentos mais importantes, especialmente aquelas provenientes de produtos de origem animal, como carne, leite e ovos, possuindo propriedades nutricionais, funcionais e biológicas diversas (TOLDRÁ et al., 2018). São componentes essenciais a todos os organismos, são integradas nas estruturas celulares e desempenham funções específicas como no caso de hormônios, anticorpos e enzimas (SILVA, 2017).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos por hidrólise enzimática, ácida ou biológica, de maneira a fornecer peptídeos e aminoácidos livres, os quais possuem propriedades nutricionais e funcionais (PASUPULETI & BRAUN, 2008; ALVES et al., 2020).

Os hidrolisados proteicos são utilizados como ingredientes na elaboração de cosméticos (HOU et al., 2011; PAIVA et al., 2015; SARMADI & ISMAIL, 2010; CARDOSO et al., 2020), produtos farmacêuticos, nutragênicos e alimentares (GUERARD et al., 2010; KRISTINSSON & RASCO, 2000; VILLAMIL et al., 2017), ou como fonte suplementar de nitrogênio para o crescimento de microrganismos (DERAZ, et al., 2011; DUFOSSÉ et al., 2001; FALLAH et al., 2015; GUERARD et al., 2001; PASUPULETI & BRAUN, 2008; VIEIRA, et al., 2005; VILLAMIL et al., 2017), apresenta ainda elevado teor de digestibilidade melhorando os valores de ganho de peso dos animais (BERGE e STOREBAKKEN, 1996), proporcionam respostas metabólicas e/ou fisiológicas capazes de reduzir o risco de doenças, além de proporcionar melhora na palatabilidade (VIOQUE et al., 2006), melhor qualidade física da ração (MARTONE et al., 2005; CARDOSO et al., 2020).

Podemos considerar o hidrolisado proteico um produto com considerável valor nutritivo para serem adicionados em rações para alimentação de organismos aquáticos. Portanto na atividade aquícola, os hidrolisados podem ser utilizados principalmente como suplementos

proteicos (CAHU et al., 1999; HEVRØY et al., 2005; ZHENG et al., 2014), atrativos e potencializadores de palatabilidade (BROGGI, 2014).

Essas propriedades do produto podem influenciar o aumento da atividade enzimática e da capacidade de absorção intestinal, resultando em melhores índices de digestibilidade e, conseqüentemente, beneficiando o crescimento, a sobrevivência e a imunidade inata dos peixes (LIAN et al., 2005; KOTZAMANIS et al., 2007; LEDUC et al., 2018).

Com isso, suas inclusões nas rações para peixes permitem melhorar a retenção de nitrogênio e estabilidade dos microrganismos probióticos no intestino (KRISTINSSON, 2000; ZHENG et al., 2014; KHORSAVI et al., 2015); atrativos alimentares, melhorando a palatabilidade e aumentando o consumo (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015); aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal, resultando em melhor aproveitamento dos nutrientes (ARIHARA, 2006; WOSNIAK et al., 2016); benefícios para a saúde de peixes (KOTZAMANIS et al., 2007; SHAHIDI & JANAK KAMIL, 2001; CHALAMAIAH et al., 2012).

Os hidrolisados são comumente utilizados como ingredientes proteicos em substituição à farinha de peixe, podendo substituir até 25% para espécies como *Dicentrarchus labrax* (CAHU et al., 1999), 15% para *Oreochromis niloticus* e 10% para *Pseudosciaena crocea* (TANG et al., 2008).

Como aditivo em dietas para peixes a inclusão hidrolisado de peixe melhorou o crescimento tanto em espécies de peixes onívoros (SILVA et al., 2017) como em peixes carnívoros (TANG et al., 2008; ZHENG et al., 2012). Em larvas de *Oreochromis niloticus* a suplementação de hidrolisado em níveis acima de 4% piorou o desempenho, porém aumentou a taxa de sobrevivência ao nível de 8%, dos demais tratamentos (SARY et al., 2017), e em juvenis da mesma espécie a inclusão não melhorou o desempenho produtivo (LEAL et al., 2010).

Lewandowski et al. (2013) ao avaliarem hidrolisados de carcaça de tilápia, fígado suíno e sardinha da alimentação de surubim do Iguçu (*Steindachneridion melanodermatum*), verificaram que inclusão desses coprodutos podem ser uma alternativa para aumentar o desempenho zootécnico dos animais.

Decarli et al. (2016) ressaltam efeitos positivos dos hidrolisados sobre o desempenho de jundiá (*Rhamdia voulezi*) cultivados em tanques-rede, sendo que o hidrolisado de fígado suíno apresentam os melhores resultados, seguido do hidrolisado de sardinha.

Carvalho et al. (1997) observaram melhorias no peso final de larvas de carpa alimentadas com dietas contendo hidrolisados proteicos de peixes.

Carvalho et al. (2020) observaram melhora no crescimento de alevinos de tilápia e melhora no metabolismo dos peixes alimentados com dietas contendo hidrolisado misto de farinha de vísceras de aves e fígado suíno.

Outros estudos relatam não observar efeitos positivos, porém, a adição dos hidrolisados não foi prejudicial, conforme destacado por Fries et al., (2011) para alevinos de kinguio, Lewandowski et al., (2013b) para larvas de bagre africano e Dieterich, (2014) para juvenis de pintado real.

Referências

- ABDEL-HAMID, M., GODA, H. A., DE GOBBA, C., JENSSEN, H., & OSMAN, A. 2016. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. **International Dairy Journal**, 61, 91-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.004>
- AGUILAR, J. G. DOS S.; SATO, H. H. 2018. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, 103, 253-262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- ALVES DRS, OLIVEIRA SR, LUCZINSKI TG, BOSCOLO WR, BITTENCOURT F, SINGNOR A, DETSCH DT. 2020. Attractability and palatability of liquid protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles. **Aquaculture Research**. 51:1681-1688. <https://doi.org/10.1111/are.14514>.
- ARIHARA, K. 2006. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat science**, 74(1), 219-229. DOI: [10.1016/j.meatsci.2006.04.028](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.028)
- BAI, S. C., KATYA, K., & YUN, H. 2015. Additives in aquafeed: an overview. **Feed and feeding practices in aquaculture**, 171-202. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00007-6>
- BARROWS, F.T. 2000. **Feed additives**. In STICKNEY, R.P. (ed.) Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. p. 335-340
- BERGE, G. M., & STOREBAKKEN, T. 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, 145(1-4), 205-212. DOI: [10.1016/S0044-8486\(96\)01355-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01355-5)
- BRANDELLI, A., SALA, L., & KALIL, S. J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, 73, 3-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>.
- BRITO, A. C.; SALES, E. M.; VITTORINO, F.; AQUILINO, M.; AKUTSU, M. 2017. Necessidade de Revisão dos Métodos de Avaliação do Desempenho Térmico de Edificações no Âmbito da Norma NBR 15575 e do SiNAT. In: Avaliação de Desempenho de Tecnologias Construtivas Inovadoras. ANTAC.
- BROGGI, J. 2014. **Hidrolisado proteico de sardinha (Clupeidae) como atrativo alimentar para o jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 49p. (Dissertação Mestrado). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- CAHU, C. L., INFANTE, J. Z., QUAZUGUEL, P., & LE GALL, M. M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. **Aquaculture**, 171(1-2), 109-119. DOI: [10.1016/S0044-8486\(98\)00428-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00428-1)

CALLEGARO, K. ; WELTER, N. ; DAROIT, D. J. . Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process biochemistry** , v. 75, p. 1-9, 2018.

CARDOSO, M. S., GODOY, A. C., OXFORD, J. H., RODRIGUES, R., DOS SANTOS CARDOSO, M., BITTENCOURT, F., & FEIDEN, A. 2021. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile tilapia. **Aquaculture**, 530, 735720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>

CHALAMAIAH, M., HEMALATHA, R., & JYOTHIRMAYI, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food chemistry**, 135, 3020-3038. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>.

CHALAMAIAH, M., ULUG, S. K., HONG, H., & WU, J. 2019. Regulatory requirements of bioactive peptides (*protein hydrolysates*) from food proteins. **Journal of Functional Foods**, 58, 123-129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050>

CORRÊA, A. P. F., DAROIT, D. J., COELHO, J., MEIRA, S. M., LOPES, F. C., SEGALIN, J., ... & BRANDELLI, A. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91(12), 2247-2254. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>.

CORRÊA, A. P. F., DAROIT, D. J., FONTOURA, R., MEIRA, S. M. M., SEGALIN, J., & BRANDELLI, A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, 61, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>

COUTTEAU, P. 2016. Functional feed additives to prevent disease in farmed shrimp. **Aquafeed**, 7, 24-27. DOI: [10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1)

DAROIT, D. J., & BRANDELLI, A. 2014. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical reviews in biotechnology**, 34(4), 372-384. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.794768>

DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ABD-ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. 2011. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* vish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal Microbiological**. New Delhi, v.51, n.2, p.171-175, 2011.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W.R.; BERTOLDO, M.T.P.; SILVA, V.S.N.; GONCALVES, G.S.; VIDOTTI, R.M. 2014. Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. v.1, n.3, p.56-61.

DUFOSSÉ, L., DE LA BROISE, D., & GUERARD, F. 2001. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current microbiology**, 42 32-38. DOI : <http://dx.doi.org/10.1007/s002840010174>.

EL-BASUINI, M. & EL-HAIS, A M A & DAWOOD, MAHMOUD & ABOU-ZEID, ADEL & ELDAMRAWY, SAAD & KHALAFALLA, MALIK & KOSHIO, SHUNSUKE & ISHIKAWA, MANABU & DOSSOU, SERGE. 2016. Effect of different levels of dietary copper nanoparticles and copper sulphate on growth performance, blood biochemical profiles, antioxidant status and immune response of Red Sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture**. 455. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.007> .

EL-SAYED, A. M. Tilapia culture. **Oxfordshire: Cabi publishing**, 2006.

FALLAH, M., BAHRAM, S., & JAVADIAN, S. R. 2015. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. **Food Science & Nutrition**, 3(2), 153-157. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.198>.

FAO. 2017. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2017** . Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. FAO: Roma.

FAO. 2018. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2018**. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. FAO: Roma.

FOH, MOHAMED & AMADOU, ISSOUFOU & FOH, BETTY & KAMARA, MOHAMED & XIA, WENSHUI. 2010. Functionality and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis. *International journal of molecular sciences*. DOI: <https://doi.org/11.1851-69.10.3390/ijms11041851> .

FONDEPES. 2004. Manual de Cultivo Suspendido de Concha de Abanico. **AECI. San Isidro**, Lima – Peru.

FONTOURA, R., DAROIT, D. J., CORREA, A. P., MEIRA, S. M., MOSQUERA, M., & BRANDELLI, A. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme-and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New biotechnology**, 31(5), 506-513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.07.002>.

GHRIBI, A. M., GAFSI, I. M., SILA, A., BLECKER, C., DANTHINE, S., ATTIA, H., ... & BESBES, S. 2015. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, 187, 322-330. DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.04.109](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109)

GUÉRARD, F., DECOURCELLE, N., SABOURIN, C., FLOCH-LAIZET, C., LE GREL, L., LE FLOC'H, P., ... & BOURSEAU, P. 2010. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. **Journal des sciences Halieutique et Aquatique**, 2, 21-27.

GUÉRARD, F., DUFOSSE, L., DE LA BROISE, D., & BINET, A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 11(4-6), 1051-1059. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00031-X)

HALIM, N. R. A., YUSOF, H. M., & SARBON, N. M. 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, 51, 24-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>

HE, S., FRANCO, C., & ZHANG, W. 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, 50(1), 289-297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>

HEVRØY, E. M., ESPE, M., WAAGBØ, R., SANDNES, K., RUUD, M., & HEMRE, G. I. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. **Aquaculture Nutrition**, 11(4), 301-313. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00357.x>

HIJAZIN, M. C. A. H., SIMÕES, A. T., & SILVEIRA, D. R. 2010. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Endereço para permuta**, 89.

HOSAIN, MOHAMMAD & XUE, LIANGYI. 2020. Impacts of probiotics on feeding technology and its application in aquaculture. **SDRP Journal of Aquaculture, Fisheries & Fish Science**. 3. 174-185. <https://doi.org/10.25177/JAFFS.3.1.RA.622> .

HOSSAIN, M.S.; DEARING, J.A.; RAHMAN, M.M.; SALEHIN, M. 2016. Recent changes in ecosystem services and human well-being in the Bangladesh coastal zone. *Reg. Environ. Chang.* 2016,16, 429.

HOU, Y., WU, Z., DAI, Z., WANG, G., & WU, G. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 8(1), 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020). Estatísticas sociais – **estimativas de população** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao.html>. Acesso em: 08/04/2020.

IBRAHIM, H. R., ISONO, H., & MIYATA, T. 2018. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. **Animal Nutrition**, 4(3), 273-280. DOI: [10.1016/j.aninu.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.004)

IRA, M. F. S., KIRSCH, L. D. S., & JESUS, R. S. D. 2015. Produção de hidrolisado proteico de pirarucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 45, 89-96. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632015v4529838>

KAUR, MANNAT & DE BOER, ROBERT & OATES, AMANDA & RAFFERTY, JOE & DEKKER, SIDNEY. 2019. Restorative Just Culture: a Study of the Practical and Economic Effects of Implementing Restorative Justice in an NHS Trust. **MATEC Web of Conferences**. DOI: <https://doi.org/273.01007.10.1051/matecconf/201927301007>

KHALED, M., & KHALED, R., & IHAB, A. (2014). Nanoencapsulation and nanoemulsion of bioactive compounds to enhance their antioxidant activity in food. **International Journal of Food Science & Technology (IJFST)**, 4. 1-22.

KHOSRAVI, S., BUI, H. T. D., RAHIMNEJAD, S., HERAULT, M., FOURNIER, V., JEONG, J. B., & LEE, K. J. 2015. Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Nutrition**, 21(3), 321-331. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12157>

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. **Current pharmaceutical design**, 9(16), 1297-1308. DOI: [10.2174/1381612033454892](https://doi.org/10.2174/1381612033454892)

KORNİŁŁOWICZ-KOWALSKA, T., & BOHACZ, J. 2011. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. **Waste management**, 31(8), 1689-1701. DOI: [10.1016/j.wasman.2011.03.024](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024)

KOTZAMANIS, Y. P., GISBERT, E., GATESOUBE, F. J., INFANTE, J. Z., & CAHU, C. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 147(1), 205-214. DOI: [10.1016/j.cbpa.2006.12.037](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.037)

KRISTINSSON, H. G., & RASCO, B. A. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of agricultural and food chemistry**, 48(3), 657-666. DOI: [10.1021/jf990447v](https://doi.org/10.1021/jf990447v)

LANGE, L., HUANG, Y., AND BUSK, P. K. 2016. Microbial decomposition of keratin in nature a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 100, 2083–2096. DOI: [10.1007/s00253-015-7262-1](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7262-1)

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN- MENDEZ, B.E. et al. 2003. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, n.1-4, p.193-201.

LEAL, A.L.G., CASTRO, P.F., LIMA, J.P.V., SOUZA CORREIA, E., SOUZA BEZERRA, R. 2010. Uso de hidrolisado protéico de camarão em rações de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Aquaculture international**. 18 (4), 635-646.

LEDUC, A., ZATYLNÝ-GAUDIN, C., ROBERT, M., CORRE, E., LE CORGUILLE, G., CASTEL, H., & HENRY, J. 2018. Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. **BMC genomics**, 19(1), 396. DOI: [10.1186/s12864-018-4780-0](https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0)

LEWANDOWSKI, V., BITTARELLO, A. C., PESSINI, J. E., SIGNOR, A., FEIDEN, A., & BOSCOLO, W. R. 2013. Hidrolisado proteico de tilápia na larvicultura de bagre africano, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Revista Cultivando o Saber**, 6(2), 172-177.

LEWANDOWSKI, V., DECARLI, J. A., DE ARAÚJO PEDRON, F., FEIDEN, A., SIGNOR, A., & BOSCOLO, W. R. 2013. Hidrolisados cárneos na alimentação do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 20(4). DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.008>

LIAN, P. Z., LEE, C. M., & PARK, E. 2005. Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. **Journal of agricultural and food chemistry**, 53(14), 5587-5592. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf050402w>

LIMA, T. N., & PEDRIALI MORAES, C. A. 2018. Bioactive peptides: applications and relevance for cosmeceuticals. **Cosmetics**, 5(1), 21. DOI: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010021>

LOPEZ-OSORIO, FEDERICO & PICKETT, KURT & CARPENTER, JAMES & BALLIF, BRYAN & AGNARSSON, INGI. 2016. supplementary. 49-54.

LORENZO, J. M., MUNEKATA, P. E., GÓMEZ, B., BARBA, F. J., MORA, L., PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C., & TOLDRÁ, F. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. **Trends in Food Science & Technology**, 79, 136-147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>.

MARTINEZ, J. P. O.; CAI, G.; NACHTSCHATT, M.; NAVONE, L.; ZHANG, Z.; ROBINS, K.; SPEIGHT, R. 2020. Challenges and Opportunities in Identifying and Characterising Keratinases for Value-Added Peptide Production. **Catalysts**, v. 10, 184.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O., CHAMORRO, S., & BRENES, A. 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, 73, 204-212. DOI: [10.1016/j.foodres.2015.04.005](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005)

MARTONE, C. B., BORLA, O. P., & SÁNCHEZ, J. J. 2005. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource technology**, 96(3), 383-387. DOI: [10.1016/j.biortech.2004.04.008](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.008)

MAZOTTO, ANA & ASCHERI, JOSE LUIS & GODOY, RONOEL & DAMASO, MÔNICA & COURI, SONIA & VERMELHO, ALANE. 2017. Production of feather protein hydrolyzed by *B. subtilis* AMR and its application in a blend with cornmeal by extrusion. **LWT - Food Science and Technology**. 84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.077> .

MEEKER, D.L. 2009. North American Rendering: processing high quality protein and fats for feed. **Revista Brasileira de Zootecnia**.38(SPE), 432-440. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300043>

MULLEN, A. M.; ÁLVAREZ, C.; ZEUGOLIS, D. I.; HENCHION, M.; O'NEILL, E.; DRUMMOND, L. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, v. 132, p.90-98, october. 2017.

MUSTĂȚEA, G. ; UNGUREANU, E. L.; IORGA, E.. 2019. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food – progress over time: a short review. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, vol. 26, 2019, pp. 81-87

NONGONIERMA, A. B., LALMAHOMED, M., PAOLELLA, S., & FITZGERALD, R. J. 2017. Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. **Food chemistry**, 231, 202-211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.123>

PACHECO, G. F. E.; PEZZALI, J. G.; KESSLER, A. M.; TREVIZAN, L. 2016. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.45(6), p.288-294.

PASUPULETI, V. K., & BRAUN, S. 2008. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. **Protein hydrolysates in biotechnology**, 11-32. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_2

RYDER, K., BEKHIT, A. E. D., MCCONNELL, M., & CARNE, A. 2016. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food chemistry**, 208, 42-50. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.03.121](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.121)

SABBAG A, LYRA ML, ZAMUDIO KR, HADDAD CF, FEIO RN, LEITE FS, GASPARINI JL AND BRASILEIRO CA. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 122:142-156

SÁNCHEZ, A., & VÁZQUEZ, A. 2017. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, 1(1), 29-46. DOI: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

SARMADI, B. H., & ISMAIL, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, 31(10), 1949-1956. DOI: [10.1016/j.peptides.2010.06.020](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020)

SARY, C., PARIS, L.D.D., BERNARDI, D.M., LEWANDOWSKI, V., SIGNOR, A., BOSCOLO, W.R. 2017. Tilapia by-product hydrolysate powder in diets for Nile tilapia larvae. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. 39, 1-6. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i1.32805>

SCHMIDT, N.S., SILVA, C.L.D. 2018. Pesquisa e desenvolvimento na cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. 56(3), 467-482. DOI: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560307>

SCHULTER, E. P.; VIEIRA, F., JOSÉ, E. R..2017. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Disponível em: <

https://www.econstor.eu/bitstream/10419/177544/1/td_2328.pdf >. Acesso em: 30. Mar.2019.

SHAHIDI, F., & KAMIL, Y. J. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 12(12), 435-464. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00021-3)

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**, v.52, p.485-492. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000700002>

TAKISHITA, S.S.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L. 2009. Níveis de lisina digestível em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2099-2105.

TANG, H.G., WU, T.X., ZHAO, Z.Y., PAN, X.D., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). **Journal of Zhejiang University Science B**. 9(9), 684-690. DOI: doi: 10.1631/jzus.B0820088

TESFAYE, KINDIE & P H, ZAIDI & GBEGBELEGBE, SIKI & BOEBER, CHRISTIAN & RAHUT, DIL & GETANEH, FITE & KALIYAMOORTHY, SEETHARAM & ERENSTEIN, OLAF & STIRLING, CLARE. 2017. Climate change impacts and potential benefits of heat-tolerant maize in South Asia. **Theoretical and Applied Climatology**. 130. <https://doi.org/959-970.10.1007/s00704-016-1931-6> .

TESFAYE, T., SITHOLE, B. AND RAMJUGERNATH, D. 2017. Valorisation of Chicken Feathers: A Review on Recycling and Recovery Route—Current Status and Future Prospects. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 19, 2363-2378. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1443-9>

TESFAYE, T., SITHOLE, B., & RAMJUGERNATH, D. 2017. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 19(10), 2363-2378. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1443-9>

TOLDRÁ, F., REIG, M., ARISTOY, M. C., & MORA, L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, 267, 395-404. DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.06.119](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119)

URAIPOONG, C., & ZHAO, J. 2018. In vitro digestion of rice bran proteins produces peptides with potent inhibitory effects on α -glucosidase and angiotensin I converting enzyme. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98(2), 758-766. DOI: [10.1002/jsfa.8523](https://doi.org/10.1002/jsfa.8523)

VENUSTE, M., ZHANG, X., SHOEMAKER, C. F., KARANGWA, E., ABBAS, S., & KAMDEM, P. E. 2013. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. **Food & function**, 4(5), 811-820. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3FO30347K>

- VIEIRA, G. H., VIEIRA, R. H., MACRAE, A., & SOUSA, O. V. 2005. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85(7), 1235-1237. DOI: [10.1002/jsfa.2161](https://doi.org/10.1002/jsfa.2161)
- VILLAMIL, O., VÁQUIRO, H., & SOLANILLA, J. F. 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, 224, 160-171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- VILLAMIL, OSCAR & VÁQUIRO, H. & SOLANILLA DUQUE, JOSÉ FERNANDO. 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**. 224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057> .
- VIOQUE, J., PEDROCHE, J., YUST, M. M., LQARI, H., MEGÍAS, C., GIRÓN-CALLE, J., & MILLÁN, F. 2006. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, 16, 99-102.
- 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(5), 957-966. DOI: <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue5-fulltext-8>.
- YAMASHITA, MASAHIRO & KAWATO, MITSUO & IMAMIZU, HIROSHI. 2015. Predicting learning plateau of working memory from whole-brain intrinsic network connectivity patterns. **Scientific reports**. 5. <https://doi.org/10.1038/srep07622> .
- YANG, X., & YOUSEF, A. E. 2018. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. **World journal of microbiology and biotechnology**, 34(4), 1-10. DOI: [10.1007/s11274-018-2437-4](https://doi.org/10.1007/s11274-018-2437-4)
- 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(3),297-303 DOI:[10.1111/j.1365-2095.2011.00896](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00896).
- ZHENG, K., XU, T., QIAN, C., LIANG, M., & WANG, X. 2014. 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(4), 372-380. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12090>

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a inclusão de proteína hidrolisada de penas (PHP) em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre os aspectos de desempenho produtivo, histológico e enzimático em diferentes fases de cultivo.

Objetivos específicos

- Verificar o desempenho produtivo de larvas e alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes níveis de proteína hidrolisada de penas;
- Avaliar os aspectos histológicos de larvas e alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes níveis de proteína hidrolisada de penas;
- Verificar as ações das enzimas digestivas e antioxidantes em larvas e alevinos de tilápia do Nilo alimentados com diferentes níveis de proteína hidrolisada de penas.

CAPÍTULO 2

HIDROLISADO PROTEICO DE PENAS EM DIETA PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a influência do hidrolisado proteico de penas no desempenho zootécnico de larvas de tilápia do Nilo. O experimento foi conduzido durante 15 dias, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo. Utilizou 2.520 exemplares de *Oreochromis niloticus* com peso inicial médio de $\mu = 0,017 \pm 0,002$ g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 21 caixas polietileno (7 tratamentos/3 repetições), totalizando 120 animais por unidade experimental. As rações foram formuladas de maneira a conterem 40% de proteína bruta, com níveis de inclusão de proteína hidrolisada de penas, sendo: T₁: 0% (Controle), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5% e T₇: Controle comercial. Ao final do experimento, verificaram-se os parâmetros de desempenho produtivo e histológico. A inclusão de hidrolisado proteico de penas nas dietas melhorou aspectos zootécnicos de pós-larvas de tilápia do Nilo. Tal fato pode ser atribuído pela elevada frequência alimentar, tempo experimental, excesso de proteína ou o desbalanço nutricional das dietas ofertadas. Recomenda-se a inclusão de 2% do referido produto para melhor desempenho produtivo nessa fase de criação, no entanto, deve-se fazer o acompanhamento das respostas metabólicas em função do tempo de fornecimento da dieta.

Palavras-chave: aquicultura, exigências nutricionais, nutrientes, piscicultura.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the influence of feather protein hydrolyzate on the zootechnical performance of Nile tilapia larvae. The experiment was conducted for 15 days at the State University of West Paraná, Toledo. It used 2,520 specimens of *Oreochromis niloticus* with a mean initial weight of $\mu = 0.017 \pm 0.002$ g. The animals were randomly distributed in 21 polyethylene boxes (7 treatments/3 replications), totaling 120 animals per experimental unit. The rations were formulated to contain 40% crude protein, with levels of hydrolyzed feather protein inclusion, as follows: T₁: 0% (Control), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5% and T₇: Commercial control. At the end of the experiment, the parameters of productive and histological performance were verified. The inclusion of feather protein hydrolyzate in the diets improved the zootechnical aspects of Nile tilapia post-larvae. This fact can be attributed to the high food frequency, experimental time, excess protein or the nutritional imbalance of the diets offered. The inclusion of 2% of the product is recommended for better productive performance in this breeding phase, however, metabolic responses should be monitored as a function of the time of diet supply.

Keywords: aquaculture, nutritional requirements, nutrients, fish farming.

Introdução

O Brasil é um grande produtor de carne de frango, sendo que no ano de 2018 cerca de 5,7 bilhões de frangos foram abatidos em frigoríficos brasileiros inspecionados, totalizando 13,51 milhões de toneladas de carcaças (IBGE, 2019). Enquanto no ano de 2020 foram produzidos 13,9 milhões de toneladas de frangos. As projeções para 2021 sugerem diferença superior a 5% (AVISITE, 2021).

O aumento da produção de frangos de corte resulta na elevação da quantidade de coprodutos gerados durante o processo de abate e apenas a carcaça é valorizada comercialmente. O aproveitamento integral desses coprodutos com uma tecnologia inovadora, através do processamento e industrialização, reveste-se de uma grande importância econômica, pois agrega valor à toda cadeia produtiva (LAFARGA; HAYES, 2014; MARTÍNEZ-ALVAREZ; CHAMORRO; BRENES, 2015).

Entre os coprodutos resultantes das indústrias processadoras de frangos, encontra-se as penas, sendo considerada uma matéria prima que podem ser utilizadas em dietas como fontes de proteína na nutrição animal.

As penas são caracterizadas por conter um elevado teor de queratina, sendo que alguns animais, como o peixe, não conseguem digerir esse material e nem aproveitar seus nutrientes na forma com que a mesma se apresenta. Portanto, o processamento das penas com o uso de tecnologias, principalmente através de calor e pressão, modifica-se a estrutura da queratina, quebrando-o as pontes de dissulfeto, tornando as proteínas e os aminoácidos disponíveis e de fácil absorção.

Entre as tecnologias disponíveis encontra-se a hidrólise enzimática, que também pode gerar peptídeos biologicamente ativos (KIM; WIJESEKARA, 2010), que podem influenciar em melhora de performance dos peixes e em melhora na hematologia (LORENZ et al., 2018), bioquímica sanguínea (BAE et al., 2019), saúde e imunologia (GISBERT et al., 2018), aproveitamento metabólico (FABREGAT et al., 2016; VENTURIN et al., 2016), morfometria intestinal (WOSNIAK et al., 2016) e na microbiota gastrointestinal e excreção de enzimas intestinais (HA et al., 2019).

As penas são constituídas de aproximadamente 1% de gordura, 9% água e 90% de proteínas estruturais, sendo estas as queratinas (DAROIT & BRANDELLI, 2014). Devido a sua composição, as penas podem ter um grande potencial como fonte de proteína e aminoácidos para a alimentação animal. Estruturalmente as penas são compostas por 41-67% de α -

queratinas, 33-38% de β -queratinas e queratinas amórficas que estão presentes em quantidades menores (LANGE et al., 2016).

Os hidrolisados de penas podem ser utilizados em substituição parcial ou total às fontes proteicas convencionais para diferentes espécies de hábito carnívoro e onívoro (PACHECO et al., 2016). Os hidrolisados de penas, quando processados de modo convencional combinados ou não com complexo enzimático, possuem baixo peso molecular, com aproximadamente 95% das moléculas menores do que 10.000 Da e 50% menores do que 500 Da (PACHECO et al., 2016).

De forma geral, os coprodutos podem compor formulações em dietas para tilápias (SOUSA et al., 2018). Esses coprodutos da aviculturas poderão ser considerados atrativos para produtores em função a sua disponibilidade e baixo custo (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al. 2015).

Diante disto, este trabalho tem como objetivo avaliar o desenvolvimento larval, histológico e enzimático de tilápia do Nilo alimentados com proteínas hidrolisadas de penas.

Metodologia

A presente pesquisa foi realizada 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, nos meses de janeiro e fevereiro de 2019, com duração de 15 dias. Os procedimentos adotados na condução desta pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 45-19 CEUA).

Utilizou-se 2.520 exemplares com peso inicial médio de $\mu = 0,017 \pm 0,002$ g e comprimento médio de $\mu = 1,017 \pm 0,002$ cm. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 21 caixas de polietileno com capacidade para 210 litros, em sete tratamentos com três repetições, totalizando 120 animais por unidade experimental.

A proteína hidrolisada de penas (PHP) foi fornecida pela empresa Brasil Foods S / A (sector BRF[®] Ingredientes), foram obtidos enzimaticamente, e o seu grau de hidrólise (15% para penas), percentagem de ligações peptídicas clivadas, foi determinada pelo método *orthoformaldehyde* (NIELSEN, 2001) (Tabela 1).

Foram elaboradas seis dietas experimentais, sendo uma a dieta basal (sem inclusão de PHP) (T₁), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5% de inclusão de PHP além de uma ração comercial (controle negativo) (T₇), utilizada nos sistemas de criação para a fase larval. Ambas formuladas de maneira a atenderem os valores nutricionais recomendados para a espécie, na

fase de desenvolvimento em que se encontram, tendo como base os dados apresentados no NRC (2011) e por Furuya et al. (2010) (Tabela 2).

Tabela 1. Composição química da proteína hidrolisada de penas (matéria seca como linha de base)

Composição química		Ingrediente alternativo
		Proteína hidrolisada de penas
Matéria seca (g.kg ⁻¹) ^a		962,74
Proteína bruta (g.kg ⁻¹) ^a		763,33
Gordura bruta (g.kg ⁻¹) ^a		26,12
Energia bruta (kJ.g ⁻¹) ^a		20,52
Aminoácidos essenciais (EAA) (g.kg ⁻¹) ^{bc}		
Arginina		48,6
Histidina		7,16
Isoleucina		37,91
Leucina		63,66
Lisina		20,04
Metionina		6,95
Fenilalanina		38,63
Treonina		32,50
Triptofano		4,25
Valina		80,28
EAA total		339,98
Aminoácidos não essenciais (NEAA) (g.kg ⁻¹) ^b		
Ácido aspártico		57,43
Ácido glutâmico		83,61
Alanina		37,59
Cistina		20,98
Glicina		60,65
Prolina		73,74
Serina		77,48
Taurina		1,45
Tirosina		25,13
Total NEAA		438,06
Aminoácidos totais		778,04

Tabela adaptada.

Fonte: Marjana dos Santos Cardoso et al. (2021).

^aValores determinados no Laboratório de Análise de Alimentos (LQA) -Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura - GEMAQ-Unioeste, Toledo-PR.

^bLaboratório Comercial (CBO Análises Laboratoriais Ltda., Valinhos-SP, Brasil.

^cValores da análise realizada em triplicata.

Tabela 2. Composição percentual das rações experimentais com proteína hidrolisada de penas usadas com larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), baseada na matéria seca.

Ingredientes	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Soja farelo	441,03	436,10	431,16	426,23	421,30	416,36
Víscera farinha	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Trigo farelo	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00
Peixe farinha	150,00	140,00	130,00	120,00	110,00	100,00
Milho grão	52,56	55,14	57,72	60,30	62,88	65,46
PHP	0,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
Óleo de soja	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Fosfato bicálcico	0,43	1,78	3,12	4,47	5,82	7,16
Sal comum	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Premix	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Calcário	0,00	0,91	1,82	2,74	3,65	4,56
Vitamina C	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86
Colina	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Antifúngico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
DL-metionina	0,33	0,42	0,52	0,61	0,70	0,80
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-treonina	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,10
TOTAL	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
Níveis Nutricionais						
Cálcio (%)	2,18	2,18	2,18	2,18	2,17	2,17
ED tilápia (Kcal/ kg)	3418,17	3416,07	3413,98	3411,89	3409,79	3407,69
Fenil Total (%)	1,92	1,92	1,92	1,93	1,93	1,93
Fenil + Tir. Total (%)	2,69	2,73	2,76	2,80	2,84	2,87
Fosforo total (%)	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
Gordura (%)	8,62	8,56	8,50	8,44	8,38	8,32
Histidina Total (%)	0,97	0,96	0,95	0,94	0,93	0,93
Isoleucina Total (%)	1,77	1,77	1,78	1,78	1,79	1,79
Leucina Total (%)	3,11	3,11	3,12	3,13	3,14	3,14
Lisina Total (%)	2,51	2,48	2,46	2,43	2,41	2,38
Metionina Total (%)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Proteína bruta (%)	42,37	42,37	42,38	42,38	42,38	42,39
P. Digestível Peixes (%)	38,60	38,60	38,60	38,60	38,60	38,60
Treonina Total (%)	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Triptofano Total (%)	0,48	0,47	0,47	0,47	0,47	0,46
Valina Total (%)	2,01	2,08	2,11	2,15	2,18	2,21
Vitamina C (mg/kg)	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99

Níveis de garantia por quilograma do produto: vit. A -500.000 UI; vit. D3-200.000 UI; vit. E -5.000 mg; vit. K3-1.000 mg; vit. B1-1.500 mg; vit. B2-1.500 mg; vit. B6-1.500 mg; vit. B12-4.000 mg; ácido fólico -500 64mg; pantotenato de cálcio -4.000 mg; vit. C -15.000 mg; biotina -50 mg; inositol -10.000 mg; nicotinamida -7.000 mg; 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.

Todos os ingredientes foram inicialmente moídos e peneirados (0,3 mm) em um moinho de martelos (modelo MCs 280, Vieira Moinhos e Martelo, Tatuí-SP, Brasil), umedecidos com

20% de água e homogeneizados, seguido de um período de mistura de 15 minutos em um misturador mecânico do tipo “Y” (modelo MA 200, Marconi Equipamentos Laboratórios, Piracicaba-SP, Brasil). As dietas foram extrusadas em matriz de 1,0 mm de diâmetro em um equipamento modelo Ex-Micro com capacidade de 10 kg.h⁻¹ (Exteec Máquinas, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

Após a extrusão, as dietas foram colocadas em estufa de recirculação de ar por 24 horas a 55 °C (modelo TE-394/3-D, Tecnal Equipamentos Científicos para Laboratórios, Piracicaba-SP, Brasil). Posteriormente a secagem (55 °C por 24 h), incorporou-se o óleo, na forma de banho com auxílio de pulverizador manual. As dietas foram armazenadas em câmara fria (4 °C) até sua utilização.

Efetivou-se o arraçoamento *ad libitum* seis vezes ao dia (08h00, 10h00, 12h00, 14h00, 16h00 e 18h00). Ao final do dia, as excretas e restos alimentares e filtros foram sifonados.

As dietas foram submetidas à análise de composição centesimal de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2004), exceção da energia bruta, que foi determinada com o auxílio de uma bomba calorimétrica (IKA[®]C2000). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) do GEMaQ (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química das dietas experimentais e animais experimentais alimentados proteína hidrolisada de penas (com base na matéria seca)

Ração								
Parâmetros	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	P-VALOR
¹ PB	44,60 ± 1,03	44,46 ± 2,22	45,12 ± 1,67	44,58 ± 2,23	45,19 ± 1,97	45,02±2,48	44,11±1,32	ns
² MS	92,13 ± 0,70 ^b	95,11 ± 0,71 ^a	93,22 ± 0,57 ^b	95,03 ± 0,69 ^a	92,95 ± 0,67 ^b	95,34 ± 0,70 ^a	94,93 ± 0,50 ^a	*
³ MM	14,36 ± 0,02 ^{ab}	14,52 ± 0,03 ^{ab}	14,44 ± 0,01 ^{ab}	14,63 ± 0,01 ^a	14,63 ± 0,10 ^b	14,26 ± 0,21 ^a	14,38 ± 0,08 ^{ab}	*
Peixe								
⁴ MS	95,11 ± 0,47	95,19 ± 1,64	95,35 ± 0,1,14	94,83 ± 0,98	95,48 ± 0,95	94,18 ± 2,27	95,38 ± 0,38	ns
⁵ PB	64,24 ± 1,61	64,47 ± 1,37	64,02 ± 0,20	65,06 ± 1,18	66,40 ± 0,46	65,73 ± 1,49	64,39 ± 0,79	ns

¹PB: Proteína Bruta; ²MS: Matéria Seca; ³MM: Matéria Mineral. *Valores médios seguidos por letra minúscula diferente, na mesma linha, indicam efeito significativo (P<0,05). Médias seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05). ns – não significativo. * – significativo.

O sistema experimental foi equipado com recirculação de água, filtro mecânico, sistema de aeração e aquecimento constante e sifonamento diário. Durante o período experimental foram monitorados semanalmente os parâmetros de qualidade de água utilizando o multiparâmetro portátil (modelo YSI-PRO PLUS).

As variáveis físico-químicas da água monitoradas, como: Temperatura ($\mu = 29,50 \pm 0,20$ °C), O.D ($\mu = 6,70 \pm 0,45$ mg/L), condutividade elétrica ($\mu = 286,81 \pm 11,58$) e pH ($\mu = 6,95 \pm 0,05$), mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos como satisfatórios para o cultivo de peixes tropicais de água doce (ARANA, 2004).

Após 15 dias de manejo, os exemplares foram mantidos em jejum por uma hora, posteriormente anestesiados com 100 mg de benzocaína/L (OKAMURA et al., 2010) para a determinação de medidas individuais de peso (g), comprimento total (cm) e cinco desses, foram eutanasiados em solução de benzocaína 200 mg.L⁻¹ (GOMES et al., 2001), para a coleta de material da cavidade celomática (intestino e fígado) para futuras análises.

A tomada de medidas e os cálculos para o desempenho produtivo foram determinados de acordo com o NRC (2011). Sendo:

Equação 1

- Ganho em peso (GP): Pf (peso final); Pi (peso inicial).

$$GP (g) = \frac{Pf}{Pi}$$

Equação 2

- Ganho em peso diário (GPD): GP (ganho de peso); Nd (número de dias do experimento)

$$GP (g) = \frac{GP}{Nd}$$

Equação 3

- Taxa de crescimento específico (TCE): lnPf (log natural do peso final); lnPi (log natural do peso inicial); Nd (número de dias do experimento).

$$TCE = \left[\frac{(\ln Pf - \ln Pi)}{Nd} \right] * 100$$

Equação 4

- Conversão alimentar aparente (CAA): CDR (consumo de ração total); GPT (ganho de peso total).

$$CAA = \left[\frac{CDR}{(GP * Nf)} \right]$$

Equação 5

- Taxa de eficiência proteica (TEP (%)): CDR (consumo de ração total); GPT (ganho de peso total); PB (proteína bruta da dieta teste).

$$TEP (\%) = \left[\frac{(GP * Nf)}{(CDR * PB)} \right]$$

Equação 6

- Índice hepatossomático

$$IHS (\%) = [\text{peso do fígado (g)} * 100 / \text{peso final (g)}]$$

Equação 7

- Peso relativo do intestino

$$PRI (\%) = (\text{peso do intestino (g)} / \text{peso do peixe (g)} * 100)$$

Equação 8

- Sobrevivência (S (%)): Nf (número de peixes final); Ni (número de peixe inicial).

$$S (\%) = \frac{Nf * 100}{Ni}$$

Para as análises histomorfométricas das vilosidades intestinais, cinco peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados em solução de benzocaína 200 mg.L⁻¹, após 24 horas de jejum (GOMES et al., 2001), sendo retirado um segmento transversal da porção medial dos intestinos de cada peixe, posteriormente foram fixados em solução de Alfac durante 6 horas, em seguida foram conservadas em álcool 70° para retirada do fixador até serem processadas. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos por secções seriadas de 7 µm e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e alcian blue (AB) pH 2,5. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz mensurando segundo a altura dos vilos (distância do topo das vilosidades ao início da camada muscular), largura dos vilos (distância do topo de um enterócito ao topo do enterócito do lado oposto), espessura da túnica (distância total da camada muscular circular e longitudinal), e número total de vilos, na lente objetiva de 40X, pelo software cellSens Standard 1.15®.

Para as amostras de fígado, os hepatócitos foram quantificados em lente objetiva de 40X e seus diâmetros, área e volume foram tomados com o auxílio de lente objetiva de 100X (50 núcleos de hepatócitos por lâmina). Em ambas análises, utilizou-se o software cellSens Standard 1.15® para obtenção das imagens e posterior avaliação.

Foram realizadas medidas do perímetro do núcleo do hepatócito (µm) e área (µm²), volume nuclear do hepatócito ($H_{nv}(\mu\text{m}^3) = 4/3 \pi r^3$), onde o *r* corresponde ao raio nuclear. As mensurações foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagem Image Pro Plus® (version 4.5, Media Cybernetics, USA) e Fiji ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>) (SCHINDELIN et al. 2012).

A avaliação qualitativa de vacuolização hepática foi realizada de acordo com critérios estabelecidos por Caballero et al. (2004) e Tessaro et al. (2014). Foi atribuído um *escore* de

vacuolização, onde 0= não observado, 1= poucos vacúolos, 2= vacuolização média, 3= vacuolização severa.

Posteriormente às análises supracitadas, mantiveram-se os peixes nas unidades experimentais por mais 15 dias, para a avaliação do estresse ao ar. Utilizou-se uma peneira de 0,5 mm de diâmetro, submerso em água para evitar lesões pelo contato direto com a malha da peneira, sendo retirada da água, coberta com uma tela para evitar a evasão e colocada em papel secante para retirar o excesso de umidade. A partir deste momento, os animais permaneceram sete minutos em exposição ao ar. A taxa de resistência ao estresse (Re em %) foi determinada com base na porcentagem de sobrevivência. Para calcular essa taxa, foram contados os animais vivos de todas as repetições de cada tratamento.

Para fins estatísticos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de *Levine*, para médias homogêneas submeteu-se a *one-way* (ANOVA) com posterior teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância. Para dados que não atenderam ao pressuposto de homogeneidade procedeu-se a análise de *Kruskal-Wallis*. Foi utilizado o programa estatístico computacional *Statistic 7.1* (2005).

Resultados e discussão

A inclusão do ingrediente teste, proteína hidrolisada de penas, influenciou a performance produtiva das larvas de tilápia do Nilo ($p < 0,05$) após 15 dias experimentais. Exceto os índices viscerossomáticos (CI, IHS e PRI). Não observou-se mortalidade durante o período experimental. (Tabela 4).

Vinte e quatro horas após a exposição do estresse ao ar, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram mortalidade dos exemplares, apresentando um percentual de mortalidade de 6,67%; 53,33%; 46,67%; 36,67%; 36,67%; 33,33% e 16,67% respectivamente.

A inclusão de 2% de ingrediente teste (PHP) nas dietas apresentou melhores resultados quando comparados aos demais tratamentos experimentais. Salienta-se que a ração com 2% de inclusão de PHP proporcionou 29,3% e 39,2% de ganho em peso comparada aos tratamentos controle e controle comercial.

Tabela 4. Valores de desempenho produtivo, índices hepatossomático (IHS), índice viscerossomático (IVS) e comprimento do intestino médios de larvas de tilápia do Nilo, alimentadas com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 15 dias de cultivo.

Parâmetro	Tratamentos							p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
¹ PMI (g)	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,002	ns
² GP (g)	1,64 ± 0,32 ^b	1,96 ± 0,48 ^b	2,32 ± 0,31 ^a	1,88±0,11 ^b	2,30±0,01 ^a	1,98±0,08 ^b	1,41±0,15 ^b	*
³ GPD (g dia-1)	0,11 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,03 ^b	0,15 ± 0,02 ^a	0,12±0,01 ^b	0,15±0,01 ^a	0,13±0,01 ^b	0,11±0,02 ^b	*
⁴ CAA	1,47 ± 0,24 ^b	1,24 ± 0,31 ^b	1,02 ± 0,15 ^a	1,23±0,08 ^b	0,99±0,05 ^a	1,18±0,05 ^a	1,65±0,16 ^b	*
⁵ TEP (%)	1,65 ± 0,29 ^{ab}	2,00 ± 0,55 ^{ab}	2,37 ± 0,33 ^a	1,94±0,12 ^{ab}	2,40±0,12 ^a	2,02±0,08 ^{ab}	1,45±0,12 ^c	*
⁶ TCE	3,87 ± 0,77 ^{ab}	4,62 ± 1,14 ^{ab}	5,49 ± 0,73 ^a	4,45±0,26 ^{ab}	5,45±0,21 ^a	4,67±0,19 ^{ab}	3,32±0,36 ^b	*
⁷ CT (cm)	3,35 ± 0,25 ^a	3,73 ± 0,34 ^{ab}	4,03 ± 0,22 ^{ab}	3,80±0,16 ^{ab}	4,09±0,03 ^b	3,85±0,08 ^{ab}	3,44±0,41 ^{ab}	*
Índice Viscerosomático								
⁸ CI (cm)	13,19±2,48	12,29±2,78	10,59±1,72	12,90±2,23	9,88±0,45	11,81±0,92	15,01±1,52	ns
⁹ IHS (%)	4,16±1,31	4,56±1,30	3,68±0,72	4,34±0,31	3,53±0,27	4,46±1,13	4,74±0,31	ns
¹⁰ PRI (%)	14,38±4,18	13,84±0,03	12,47±0,25	15,23±2,60	11,14±0,87	12,73±1,74	16,23±1,43	ns

NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tal fato pode relacionar-se devido as larvas de tilápia do Nilo apresentarem velocidades de crescimento mais acelerado e demandar maior concentração de nutrientes de fácil absorção para potencializar seu desempenho nessa fase de cultivo. Além da possível aceitabilidade das lavas para com as dietas com a inclusão de PHP, associando-se a uma boa palatabilidade, digestibilidade, atribuída à presença dos aminoácidos livres que pode atuar como intensificador de sabor e atrativo alimentar.

A maioria dos hidrolisados proteicos resultam em uma maior retenção de proteína e energia no organismo do animal, conseqüentemente, maiores índices nas variáveis de crescimento, como o demonstrado no presente estudo (HEVROY et al., 2005)

Na presente pesquisa, os animais experimentais não sofreram alterações significativas na histomorfometria intestinal, incluindo altura dos vilos, larguras de vilos, espessura da túnica e número de vilos (p>0,05) (Tabela 5). Assim, compreende-se que o PHP não interferiu negativamente nas características morfológicas intestinais.

A histomorfometria intestinal é uma boa indicação da capacidade dos peixes de digerir e absorver nutrientes no trato digestório (X. TAN, et al. 2018; C. TORNO, et al. 2018). Segundo Baldisseroto (2002) as pregas têm a finalidade de aumentar a área de absorção intestinal, o aumento de densidade das vilosidades do intestino também é considerado como fator positivo (SILVA et al. 2010; SIDDIK et al. 2019).

Na presente pesquisa, observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) no diâmetro do núcleo (μm), área do núcleo (μm), raio do núcleo (μm) e volume do núcleo (μm), exceto nos números dos hepatócitos. (Tabela 5). Sendo as principais diferenças analisadas e a menor inclusão (1%) com a maior inclusão do ingrediente teste (5%).

Bolla et al. (2011), afirma que mudanças no fígado revelam informações do estado nutricional dos peixes. A composição das dietas, como proteínas provenientes de alimentos ou gordura podem modificar as estruturas do fígado, no entanto o aumento do tamanho do núcleo revela alterações no metabolismo ocasionando necroses hepáticas ou esteatose hepática (CABALLERO et al., 2004; RASKOVIC et al., 2011).

Tabela 5. Histologia dos intestinos e fígado de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 15 dias de cultivo.

<i>Intestino</i>	Tratamentos							p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
¹ AV (μm)	140,34 ± 33,72	130,48 ± 61,92	115,81 ± 31,46	80,69 ± 17,81	144,29 ± 51,59	116,79 ± 36,17	103,00 ± 20,60	ns
² LV (μm)	66,00 ± 13,47	56,28 ± 8,55	70,84 ± 9,31	62,03 ± 3,75	79,86 ± 3,57	72,23 ± 11,31	68,57 ± 6,71	ns
³ AT (μm)	17,13 ± 5,07	15,10 ± 2,47	17,49 ± 4,15	12,09 ± 1,37	15,34 ± 4,95	16,07 ± 2,46	12,42 ± 2,21	ns
⁴ ET (μm)	33,94 ± 7,51	28,23 ± 5,69	34,81 ± 5,13	30,50 ± 2,71	34,66 ± 3,24	35,44 ± 4,74	32,74 ± 3,36	ns
⁵ NV (un.)	22,87 ± 3,48	25,67 ± 7,02	22,10 ± 3,03	21,67 ± 1,15	22,67 ± 3,21	22,40 ± 2,76	24,67 ± 3,72	ns
<i>Fígado</i>	Tratamentos							p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
⁶ NH	430,83 ± 87,51	397,50 ± 85,50	443,16 ± 82,26	433,40 ± 43,91	416,17 ± 83,79	371,17 ± 53,48	422,83 ± 44,26	ns
⁷ DN (μm)	4,52 ± 0,11 ^{abc}	4,69 ± 0,25 ^b	4,42 ± 0,16 ^b	4,52 ± 0,12 ^{bc}	4,64 ± 0,06 ^{ab}	4,36 ± 0,22 ^c	4,61 ± 0,03 ^{ab}	*
⁸ AN (μm^2)	15,92 ± 0,99 ^{ab}	16,74 ± 1,83 ^a	15,20 ± 1,12 ^{ab}	15,91 ± 0,86 ^{ab}	16,42 ± 0,94 ^{ab}	14,73 ± 1,63 ^b	16,65 ± 0,25 ^a	*
⁹ RN (μm)	2,24 ± 0,08 ^{abc}	2,34 ± 0,13 ^b	2,19 ± 0,08 ^{ac}	2,24 ± 0,07 ^{abc}	2,30 ± 0,03 ^{ab}	2,17 ± 0,12 ^c	2,30 ± 0,01 ^{ab}	*
¹⁰ VN (μm^3)	47,47 ± 5,03 ^{abc}	53,85 ± 8,87 ^c	44,45 ± 4,74 ^{ab}	47,38 ± 4,71 ^{abc}	51,32 ± 2,01 ^{abc}	42,92 ± 7,08 ^a	51,27 ± 1,05 ^{bc}	*

Intestino: ¹AV - altura dos vilos; ²LV - largura dos vilos; ³AT - Altura da túnica ⁴ET - espessura da túnica; NV - Número de vilos. **Fígado:** ⁶NH: Número de hepatócitos; ⁷DN: Diâmetro do núcleo; ⁸AN - área do núcleo; ⁹RN - Raio do núcleo; ¹⁰VN - volume do núcleo. Médias seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ns - não significativo. * - significativo.

Avaliando os hepatócitos do presente estudo, verificou-se vacúolos lipídicos de score= 2 e score=3. Indica-se que as larvas de pôs larvas do Nilo apresentaram esteatose hepática (Figura 1). A esteatose hepática, compreende-se como presença de gorduras nas células hepáticas, podendo acarretar algumas complicações para as funções normais dos órgãos. Estratégias nutricionais são fundamentais para evitar doenças relacionadas a

gorduras no fígado.

Mesmo com apenas 15 dias experimentais, as alterações encontradas no fígado das larvas de tilápia, indica-se uma sobrecarga do órgão. Essa resposta encontrada no fígado pode ser atribuída pela elevada frequência alimentar, excesso de proteína ou o desbalanço dela nas dietas ofertadas (HONORATO et al. 2013).

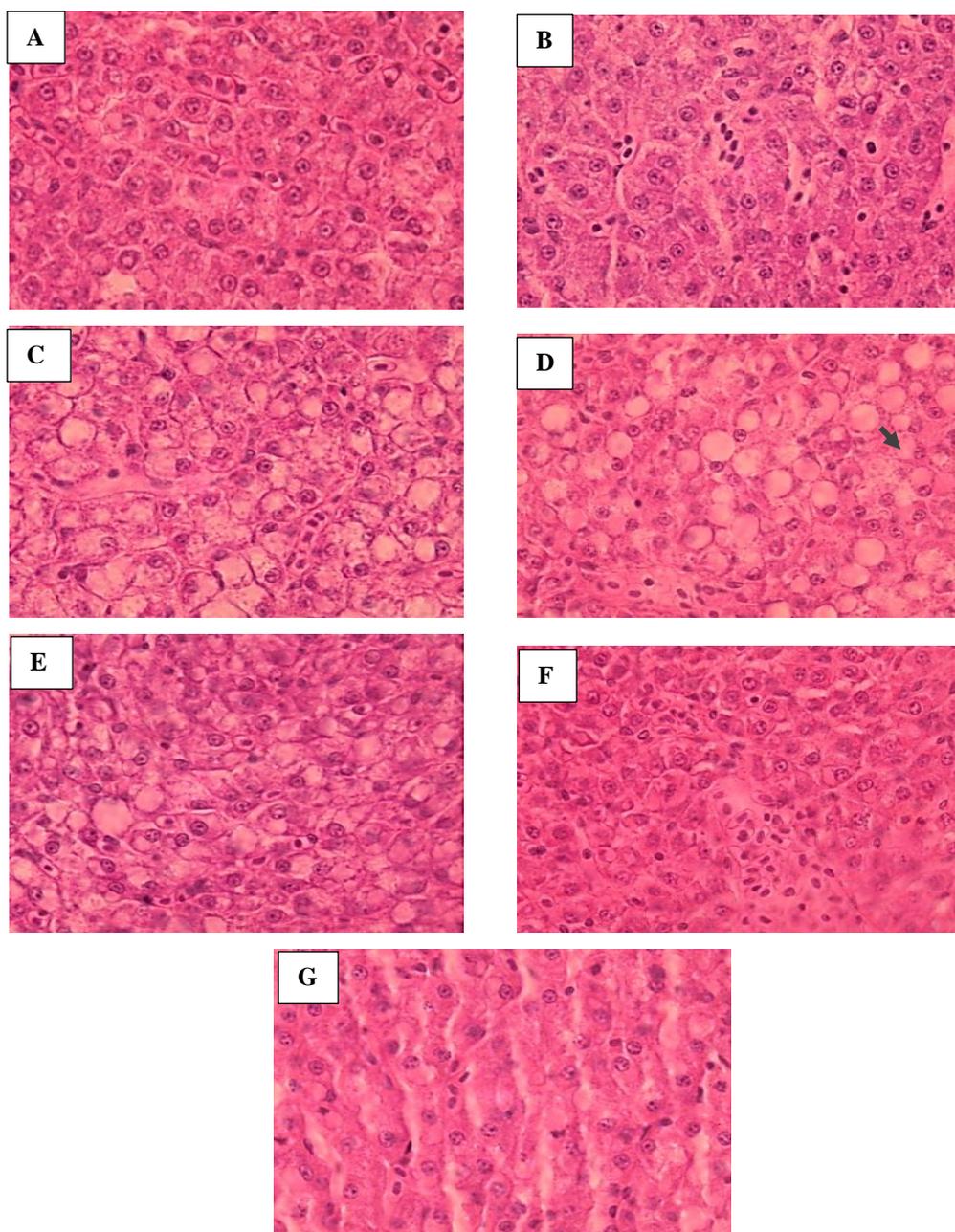


Figura 1. Vacuolização de hepatócitos em diferentes graus (H.E. 40X). (a) Limite celular do hepatócito definido e núcleo bem marcado (score = 0); (b) Presença de pequenos vacúolos intracelulares, porém sem alteração de formato e posicionamento do núcleo dos hepatócitos (score= 1); (c) Hepatócitos com vacúolos aparentes e mais volumosos, (score= 2); (d) Vacuolização intensa do citoplasma, perda do formato celular presença e núcleo periférico (score=3). Legendas das imagens: A- controle; B- 1%; C- 2%; D- 3%; E- 4%; F- 5%; G- Controle comercial.

Por exemplo, quando a energia da dieta excede a capacidade das células hepáticas de oxidar os ácidos graxos, a célula apresenta seu núcleo deslocado para a periferia, caracterizando um quadro de esteatose hepática (GAYÃO et al., 2013; CABALLERO et al., 2004).

A síntese de ácidos graxos em peixes ocorre principalmente no fígado (BELDA & POURCHET-CAMPOS, 1991). De forma geral todos os vertebrados compartilham de similar via lipogênica, para a biossíntese da gordura é necessária uma fonte de carbono, sendo derivada da transferência da acetil-CoA (proveniente da oxidação do piruvato como fonte de carbono) da matriz mitocondrial para o citoplasma (SARGENT et al, 2002; TOCHER, 2003; NRC, 2011).

A coenzima A da molécula de acetil não pode penetrar a membrana mitocondrial. Mas o excesso de ATP na mitocôndria impede que o ciclo de Krebs avance além do isocitrato, pela inativação da isocitrato-carboxilase. O acúmulo de citrato escapa para o citosol, onde somada a coenzima A é convertido em acetil-CoA e oxalacetato (CHAMPE & HARVEY, 1997; SILVA et al., 2014). Um grupo carboxila (a partir do CO₂) é introduzido na acetil-CoA para formar o malonil-CoA, esta reação, catalisada pela acetil-CoA-carboxilase, é a etapa regulatória da síntese de ácido graxo (WAKIL et al., 1983; SARGENT et al, 2002; TOCHER, 2003; SILVA et al., 2014).

Depois da síntese, a molécula de malonil-CoA é submetido a uma série de processos de condensação, desidratação e redução, facilitado pela presença de um complexo multi-enzimático da ácido graxo sintase (FAS), (SARGENT et al, 2002; TOCHER, 2003; CHIRALA e WAKIL, 2004).

Para cada ciclo dois átomos de carbonos derivadas do malonil-CoA são acrescentados na porção inicial de uma molécula de acetil- CoA para formar o 16:0 (ácido palmítico), os átomos de carbono constituindo os grupos metila e carboxila do grupo acetil tornam-se, respectivamente, C-16 e C-15 do palmitato; os átomos de carbono restantes são derivados da acetil-CoA via malonil-CoA, esse ácido graxo pode sofrer sucessivos processos de alongação e dessaturação gerando formas mais complexas (FRØYLAND et al., 2000; REGOST et al., 2001; NELSON e COX, 2011). Condições que podem ter comprometido o metabolismo dos peixes alimentados com as dietas com a suplementação do hidrolisado proteico de penas.

Conclusão

A inclusão de hidrolisado proteico de penas nas dietas melhorou aspectos zootécnicos de pós-larvas de tilápia do Nilo. Recomenda-se a inclusão de 2% do referido produto para melhor desempenho produtivo nessa fase de criação.

Porém o fígado dos exemplares apresentaram vacúolos lipídicos de score= 2 e score=3 indicando a esteatose hepática, tais alterações hepáticas indica uma possível sobrecarga do órgão. Tal fato pode ser atribuída pela elevada frequência alimentar, estar relacionado ao tempo de alimentação, excesso de proteína ou o desbalanço nutricional das dietas ofertadas

Agradecimento

Agradecimento á CAPES/ Fundação Araucária pela a concessão da bolsa de estudo e BRF S.A pelo financiamento da pesquisa.

Referências

ARANA, L. A. V. 2004. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. **Florianópolis : Editora da UFSC**. 2. ed.

AVISITE, **Brasil retorna ao 3º lugar na produção de carne de frangos**. 2021. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/index.php?page=noticias&id=22791> Acesso em: Fevereiro de 2021.

BAE, J., AZAD, A.K., WON, S. 2019. Effects of enzymatically hydrolyzed fish by-products in diet of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Aquatic Sci.** 22, 1. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0117-4>

BOLLA, S.; NICOLAISEN, O.; & AMIN, A. 2011. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. **Aquaculture**. 312(1-4): 117-125. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.12.019](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.019).

CABALLERO, M. J. et al. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal Of Fish Diseases**, p.531-541, 2004

CABALLERO, M. J., IZQUIERDO, M. S., KJØRSVIK, E., FERNANDEZ, A. J. & ROSENLUND, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases**. 27(9): 531-541. DOI: [10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x)

CARDOSO, M. S., GODOY, A. C., OXFORD, J. H., RODRIGUES, R., DOS SANTOS
CARDOSO, M., BITTENCOURT, F., & FEIDEN, A. 2021. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile tilapia. **Aquaculture**, 530, 735720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. **Porto Alegre: Artes Médicas**, p. 446, 1997.

CHIRALA, S. S.; WAKIL, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1045-1053, 2004.

DAROIT, D.J., BRANDELLI, A., 2014. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 34, p. 372–384. DOI: [10.3109/07388551.2013.794768](https://doi.org/10.3109/07388551.2013.794768).

FABREGAT, T. E. H. P., WOSNIAK, B., GONÇALVES, A. F. N. ., HA, N., SKOROSKI, E., & PESSATTI, M. L. 2016. Frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico de resíduo de sardinha na alimentação do jundiá: consumo de ração e excreção de amônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 68(3), 1713–1720. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9153>.

FRØYLAND, L.; LIE, Ø.; BERGE, R. K. Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 85-89, 2000.

FURUYA, W. M. E FURUYA, V. R. B. 2010. Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 88-94. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300010>.

GAYÃO, A. L. B. A. et al. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 8, p.991-997, 2013.

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**, v. 495, p. 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.051>.

HA, N; JESUS, G. F. A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N.S; SUGAI, J.K.; PESSATTI, M. L; MOURINO, J. L . FABREGA, T. E. 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**, v. 500, p. 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.004>[Get rights and content](#).

HEVROY, E. M., ESPE, M., WAAGB, O. R., SANDNES, K., RUUD, M., & HEMRE, G. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. **Aquaculture Nutrition**, 11 (4), 301–313. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00357.x>

HONORATO, C. A. et al. Histologia do intestino de tilápia do nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Nucleus Animalium**, Dourados, p.103- 112, 2013.

KIM, S., WIJESSEKARA, I. 2010. Desenvolvimento e atividades biológicas de peptídeos bioativos derivados do mar: uma revisão. **Jornal of Functional Foods**, 2(1), 9p.

LAFARGA, T., & HAYES, M. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, 98, 227-239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>.

LANGE, L., HUANG, Y., BUSK, P.K. 2016. Microbial decomposition of keratin in nature – a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.100, p.2083–2096, 2016. DOI: [10.1007/s00253-015-7262-1](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7262-1).

LORENZ, E. K.; BARONE, R. S.; FRANÇA, W.G.; SABIONI, R. E.; KOCH, J. F.; CYRINO, J. E. 2018. Performance, hematology and immunology of *Salminus brasiliensis* fed diets containing swine liver hydrolysate. **Aquaculture**, v. 483, p. 46-52. DOI:[10.1016/j.aquaculture.2017.09.040](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.040).

MARTÍEZ-ALVAREZ, O., CHAMARRO, S., BRENES, A. 2015. Hidrolisado proteico de subprodutos de processamento animal como fonte de moléculas bioativas com interesse na alimentação animal: uma revisão. **Food Research International**, 73, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>.

NELSON, D.L.; COX, M.M. - Princípios de bioquímica de Lehninger. 5.^a ed. Porto Alegre, **Editora Artmed**, p. 1304, 2011.

NIELSEN, P.M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **J. Food Sci.** 66, 642–646. Available online: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x> (accessed on 15 July 2018).

NIKLASSON L, SUNDH H, FRIDELL F, TARANGER GL, SUNDELL K. 2011. Disturbance

of the intestinal mucosal immune system of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), in response to long-term hypoxic conditions. **Fish Shellfish Immunol.** 2011 Dec;31(6):1072-80. DOI: [10.1016/j.fsi.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.09.011).

NRC (National Research Council). 2011. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.** Washington D.C.: The National Academies Press. 376 p.

OKAMURA, D., ARAÚJO, F. G., ROSA, P. V., FREITAS, R. T. F., MURGAS, L. D. S., CESAR, M. P. 2010. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39(5), 6p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500005>.

PACHECO G. F. E., J. G. PEZZALI, A. M. KESSLER, L. TREVIZAN. 2016. Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.45(6), p.288-294. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000600002>

RAŠKOVIĆ, B. S.; STANKOVIĆ, M. B.; MARKOVIĆ, Z. Z. &POLEKSIĆ, V. D. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)**. 56(1): 87-100. DOI: <https://doi.org/10.2298/JAS1101087R>

REGOST, C.; ARZEL, J.; CARDINAL, M.; ROBIN, J.; LAROCHE, M.; KAUSHIK, S. J. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v. 193, n. 3, p. 291-309, 2001.

Sargent J R, Tocher D R, Bell J G (2002) The lipids. In: Halver J E, Hardy R W (eds.) Fish nutrition. **Academic Press**, New York.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E. ET AL. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**. 9, 676–682. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

SIDDIK MAB, CHUNGU P, FOTEDAR R, HOWIESON J. 2019. Bioprocessed poultry by-product meals on growth, gut health and fatty acid synthesis of juvenile barramundi, **Lates calcarifer (Bloch)**. PLOS ONE 14: e0215025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215025>

SILVA, J. H. V.; LIMA, R. B.; LACERDA, P.B.; OLIVEIRA, A. C. Digestão e absorção de lipídeos. In: SAKOMURA, N.K., VILAR DA SILVA, J.H., PERAZZO-COSTA, F.G., FERNANDES, J.B.K., HAUSCHILD, L. **Nutrição de não-ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 62-76, 2014.

SILVA, L. C. R., FURUYA, W. M., NATALI, M. R. M. C., SCHAMBER, C. R., SANTOS, L. D. S., VIDAL, L. V. O. 2010. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-donilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.6, p.1175-1179. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000600002>.

TESSARO, L., DE TOLEDO, C.P.R., NEUMANN, G., KRAUSE, R.A., MEURER, F., NATALI, M.R.M. AND BOMBARDELLI, R.A. 2014. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture Research, Oxford**, v. 45: 1425-1433. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.12087>

Tocher D R 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. in Fish Scienc. 11:1-78

VENTURIN, A., GONÇALVES, A. F. N., OLIVEIRA, N. S., SKORONSKI, E., PESSATTI, M. L., & FABREGAT, T. E. H. P. 2016. Soluble fraction of sardine protein hydrolysates in the feeding of the South American catfish. **Boletim do Instituto de Pesca**, 42(4), 878–888. DOI: <http://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p878>

WAKIL, S. J.; STOOPS, J. K.; JOSHI, V. C. Fatty acid synthesis and its regulation. **Annual review of biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 537-579, 1983.

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**, v. 44, p. 957-966, 2016. <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue5-fulltext-8>.

CAPÍTULO 3

PROTEÍNA HIDROLISADA DE PENAS EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS COM ESSE ADITIVO NA FASE INICIAL

Resumo

A pesquisa teve como principal objetivo avaliar a influência do coproduto proteico de hidrolisado de penas, nos aspectos de desempenho zootécnico, respostas histológicas, atividades enzimáticas e estresse ao ar em alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). O experimento foi conduzido durante 35 dias, na Uniãoeste, Toledo-PR. Foram utilizados 630 exemplares com peso inicial médio de $\mu = 1,67 \pm 0,05$ g, previamente alimentados com o ingrediente teste desde a fase de criação anterior (pós-larvas). Distribuídos em um delineamento DIC, em 21 caixas polietileno com capacidade para 210 litros, com 7 tratamentos e 3 repetições. As rações foram formuladas de maneira a serem isoprotéicas e isoenergéticas, com níveis de inclusão de proteína hidrolisada de penas, sendo: T₁: 0% (Controle), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5% e T₇: Controle comercial. Ao final do experimento, verificaram-se os parâmetros de desempenho zootécnicos, respostas histológicas, atividades enzimáticas em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Conclui-se que a Proteína Hidrolisada de Penas (PHP) é uma alternativa de ingrediente funcional de alto valor biológico que melhora os principais parâmetros (PF, GP, GPD e TCE) de desempenho produtivo na fase de alevinagem. Assim, para melhor performance produtiva indica-se a inclusão de 1% do referido hidrolisado. No entanto, percebeu-se que os animais experimentais apresentaram vacuolização de hepatócitos em todos os tratamentos analisados, sendo caracterizado a esteatose hepática. Acredita-se que o aparecimento dessa alteração, ocorreu devido ao perfil aminoácídico e o peptídeo bioativo do produto teste, quantidade e frequência alimentar (6 tratos por dia) ou balanceamento nutricional da dieta. Tais motivos pode ter interferido na capacidade digestivas dos animais experimentais para algumas enzimas.

Palavras-chave: Histologia; Enzimas digestivas; Enzimas oxidativas; Hidrólise enzimática, Nutrição.

Abstract

The main objective of the research was to evaluate the influence of the protein co-product of feather hydrolyzate on the aspects of zootechnical performance, histological responses, enzymatic activities and air stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. The experiment was carried out for 35 days, in Uniãoeste, Toledo-PR. A total of 630 specimens with an average initial weight of $\mu = 1.67 \pm 0.05$ g were used, previously fed with the test ingredient from the previous rearing stage (post-larvae). Distributed in a DIC design, in 21 polyethylene boxes with a capacity of 210 liters, with 7 treatments and 3 replications. The rations were formulated to be isoproteic and isoenergetic, with levels of hydrolyzed feather protein inclusion, as follows: T₁: 0% (Control), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4 %, T₆: 5% and T₇: Commercial control. At the end of the experiment, the zootechnical performance parameters, histological responses, enzymatic activities in Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) were verified. It is concluded that Hydrolyzed Feather Protein (PHP) is a functional ingredient alternative of high biological value that improves the main parameters (PF, GP, GPD and TCE) of productive performance in the nursery stage. Thus, for better productive performance, the inclusion of 1% of said hydrolyzate is indicated. However, it was noticed that the experimental

animals showed vacuolization of hepatocytes in all analyzed treatments, being characterized as hepatic steatosis. It is believed that the appearance of this alteration occurred due to the amino acid profile and the bioactive peptide of the test product, food quantity and frequency (6 treatments per day) or nutritional balance of the diet. Such reasons may have interfered with the digestive capacity of experimental animals for some enzymes.

Keywords: Histology; digestive enzymes; Oxidative enzymes; Enzymatic Hydrolysis, Nutrition.

Introdução

A aquicultura continua a crescer mais rapidamente do que outros grandes setores de produção de alimentos (FAO, 2020). A criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é importante para a cadeia produtiva do Brasil (VALENTI, 2021). A espécie possui hábito onívoro e em cativeiro, apresenta crescimento rápido, capacidade de suportar baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, fácil adaptação à alimentação artificial (PEZZATO et al., 2000; MEURER et al., 2003).

Na criação de peixes, a ração é o item mais oneroso, correspondendo a mais de 70% dos custos de produção (KITAGIMA; FRACALOSSO, 2011; DALCIN et al., 2018). Geralmente, os ingredientes mais caros que compõem as dietas para organismos aquáticos são a proteína e a energia, sendo suas principais fontes a farinha de peixe e o milho, respectivamente (SANTOS et al., 2009; 2010). Nesse cenário, a procura por outros ingredientes, em especial os subprodutos da agroindústria, tornam-se uma possibilidade de substituição aos ingredientes tradicionais (LUO et al., 2012). Vale destacar que estes ingredientes são importados de diferentes regiões, aumentando os custos com transporte (DAIRIKI et al., 2013).

Então, investigar novos ingredientes é relevante na nutrição de peixes (SARY et al., 2017; MO et al., 2019). Assim, avalia-se o uso de alguns coprodutos da indústria alimentícia como sendo uma forma apropriada para converter hidrolisado proteico (LEWANDOWSKI et al., 2014), este produto pode ser destinado para diversas finalidades, dentre essas à indústria de rações para a aquicultura, devido sua qualidade nutricional (FRIES et al., 2011), geralmente são caracterizado por possuírem aminoácidos essenciais de alta digestibilidade (SILVA et al., 2017), e não altera os demais nutrientes da matéria-prima (SANCHES-ALVES et al., 2019).

O hidrolisado proteico, pode ser obtido de diferentes formas, sendo pela hidrólise química (hidrólise ácida e alcalina) ou por hidrólise enzimática através de enzimas de origem vegetal, animal, microbianas ou ainda por enzimas proteolíticas endógenas (KRISTINSSON; RASCO, 2000; MARTONE et al., 2005).

Devido a expansão da aquicultura, faz-se necessário estudos que avaliem a utilização de hidrolisados proteicos na nutrição de tilápia, de maneira a contribuir com novas estratégias

alimentares. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das dietas contendo proteína hidrolisada de penas (PHP) nos parâmetros de desempenho zootécnico, respostas histológicas, atividades enzimáticas e estresse ao ar em alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo esses animais experimentais expostos a dieta contendo PHP desde sua fase larval.

Metodologia

A presente pesquisa consistiu no prolongamento do artigo intitulado em “Proteína hidrolisada de penas em dietas para larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)”. O ensaio experimental foi realizado 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. Nos meses de fevereiro a abril de 2019, com duração de 35 dias. Os procedimentos adotados na condução deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Protocolo N° /42-19) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

A proteína hidrolisada de penas (PHP) foi fornecida pela empresa Brasil Foods S / A (sector BRF® Ingredientes), foram obtidos enzimaticamente, e o seu grau de hidrólise (15% para penas), percentagem de ligações peptídicas clivadas, foi determinada pelo método *orthoformaldehyde* (NIELSEN, 2001) (Tabela 1,2,3,4,5).

A composição aminoacídica da proteína hidrolisada de penas foi determinada pelo método MA-009 (WHITE et al.,1986; HAGEN et al., 1989) por um laboratório comercial (CBO Análises Laboratoriais Ltda., Valinhos-SP). Resultados obtidos por Cardoso, M. S, et al. (2021).

Tabela 1. Composição química da proteína hidrolisada de penas (matéria seca como linha de base)

Composição química	Ingrediente alternativo
	Proteína hidrolisada de penas
Matéria seca (g.kg ⁻¹) ^a	962,74
Proteína bruta (g.kg ⁻¹) ^a	763,33
Gordura bruta (g.kg ⁻¹) ^a	26,12
Energia bruta (kJ.g ⁻¹) ^a	20,52

Tabela adaptada.

Fonte: Marjana dos Santos Cardoso et al. (2021).

^aValores determinados no Laboratório de Análise de Alimentos (LQA) -Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura - GEMAQ-Unioeste, Toledo-PR.

^bLaboratório Comercial (CBO Análises Laboratoriais Ltda., Valinhos-SP, Brasil.

^cValores da análise realizada em triplicata.

Tabela 2. Propriedades antioxidantes dos hidrolisados proteicos

Amostra	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol de TE/g amostra}$)		
	ABTS	DPPH	FRAP
PHP	$23,86 \pm 1,98$	$116,94 \pm 1,93$	$90,48 \pm 0,74$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

Tabela 3. Propriedades anti-hipertensivas dos hidrolisados proteicos

Amostras	Atividade anti-hipertensiva (inibição % da ECA)
PHP	$47,29 \pm 0,99$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 4$) \pm desvio padrão.

Tabela 4. Propriedades antidiabéticas dos hidrolisados proteicos

Amostra	Inibição (%) da atividade	Inibição (%) da
	da α -glicosidase	atividade da α -amilase
PHP	$15,74 \pm 1,16$	$30,57 \pm 1,36$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 4$) \pm desvio padrão.

Tabela 5. Perfil dos aminoácidos essenciais (EAA) e não essenciais (NEAA)

Aminoácidos essenciais (EAA) (g.kg^{-1}) ^{bc}	
Arginina	48,6
Histidina	7,16
Isoleucina	37,91
Leucina	63,66
Lisina	20,04
Metionina	6,95
Fenilalanina	38,63
Treonina	32,50
Triptofano	4,25
Valina	80,28
EAA total	339,98
Aminoácidos não essenciais (NEAA) (g.kg^{-1}) ^b	
Ácido aspártico	57,43
Ácido glutâmico	83,61
Alanina	37,59
Cistina	20,98
Glicina	60,65
Prolina	73,74
Serina	77,48
Taurina	1,45
Tirosina	25,13
Total NEAA	438,06
Aminoácidos totais	778,04

Tabela adaptada.

Fonte: Marjana dos Santos Cardoso et al. (2021).

^aValores determinados no Laboratório de Análise de Alimentos (LQA) -Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura - GEMAq-Unioeste, Toledo-PR.

^bLaboratório Comercial (CBO Análises Laboratoriais Ltda., Valinhos-SP, Brasil.

^cValores da análise realizada em triplicata.

A pesquisa foi efetivada sob condições laboratoriais, utilizando 630 exemplares de *O. niloticus*, com peso inicial médio de $\mu = 1,67 \pm 0,05$ g e comprimento médio de $\mu = 4,27 \pm 0,13$ cm. Os animais experimentais foram previamente aclimatados e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em 21 caixas polietileno com capacidade para 210 litros, sendo sete tratamentos com três repetições, totalizando 30 animais por unidade experimental, sendo 90 por tratamento.

As dietas experimentais foram formuladas de maneira a serem isoprotéicas (40 % PB) e isoenergéticas (4000 kcal de ED/kg), com níveis crescentes de inclusão de proteína hidrolisada de penas (PHP), sendo: T₁: 0% (sem a adição de PHP) controle, T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5% e T₇: Controle comercial, respectivamente (Tabela 1). O cálculo da quantidade de inclusão dos hidrolisados proteicos nas dietas foi baseado na matéria seca do produto.

Para a elaboração das dietas experimentais os ingredientes foram triturados (0,3mm), peneirados, processados em moinho do tipo martelo (modelo MCs 280, marca Vieira Moinhos e Martelo, Tatuí-SP, Brasil), pesados, umedecido com 20% de água e homogeneizados por 15 minutos em um misturador mecânico tipo 'Y' (modelo MA 200, marca Marconi Equipamentos Laboratoriais, Piracicaba-SP, Brasil). Posteriormente as dietas foram extrusadas com 2,0 mm de diâmetro em um equipamento modelo Ex-Micro® com capacidade de produção de 10 kg h⁻¹, secas em estufa de ar forçado a 55 °C por 24 h (Modelo TE-394/3-D-marca Tecnal Equipamentos Científico para Laboratórios, Piracicaba-SP, Brasil). Incluiu-se o óleo de soja pelo método de aspersão. As dietas foram mantidas em câmara fria (4 °C), para a melhor conservação.

Para a determinação das análises bromatológicas (Proteína Bruta; Matéria Seca; Extrato etéreo; Matéria Mineral), as dietas experimentais e cinco peixes inteiros e descamados de cada unidade experimental (n= 15 peixes por tratamento), foram conservados previamente em estufas (70 °C por 24 h) para determinação da umidade, triturados e posteriormente analisados conforme as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2004), com exceção da análise de energia bruta, que foi determinada por meio de bomba calorimétrica (IKA®C2000), ambas realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) do GEMAq (Tabela 6).

Tabela 6- Composição das dietas experimentais utilizando proteína hidrolisada de penas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (com base na matéria seca).

INGREDIENTES	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Arroz quirera	70,34	69,98	69,63	69,27	68,92	68,56
Trigo farelo	0,00	0,56	1,12	1,69	2,25	2,82
Vísceras farinha aves	274,61	269,69	264,76	259,84	254,92	250,00
Hidrolisado de penas	0,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
Fubá de milho	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00
Farinha de peixe tilápia 58	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	0,00
Sangue farinha	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00
Soja farelo 45%	281,45	282,16	282,86	283,57	284,27	284,98
Carne e osso farinha45%	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00
Óleo de soja	30,00	30,57	31,14	31,71	32,29	32,86
Calcário	0,00	1,12	2,25	3,37	4,50	5,62
Cloreto de colina	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
DI-metionina	2,47	2,59	2,70	2,82	2,93	3,05
Fosfato bicálcio	0,00	1,77	3,55	5,32	7,10	8,87
L-lisina hcl	1,53	1,91	2,30	2,69	3,08	3,46
L-treonina	4,02	4,06	4,09	4,12	4,15	4,18
Sal comum	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Vitamina c	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85
Antifúngico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Níveis Nutricionais						
Amido	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Cálcio (%)	2,18	2,18	2,17	2,17	2,16	2,16
ED tilápia (Kcal/ kg)	3420,59	3416,47	3412,35	3408,23	3404,11	3400,00
Fenil Total (%)	1,86	1,87	1,87	1,88	1,88	1,89
Fenil + Tir. Total (%)	2,91	2,95	2,99	3,03	3,08	3,12
Fosforo total (%)	1,33	1,33	1,32	1,32	1,32	1,32
Gordura (%)	9,09	9,01	8,93	8,84	8,76	8,67
Histidina Total (%)	1,01	1,00	0,99	0,98	0,97	0,96
Isoleucina Total (%)	1,49	1,49	1,50	1,51	1,51	1,52
Leucina Total (%)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Metionina Total	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Proteína bruta (%)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Proteína Digestível Peixes (%)	34,61	34,62	34,62	34,63	34,64	34,64
Treonina Total (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Triptofano Total (%)	0,45	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Valina Total (%)	2,05	2,09	2,13	2,17	2,21	2,25
Vitamina C (mg/kg)	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99

Níveis de garantia por quilograma do produto: vit. A -500.000 UI; vit. D3-200.000 UI; vit. E -5.000 mg; vit. K3-1.000 mg; vit. B1-1.500 mg; vit. B2-1.500 mg; vit. B6-1.500 mg; vit. B12-4.000 mg; ácido fólico -500 64mg;

pantotenato de cálcio -4.000 mg; vit. C -15.000 mg; biotina -50 mg; inositol -10.000 mg; nicotinamida -7.000 mg; 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.

O arraçoamento foi realizado seis vezes ao dia (08h00, 10h00, 12h00, 14h00, 16h00 e 18h00) até a saciedade aparente, durante todo o período experimental. Ao final do dia, as excretas e restos alimentares e filtros foram sifonados para retirada de matéria orgânica depositada.

O experimento foi equipado por sistema com recirculação de água, filtro mecânico, aeração e aquecimento constante sendo realizado sifonamentos diários. Durante o período experimental foram monitorados semanalmente os parâmetros de qualidade de água utilizando o multiparâmetro portátil (modelo YSI-PRO PLUS).

As variáveis físicas e químicas da água foram monitoradas utilizando uma sonda multiparâmetro portátil, para mensuração de temperatura ($\mu=27,27 \pm 0,15$ °C), oxigênio dissolvido saturado ($\mu=37,55 \pm 2,06\%$), oxigênio dissolvido ($\mu= 4,95 \pm 0,17$ mg/L), condutividade elétrica ($\mu=185,69 \pm 1,2$ μ .S/cm) e pH ($\mu=6,95 \pm 0,03$), mantiveram-se dentro dos valores recomendados nessa fase de cultivo.

Após o período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por uma hora, seguida anestesiados em solução de benzocaina 100 mg/L (OKAMURA et al., 2010) e avaliados individualmente. A tomada de medidas e os cálculos para o desempenho produtivo foram determinados de acordo com o NRC (2011).

Para os aspectos de desempenho produtivo, avaliou-se: PMI = peso inicial médio (g); PMF= Peso médio final; GP: Ganho de peso médio (g): (Peso final médio – Peso inicial médio); GPD= Ganho de peso diário (g) (Ganho de peso final/Quantidade de dias experimentais); CAA= conversão alimentar aparente (CR: consumo de ração / GP: ganho de peso); TEP= Taxa de eficiência proteica (%) (ganho em peso/Proteína bruta consumida)*100; TCE (%)= Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) [(ln PFM) – (ln PIM)/ Período experimental] (ln =Logaritmo neperiano); SO (%) = Sobrevivência;

Dez peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados em solução de benzocaina 200 mg/L (GOMES et al., 2001), sendo cinco peixes para a avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes e cinco para a coleta de material da cavidade celomática para os cálculos dos índices: PE: Peixe eviscerado; IHS (%) = Índice hepatossomático: [peso do fígado (g)*100/peso final (g)]; IGV (%): Índice de gordura viscerossomático (peso da gordura(g)/ peso do peixe (g) * 100); IVS (%) = Índice viscerossomático (peso do vísceras (g)/ peso do peixe (g) * 100);

Para as análises histomorfométricas das vilosidades intestinais foi retirado segmento transversal da porção medial dos intestinos dos peixes, amostras de fígado e fibras musculares ambos fixados em solução Alfac durante seis horas e conservados em etanol 70° para remoção do fixador até serem processadas.

Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos por secções seriadas de 7 µm e coradas em Hematoxilina-Eosina, em seguida as lâminas foram analisadas em microscopia de luz mensurando a altura dos vilos (distância do topo das vilosidades ao início da camada muscular), largura dos vilos (distância do topo de um enterócito ao topo do enterócito do lado oposto), espessura da túnica (distância total da camada muscular circular e longitudinal), número de células caliciformes e número total de vilos, na objetiva de 20X e 40X.

Para as amostras de fígado, os hepatócitos foram quantificados em lente objetiva de 40X e seus diâmetros, área e volume foram tomados com o auxílio de lente objetiva de 100X (50 núcleos de hepatócitos por lâmina). Em ambas análises, utilizou-se o software cellSens Standard 1.15[®] para obtenção das imagens e posterior avaliação.

Foram realizadas medidas do perímetro do núcleo do hepatócito (µm) e área (µm²), volume nuclear do hepatócito ($H_{nv} (\mu m^3) = 4/3 \pi r^3$), onde o r corresponde ao raio nuclear. As mensurações foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagem Image Pro Plus[®] (version 4.5, Media Cybernetics, USA) e Fiji ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>) (SCHINDELIN et al. 2012).

A avaliação qualitativa de vacuolização hepática foi realizada de acordo com critérios estabelecidos por Caballero et al. (2004) e Tessaro et al. (2014). Foi atribuído um *escore* de vacuolização, onde 0= não observado, 1= poucos vacúolos, 2= vacuolização média, 3= vacuolização severa.

As fibras musculares foram feitas 200 (fibras) do menor diâmetro em ocular de 10x, delimitando frequências de tamanho em classes de diâmetros para verificação de hiperplasia e hipertrofia muscular (ALAMI-DURANTE et al. 2010).

Para a avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes, os peixes foram alimentados uma hora antes de serem submetidos a anestesia e eutanásia. Após isso, realizou-se a retirada imediata do fígado e intestino integralmente e armazenados em microtubos. O material coletado foi congelado individualmente em nitrogênio líquido e conservado em freezer a -80 °C. As amostras (a) foram homogeneizadas em tampão PBS (Tampão Fosfato Salina) (t) (1:10, a/t) pH 7,4 com homogeneizador (IKA T10 Basic) e centrifugado a 10.000 x g por 10 min (4 °C), o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas. A

quantificação dos níveis totais de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes, os peixes foram alimentados uma hora antes de serem submetidos a eutanásia. Após isso, realizou-se a retirada imediata do fígado e intestino integralmente e armazenados em microtubos.

O material coletado foi congelado individualmente em nitrogênio líquido e conservado em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras (a) foram homogeneizadas em tampão PBS (Tampão Fosfato Salina) (t) (1:10, a/t) pH 7,4 com homogeneizador (IKA T10 Basic) e centrifugado a 3.500 RPM por 10 minutos ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

A quantificação dos níveis totais de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como padrão, a fim de padronização dos dados, as amostras foram normalizadas para $1\text{ }\mu\text{mol.mg proteína}^{-1}$ com auxílio de solução tampão TBE. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade das enzimas digestivas no intestino dos peixes, amilase (BERNFELD, 1955), lipase (ALBRO et al., 1985), maltase (CORRÊA et al., 2007). A tripsina e quimotripsina foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Hummel et al, 1959.

Ao avaliar a atividade enzimática no fígado dos peixes, as seguintes enzimas foram avaliadas: determinação da atividade de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), alanina aminotransferase (TGP) via kit comercial da marca gold Analisa®, e determinada a atividade da peroxidação de lipídios (LPO/TBARS) (FEDERICI et al., 2007). O GSH A atividade da catalase foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Aebi (1984) e Federici et al. (2007), respectivamente. As análises supracitadas foram realizadas também para os animais que passaram pelo estresse ao ar.

Posteriormente às análises supracitadas, mantiveram-se os peixes nas unidades experimentais por mais 15 dias, para a avaliação do estresse ao ar. Utilizou-se uma peneira de 0,5 mm de diâmetro, submerso em água para evitar lesões pelo contato direto com a malha da peneira, sendo retirada da água, coberta com uma tela para evitar a evasão e colocada em papel secante para retirar o excesso de umidade. A partir deste momento, os animais permaneceram sete minutos em exposição ao ar. A taxa de resistência ao estresse (Re em %) foi determinada com base na porcentagem de sobrevivência. Para calcular essa taxa, foram contados os animais vivos de todas as repetições de cada tratamento.

Para fins estatísticos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de *Levine*, para médias homogêneas submeteu-se a *one-way* (ANOVA) com posterior teste de *fisher* ao nível de 5% de significância. Para dados que não atenderam ao pressuposto de homogeneidade procedeu-se a análise de *Kruskal-Wallis*. Foi utilizado o programa estatístico computacional *Statistic 7.1* (2005).

Resultados e discussão

Os resultados encontrados na composição química das dietas experimentais, verificou-se que a dieta T2 apresentou-se menores resultados no teor de proteína bruta quando comparado ao T7 (Tabela 7), porém os melhores resultados de desempenho zootecnico foram apresentados pelo tratamento T2 (Tabela 8), mostrando um melhor aproveitamento dessa proteína para o desenvolvimento corpóreo desses exemplares.

Tabela 7- Composição química das dietas experimentais utilizando proteína hidrolisada de penas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (com base na matéria seca).

Parâmetros	Tratamentos							P-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
PB ¹	42,01±1,48 ^{ab}	41,32±0,60 ^b	42,62±0,50 ^a	42,59±0,77 ^a	41,60±0,55 ^{ab}	41,72±1,02 ^{ab}	44,83±0,68 ^c	*
MS ²	94,28±0,9 ^{ab}	94,40±0,16 ^a	94,33±1,90 ^{ab}	95,18±1,35 ^a	94,33±0,01 ^a	94,91±1,33 ^a	92,61±0,23 ^b	*
EE ³	37,06±0,73 ^c	42,49±0,61 ^a	44,09±0,13 ^d	41,55±1,00 ^a	41,43±0,38 ^a	45,33±0,88 ^e	32,98±0,23 ^b	*
EB ⁴	4968,56±4,50 ^a	4987,08±4,47 ^d	5000,18±0,53 ^e	5029,00±5,22 ^b	4964,07±3,71 ^a	5036,87±8,95 ^b	4894,97±9,45 ^c	*
MM ⁵	10,42±0,62 ^{ab}	9,76±0,04 ^a	11,08±0,37 ^{bc}	10,91±0,05 ^{abc}	10,92±0,24 ^{abc}	11,74±1,75 ^c	15,21±0,13 ^d	*

PB: Proteína Bruta; ²MS: Matéria Seca; ³EE: Extrato etéreo; ⁴EB: Energia Bruta; ⁵MM: Matéria Mineral. *Valores médios seguidos por letra minúscula diferente, na mesma linha, indicam efeito significativo no fator GH pelo teste de fisher.

A tabela 8 apresenta os valores de desempenho produtivo e índices viscerossomáticos dos alevinos de tilápia do Nilo, após um período de 35 dias experimentais.

Os parâmetros de desempenho produtivo apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), nos índices de PF, GP, GPD e TCE, sendo similar aos resultados encontrados na fase larval, onde a inclusão do ingrediente teste em baixo percentual na dieta, refletem os melhores resultados (Tabela 8). Assim, indica-se 1% que a inclusão de proteína hidrolisada de penas (PHP) em dietas para tilápia do Nilo com peso inicial médio de 1 grama, sendo estes exemplares alimentados com ingrediente teste desde sua fase larval para melhores respostas zootécnicas.

Quando comparado com o estudo realizado por Rocha et al. (2021) utilizando hidrolisado proteico de frango em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, o presente estudo apresentou um GPD com 28% superior, no percentual de 1% de inclusão.

Os índices viscerossomáticos, apresentou-se diferenças em todos os parâmetros avaliados ($p < 0,05$), conforme descrito na tabela 8.

A gordura visceral está diretamente ligada ao teor de reservas energéticas dos peixes, uma deposição excessiva de gordura nas vísceras pode indicar desbalanço na relação energia/proteína das dietas, podendo reduzir o rendimento de carcaça (FIGUEIREDO et al., 2014).

Tabela 8. Valores de desempenho produtivo, índices hepatossomático (IHS), índice viscerossomático (IVS) e comprimento do intestino médios de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamentos							p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
¹ PI (g)	1,62 ± 0,09	1,65 ± 0,03	1,67 ± 0,01	1,67 ± 0,02	1,66 ± 0,05	1,65 ± 0,06	1,69 ± 0,08	ns
² PF (g)	14,85 ± 1,51 ^{ab}	18,21 ± 2,16 ^c	17,42 ± 1,57 ^{abc}	14,83 ± 1,78 ^a	15,62 ± 1,79 ^{abc}	16,10 ± 1,70 ^{abc}	18,06 ± 2,24 ^{bc}	*
³ GP (g)	13,22 ± 1,43 ^{ab}	16,57 ± 2,16 ^c	15,75 ± 1,58 ^{abc}	13,16 ± 1,76 ^a	13,95 ± 1,76 ^{abc}	14,45 ± 1,75 ^{abc}	16,37 ± 2,26 ^{bc}	*
⁴ GPD (g/dia ⁻¹)	0,38 ± 0,04 ^{ab}	0,47 ± 0,06 ^c	0,45 ± 0,04 ^{abc}	0,37 ± 0,05 ^a	0,40 ± 0,05 ^{abc}	0,41 ± 0,05 ^{abc}	0,47 ± 0,06 ^{bc}	*
CAA	1,14 ± 0,11	0,93 ± 0,13	0,95 ± 0,07	1,17 ± 0,07	1,18 ± 0,27	1,17 ± 0,19	1,03 ± 0,20	ns
TEP (%)	2,10 ± 0,22	2,58 ± 0,35	2,10 ± 0,21	2,04 ± 0,12	2,08 ± 0,43	2,06 ± 0,35	2,37 ± 0,51	ns
TCE	1,54 ± 0,05 ^{ab}	1,70 ± 0,12 ^b	1,64 ± 0,10 ^{ab}	1,47 ± 0,09 ^a	1,53 ± 0,08 ^{ab}	1,59 ± 0,18 ^{ab}	1,64 ± 0,19 ^{ab}	*
SO (%)	97,78 ± 1,92	97,78 ± 3,85	98,89 ± 1,92	98,89 ± 1,92	100 ± 0,00	98,89 ± 1,92	98,89 ± 1,92	ns
Índice Viscerossomático								
PE	13,01 ± 1,07 ^a	14,35 ± 1,33 ^{abc}	16,08 ± 1,10 ^{bc}	12,80 ± 1,48 ^a	13,66 ± 1,04 ^a	14,15 ± 1,76 ^{ab}	16,61 ± 1,56 ^c	*
IHS (%)	0,20 ± 0,05 ^{ab}	0,14 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,03 ^{ab}	0,19 ± 0,02 ^{ab}	0,25 ± 0,11 ^b	0,18 ± 0,01 ^{ab}	0,13 ± 0,01 ^a	*
IGV (%)	0,11 ± 0,02 ^{ab}	0,09 ± 0,03 ^{ab}	0,17 ± 0,04 ^c	0,11 ± 0,03 ^{ab}	0,13 ± 0,03 ^{ac}	0,14 ± 0,06 ^{ac}	0,05 ± 0,02 ^b	*
IVS (%)	0,90 ± 0,19 ^{ab}	0,65 ± 0,16 ^c	0,87 ± 0,16 ^{abc}	0,88 ± 0,13 ^{abc}	0,91 ± 0,10 ^b	0,89 ± 0,09 ^{ab}	0,65 ± 0,09 ^{ac}	*
CI(cm)	45,5 ± 4,37 ^{ab}	41,43 ± 2,52 ^a	48,09 ± 5,46 ^{ab}	44,40 ± 3,78 ^{ab}	45,57 ± 3,59 ^{ab}	47,91 ± 4,74 ^{ab}	56,90 ± 7,91 ^b	*

¹PMI = peso inicial médio; (g). ²PMF= Peso médio final; ³GP: Ganho de peso médio (g): (Peso final médio – Peso inicial médio). ⁴GPD= Ganho de peso diário (g) (Ganho de peso final/Quantidade de dias experimentais). ⁵CAA= conversão alimentar aparente (CR: consumo de ração / GP: ganho de peso). ⁶TEP= Taxa de eficiência proteica (%) (ganho em peso/Proteína bruta consumida)*100. ⁷TCE (%)= Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) [(In PFM) – (In PIM)/ Período experimental] (In =Logaritmo neperiano); ⁸SO (%) = Sobrevivência (Sem estresse); ⁹PE: Peixe eviscerado; ¹⁰IHS (%) = Índice hepatossomático: [peso do fígado (g)*100/peso final (g)]; ¹¹IGV (%): Índice de gordura viscerossomática (peso da gordura(g)/ peso do peixe (g) * 100); ¹²IVS (%) = Índice viscerossomático (peso do vísceras (g)/ peso do peixe (g) * 100); CI: Comprimento do intestino. NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de fisher.

O tecido muscular esquelético tem como principal característica a plasticidade e este atributo torna o músculo extremamente importante para a adaptação dos organismos ao seu habitat, uma vez que esse tecido tem que

alterar suas funções morfológicas, metabólicas e funcionais em resposta a vários estímulos (ACOSTA et al., 2005).

Na presente pesquisa, as fibras musculares variaram de <5 até 20 μm . A Proteína hidrolisada de penas promoveu diferenças nas fibras de diâmetro 10-15 μm , onde o tratamento de 1% de inclusão apresentou fibras menores. Enquanto as fibras de 15-20 μm , apresentando um aumento hipertrófico (aumento de diâmetro de fibras) para a inclusão 3% (Tabela 9).

A distribuição dos diâmetros das fibras (ou áreas), e especialmente, a presença de fibras com diâmetros pequenos, é frequentemente usado como uma medida da formação de novas fibras, ou seja, da hiperplasia. Assim, nota-se que o tratamento com 1% de inclusão de ingrediente teste utiliza-se as fibras de pequenos diâmetros para formação de nova fibras musculares, potencializando nos melhores resultados, conforme foram apresentados nos índices zootécnicos (Tabela 8).

Portanto acredita-se que os animais que receberam 1% de inclusão mantiveram-se a integridade da hiperplasia, deste modo, nesta fase de rápido crescimento, quando os níveis nutricionais não estão limitados, os exemplares absorvem toda a energia necessária para a geração de novas fibras (USHER et al, 1994). Não notou-se diferença significativa ($p>0,05$) na frequência muscular

Tabela 9. Fibras musculares e frequência das fibras musculares de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo.

Músculos	Tratamentos (μm)							p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
<5	4,65 \pm 0,37	4,58 \pm 0,45	4,55 \pm 0,25	4,73 \pm 0,23	4,44 \pm 0,04	4,69 \pm 0,13	4,52 \pm 0,44	ns
Fibras 5-10	8,01 \pm 0,32 ^{ab}	8,23 \pm 0,85 ^{ab}	8,03 \pm 0,37 ^{ab}	7,92 \pm 0,34 ^{ab}	8,40 \pm 0,89 ^b	8,00 \pm 0,35 ^{ab}	7,71 \pm 1,10 ^a	*
Fibras 10-15	11,83 \pm 0,36 ^a	11,17 \pm 0,32 ^b	11,53 \pm 0,17 ^{ab}	11,47 \pm 0,22 ^{ab}	12,53 \pm 0,63 ^c	11,68 \pm 0,90 ^{ab}	11,93 \pm 0,33 ^a	*
Fibras 15-20	16,76 \pm 1,49 ^{bc}	18,34 \pm 0,01 ^{cd}	15,53 \pm 0,49 ^a	18,95 \pm 0,01 ^d	15,94 \pm 0,025 ^{ab}	15,85 \pm 0,38 ^a	16,12 \pm 0,33 ^{ab}	*
Frequência (%)								
<5	1,44	0,31	1,23	0,82	0,12	0,54	1,98	ns
Fibras 5-10	60,20	70,09	61,00	64,98	41,82	42,20	58,41	ns
Fibras 10-15	37,65	29,48	37,26	33,98	49,27	51,69	48,71	ns
Fibras 15-20	0,72	0,10	0,51	0,20	8,77	5,67	4,32	ns

NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa ($P<0,05$) pelo teste de fisher.

O fígado é um órgão vital, versátil e responsável pela metabolização de várias substâncias como glicose, aminoácidos e ácidos graxos e nos dá respostas do estado nutricional em peixes e desintoxicam o organismo (GARTNER; HIATT, 2007).

. Os parâmetros histomorfométricos dos hepatócitos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo que o tratamento controle (sem inclusão do ingrediente teste) apresentou os menores valores quando comparado aos tratamentos 3%, 5% e controle comercial nas variáveis de diâmetro (μm), perímetro (μm^2), raio (μm) e volume (μm^3), exceto nos números de hepatócitos que não mostrou-se diferenças entre os tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10. Características morfométricas dos núcleos dos hepatócitos de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo.

Fígado	Tratamentos							P-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
NH	430,83 ± 87,51	397,50 ± 85,49	443,17 ± 82,26	433,40 ± 43,91	416,17 ± 583,79	371,17 ± 53,48	422,83 ± 44,26	ns
DN(μm)	3,31 ± 0,20 ^b	3,55 ± 0,08 ^{ab}	3,61 ± 0,32 ^{ab}	3,67 ± 0,07 ^a	3,42 ± 0,11 ^{ab}	3,78 ± 0,20 ^a	3,70 ± 0,21 ^a	*
PN (μm^2)	9,56 ± 1,05 ^b	10,72 ± 0,55 ^{ab}	11,06 ± 0,93 ^a	11,48 ± 0,44 ^a	9,93 ± 0,15 ^{ab}	11,45 ± 1,10 ^a	11,35 ± 0,85 ^a	*
RN (μm)	1,74 ± 0,10 ^b	1,84 ± 0,05 ^{ab}	1,87 ± 0,09 ^{ab}	1,90 ± 0,03 ^a	1,77 ± 0,01 ^{ab}	1,90 ± 0,09 ^a	1,89 ± 0,08 ^a	*
VN (μm^3)	22,26 ± 3,84 ^b	26,18 ± 2,10 ^{ab}	27,52 ± 3,97 ^{ab}	28,75 ± 1,43 ^a	23,32 ± 0,42 ^{ab}	29,05 ± 4,04 ^a	28,23 ± 3,73 ^a	*

¹NH: Número de hepatócitos; ²DN: Diâmetro do núcleo; ³PN – Perímetro do núcleo; ⁴RN- Raio do núcleo; ⁵VN - volume do núcleo. NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ostaszewska et al. (2011) relatam que em ótimas condições nutricionais, o fígado vai armazenar boas quantidade de glicogênios no citoplasma e isto reflete no tamanho perímetro e volume dos hepatócitos. Desta forma percebe-se que a inclusão de 3%, 5% de PHP e controle comercial na dieta direcionaram para melhores respostas hepáticas.

Wold et al. (2009) relatam que peixes submetidos a estresses nutricionais sofrem redução no tamanho dos núcleos dos hepatócitos. Diferenças no formato e tamanho dos hepatócitos assim como no núcleo estão associados a patologia hepáticas e a atividade metabólica das células no fígado (RASKOVIC et al. 2011).

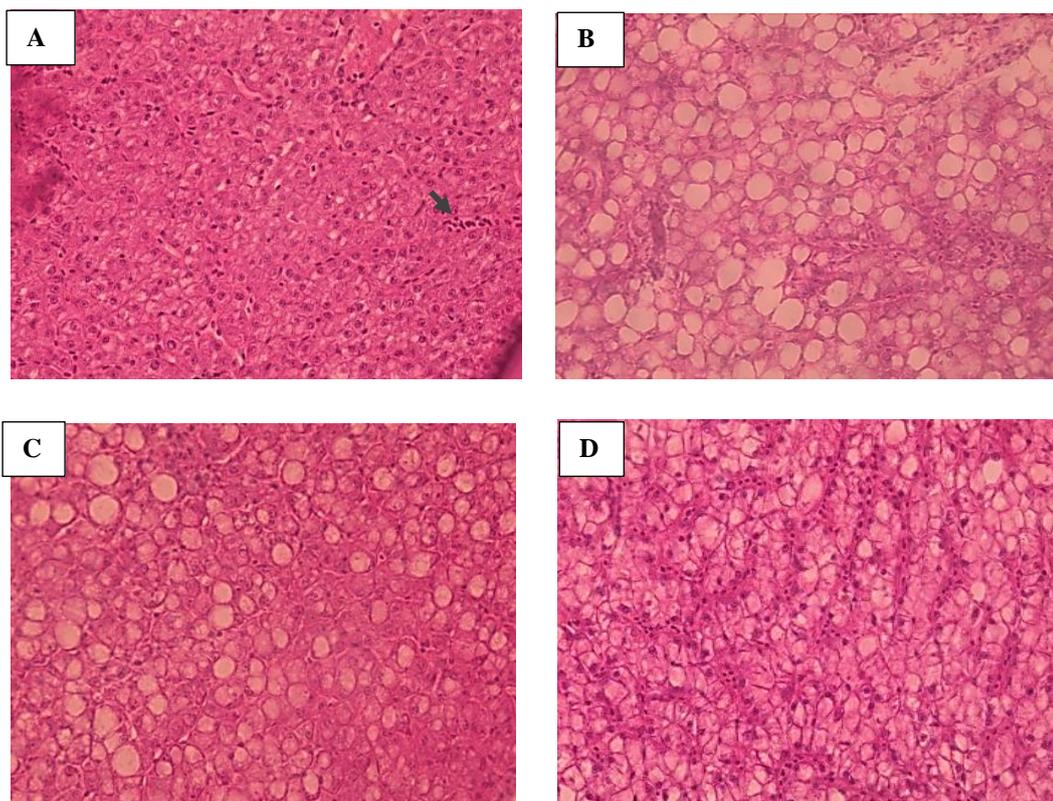
Supõe-se que existe uma interação ainda pouco compreendida entre fatores genéticos, fatores metabólicos e ambientais que causam o acúmulo de triglicerídeos no citoplasma de células do fígado (MARCHISELLO et al., 2019).

Asaoka et al. (2013) postularam duas hipóteses sobre os processos que levam à apresentação desta patologia hepática: O primeiro refere-se a um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos devido à resistência a insulina e o segundo é o resultado de fatores

patogênicos adicionais que podem eventualmente induzir danos no fígado, tais como: inflamação, liberação de citocinas, estresse oxidativo, disfunção estresse mitocondrial e/ou do retículo endoplasmático (RE).

Mas ao longo dos anos foram observados vários fatores que têm sido relacionados ao acúmulo de gordura no fígado, como: 1) Dietas que não atendem aos requisitos específicos para a espécie; 2) Gorduras oxidadas e/ou peroxidação lipídica; 3) O uso indiscriminado de drogas e substâncias tóxicas e/ou 4) períodos prolongados de hipóxia (MORAES et al., 2018; WOLF & WOLFE, 2005; IREGUI et al., 2004; SPISNI et al., 1998). 5) Quantidade da dieta interfere diretamente na sua estrutura histo- morfo funcional.

No presente estudo percebeu-se que os animais experimentais apresentaram vacuolização de hepatócitos em todos os tratamentos analisados, sendo caracterizado a esteatose hepática (Figura 1). Acredita-se que o aparecimento dessa alteração (esteatose hepática), ocorreu devido ao perfil aminoácídico e o peptídeo bioativo do produto teste, quantidade e frequência alimentar (6 tratos por dia) ou balanceamento nutricional da dieta.



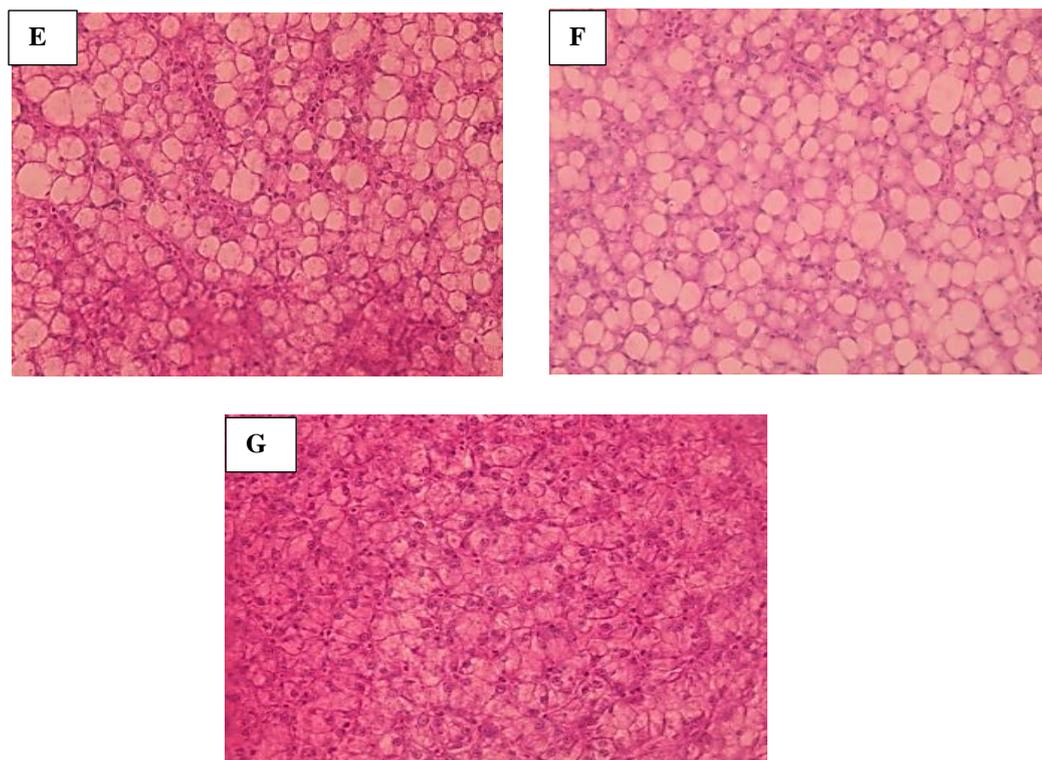


Figura 1. Vacuolização de hepatócitos em diferentes graus (H.E. 40X). (a) Limite celular do hepatócito definido e núcleo bem marcado (score = 0); (b) Presença de pequenos vacúolos intracelulares, porém sem alteração de formato e posicionamento do núcleo dos hepatócitos (score= 1); (c) Hepatócitos com vacúolos aparentes e mais volumosos, (score= 2); (d) Vacuolização intensa do citoplasma, perda do formato celular presença e núcleo periférico (score=3). Legendas das imagens: A- controle; B: 1%; C-2%; D- 3%; E- 4%; F- 5%; G- Controle comercial.

As enzimas digestivas no intestino analisadas no presente estudo apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). O conhecimento das enzimas digestivas em um organismo ajuda a determinar a sua capacidade digestiva, o que por sua vez auxilia a seleção de ingredientes a serem incluídos na dieta (GIODA et al., 2017).

A lipase atua na degradação de lipídeos provenientes da alimentação, liberando ácidos graxos e glicerol no lúmen do intestino. Estes compostos desempenham importantes funções energéticas, estruturais e hormonais (MOURA et al., 2012). Como pode ser observado na figura (2A), a lipase apresentou uma redução significativa de atividade no grupo T4 comparado ao grupo controle.

Tal redução pode estar relacionada ao desequilíbrio nutricional na dieta, sendo uma medida poupadora de energia e proteína, fazendo com que estes sejam utilizados para fins de desempenho corpóreo. Se ocorreu a redução de lipase significa que menos lipídeos foram absorvidos, logo as necessidades energéticas das células terão de ser supridas por outros nutrientes.

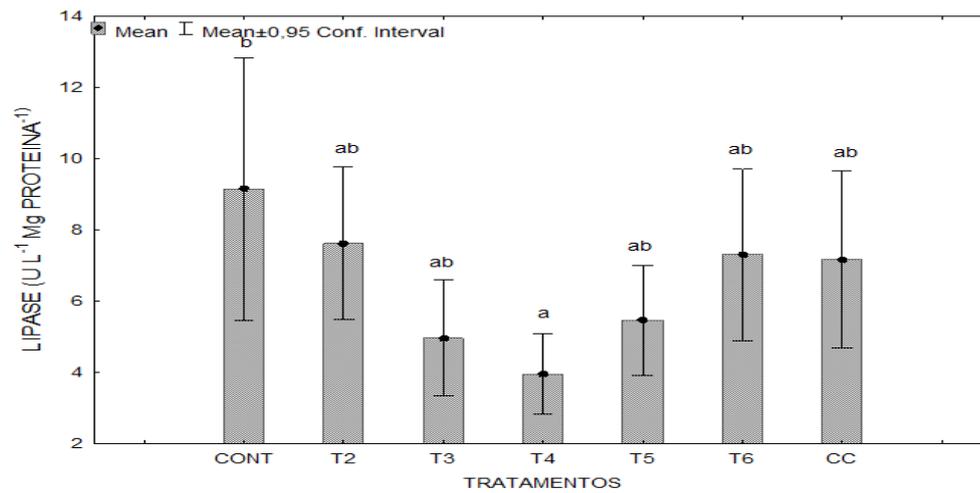
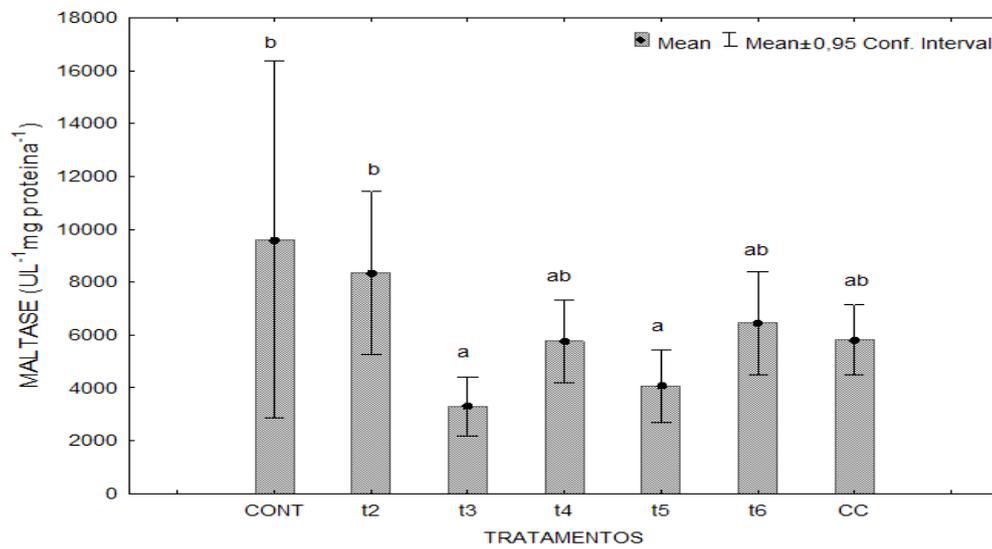
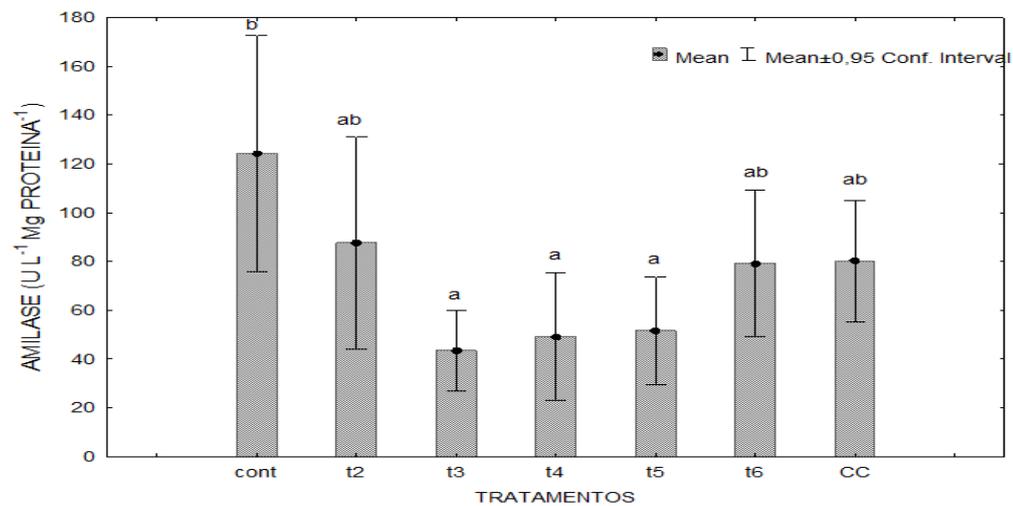
Para a digestão de carboidratos, a enzima maltase apresentou redução significativa de atividade nos grupos T3 e T5 comparado ao grupo T1 e T2 (Figura 2B).

Enquanto a enzima amilase, que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ de polissacarídeos como o amido e o glicogênio, apresentou atividades significativamente menores nos tratamentos T3, T4 e T5. A amilase é uma das enzimas digestivas, de origem pancreática, que age no intestino delgado sobre os polissacarídeos presentes no quimo (Figura 2C). O tratamento T1, T2, T6 e T7 indica que os animais experimentais alimentados com essas dietas, estimularam o pâncreas a produzir maior quantidade de amilase devido ao aumento da concentração de amido no intestino.

A presença de alimento no trato digestório resulta em estímulos hormonais (colecistoquinina – CCK), que agem no pâncreas, órgão responsável pela produção de diversas enzimas digestivas (LOVELL, 1998). Com o melhor aproveitamento do amido como fonte energética, a proteína foi poupada para a função estrutural, ou seja, desenvolvimento dos tecidos. Essa tendência nos resultados no T2, pode ter direcionado ao maior ganho de peso e melhor conversão alimentar.

A tripsina, é a principal enzima digestiva intestinal, responsável pela hidrólise de proteínas da dieta, enquanto a quimotripsina, é uma endopeptidase membro da família de serinoproteases, armazenada no pâncreas na forma de um precursor, ambas atuam dentro do intestino para ajudar quebrar moléculas de proteínas que é ingerida através das dietas experimentais. Sendo que a quimotripsina atua como sendo uma função complementar a tripsina, ajudando a quebrar as moléculas de proteína em locais que a tripsina não é capaz de atuar.

No presente estudo foram encontrados resultados opostos, onde na tripsina as menores absorção de proteína ocorreu T3 em comparação ao T6 e T7, enquanto a quimotripsina os maiores resultado foi encontrado no T3 em comparação ao grupo controle.

(A) Lipase**(B) Maltase****(C) Amilase**

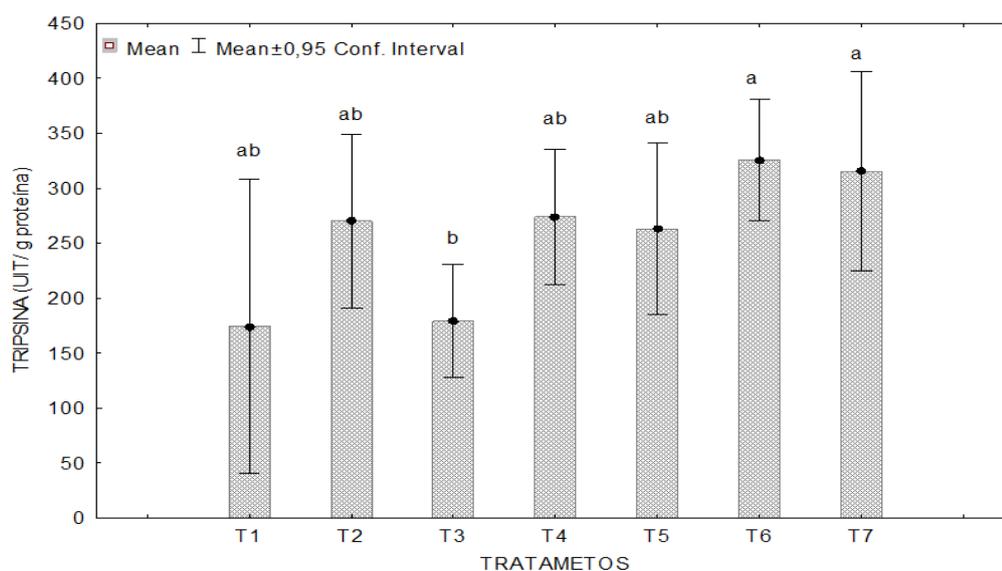
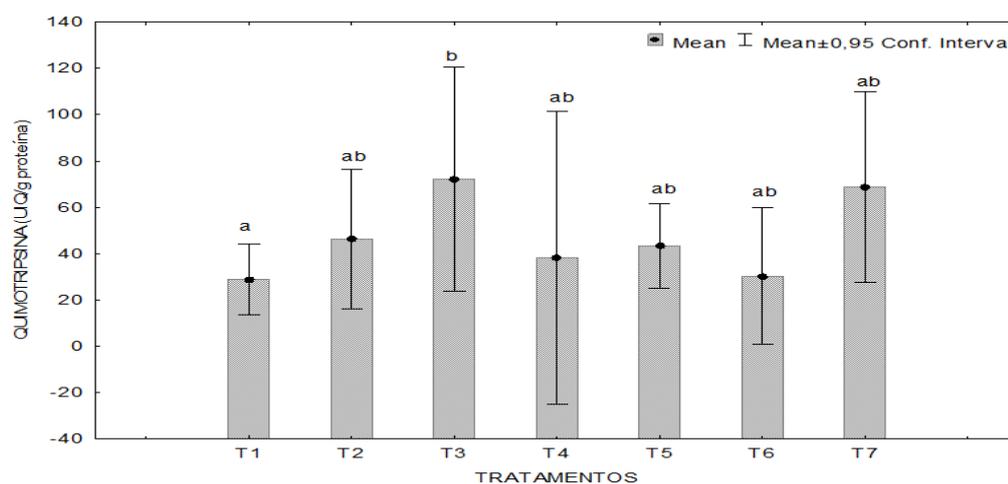
(D) Tripsina**(E) Quimotripsina**

Figura 2. Atividade das enzimas lipase (A), maltase (B) amilase (C), tripsina (D) e quimotripsina (E) em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

Não foram observadas variações nas atividades da GSH (Figura 2) nos animais experimentais. O GSH é considerada um dos melhores antioxidantes para diversas atuações no corpo, como, no transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa de certas enzimas, proteção do organismo (DRINGEN, 2000; FORMAN, 2009; PARK, 2010).

No presente trabalho a concentração basal de GSH (Figura 3 e 4) estão dentro da faixa proposta pela literatura que varia 7 a 40 mM.mL⁻¹, para *O. niloticus* (ABDEL-KHALEK et al., 2017; ABDEL-KHALEK, 2015; PINER, UNERB, 2013).

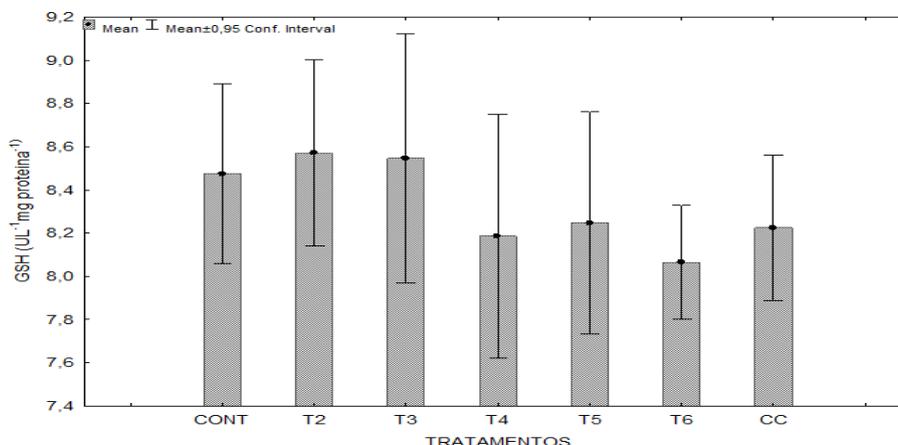
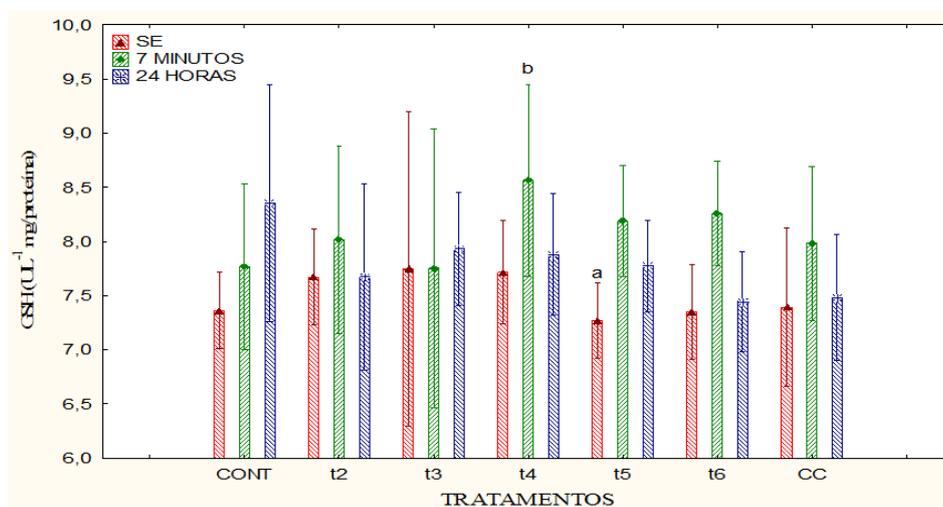


Figura 3. Atividade de GSH em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

Para os exemplares que foram expostos ao estresse no final do experimento (SE- Sem estresse, 7 minutos e 24 horas), verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade de GSH para o grupo T4 (7 minutos após estresse), sendo a maior concentração, enquanto T5 (Sem estresse) apresentou níveis reduzidos.

Níveis mais reduzidos de GSH, apresenta-se uma maior vulnerabilidade aos danos causados pelos radicais livres. Graves danos ao sistema imunológico. Quanto menor o conteúdo em GSH numa célula, menor a probabilidade de sobrevivência dessa célula (FORMAN, 2009).



*SE- Sem estresse

Figura 4. Atividade GSH após estresse ao ar (SE- Sem estresse, 7 minutos e 24 horas), em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

Os valores de TBARS são avaliados como indicador do grau de oxidação lipídica, avaliando os danos celulares por estresse oxidativo (Figura 5). Nessa presente pesquisa não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos para análise supracitada (Figura 5).

Para os animais exposto ao desafio ao ar, notou-se diferenças significativas para os tratamentos SE- Sem Estresse quando comparado aos órgãos coletado dos peixes que foram expostos a 7 minutos e 24 horas após estresse (Figura 6).

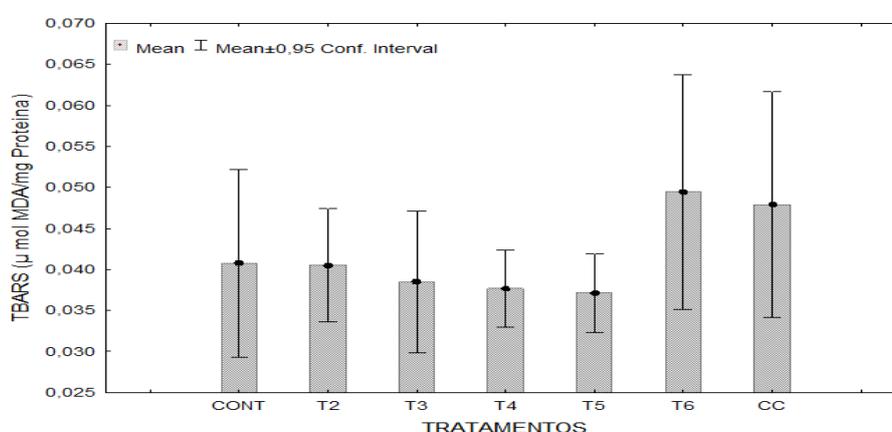


Figura 5. Atividade de TBARS em alevinos normais de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

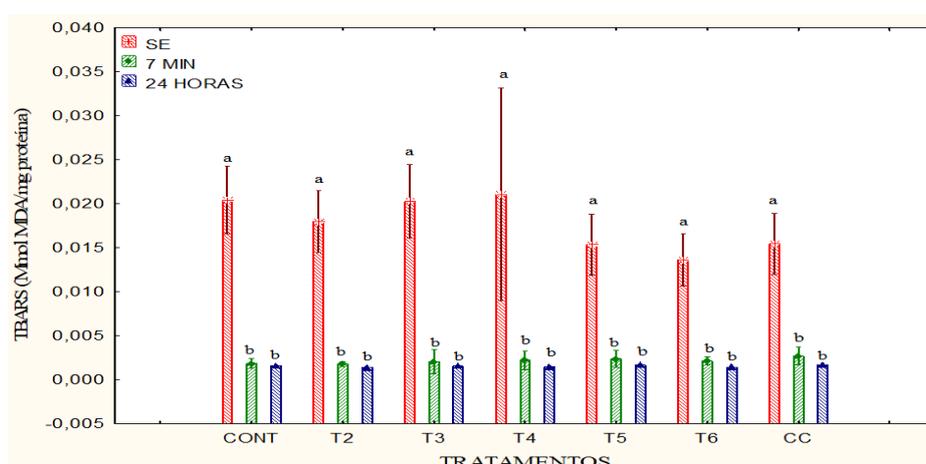


Figura 6. Atividade de TBARS após estresse ao ar (SE- Sem estresse, 7 minutos e 24 horas), em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

A enzima catalase (CAT), componente de defesa antioxidante primário, apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra sob estresse oxidativo, sendo considerada por este motivo um importante biomarcador em ações de monitoramento (COGO et al., 2009). Os níveis mais baixos de enzima catalase foram observados nos tratamentos T6 e T7 (Figura 6). Enquanto os animais expostos ao estresse ao ar, não apresentaram diferenças significativas (Figura 7) entre os tratamentos.

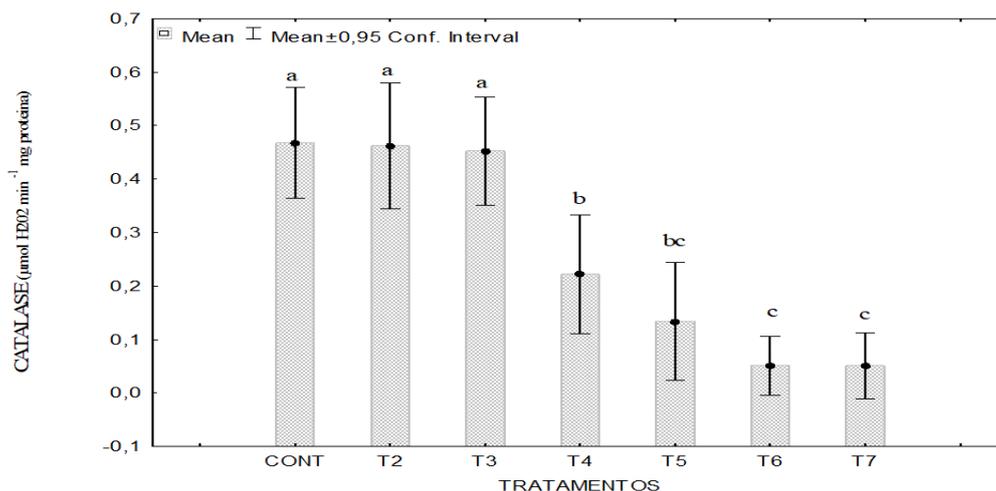


Figura 7. Atividade da catalase em alevinos normais de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

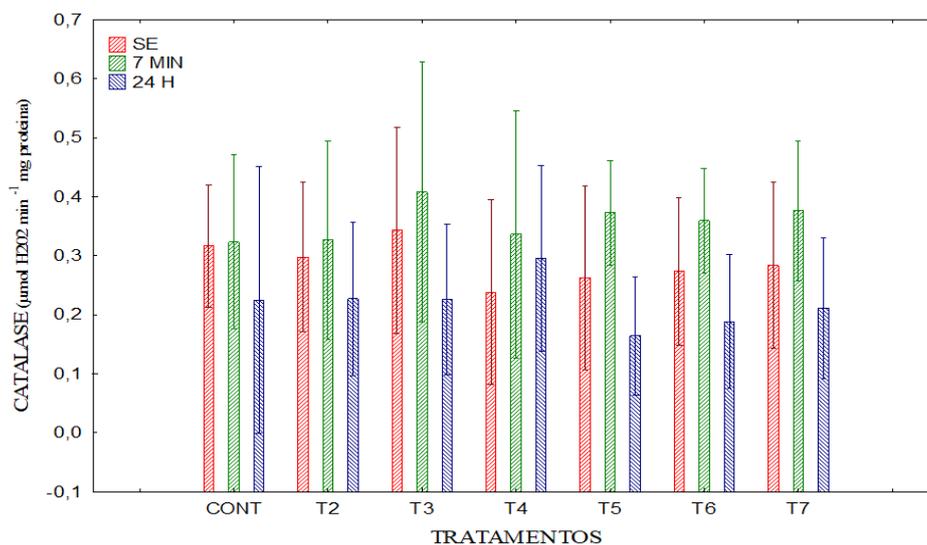


Figura 7. Atividade da catalase após estresse ao ar (SE- Sem estresse, 7 minutos e 24 horas), em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,05$.

Após análises, é evidente que a inclusão de PHP como ingrediente alternativo para tilápia do Nilo na fase de cultivo da presente pesquisa, interfere na capacidade digestivas dos animais experimentais para algumas enzimas.

Mostrando que nas enzimas da lipase, maltase, amilase e tripsina os tratamentos que receberam a inclusão do ingrediente alternativo (T3, T4 e T5), interferiu negativamente no processo digestivo, reduzindo assim a atividade enzimática, considera-se que isto pode se refletir em dificuldades no aproveitamento dos nutrientes do ingrediente alternativo.

Assim, as características da PHP, principalmente o perfil de peptídeos bioativos e peso molecular, pode ter sido o inibidor de melhores absorção.

Conclusão

Conclui-se que a Proteína Hidrolisada de Penas (PHP) é uma alternativa de ingrediente funcional de alto valor biológico que melhora os principais parâmetros (PF, GP, GPD e TCE) de desempenho produtivo na fase de alevinagem. Assim, para melhor performance produtiva indica-se a inclusão de 1% do referido hidrolisado.

No entanto, percebeu-se que os animais experimentais apresentaram vacuolização de hepatócitos em todos os tratamentos analisados, sendo caracterizado a esteatose hepática. Acredita-se que o aparecimento dessa alteração, ocorreu devido ao perfil aminoácídico e o peptídeo bioativo do produto teste, quantidade e frequência alimentar (6 tratos por dia) ou balanceamento nutricional da dieta. Tais motivos pode ter interferido na capacidade digestivas dos animais experimentais para algumas enzimas.

Agradecimento

Agradecimento á CAPES/ Fundação Araucária pela a concessão da bolsa de estudo e BRF S.A pelo financiamento da pesquisa.

Referências

ABDELKHALEK NKM, EISSA IAM, AHMED E, KILANY OE, EL-ADL M, DAWOOD MAO, HASSAN AM, ABDEL-DAIM MM. 2017. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environ Toxicol Pharmacol**. 2017 Sep;54:99-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.07.002>.

ABDEL-KHALEK, AMR A.; KADRY, MOHAMED A.M.; BADRAN, SHEREEN R.; MARIE, MOHAMED-ASSEM S. 2015. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. **The Journal of Basic Applied Zoology**, v. 72, p. 435-777.

ACOSTA, J.I. **Caracterização, avaliação econômica e eficiência de escala (DEA) na produção de tilápia em tanques-rede e de tambaqui em viveiros escavados**. 2005, 154 f. Tese (Doutorado em aquicultura). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal-SP.

AEBI H. 1984. Catalase. **Methods in Enzymology**. 105:121–126. DOI: [10.1016/s00766879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s00766879(84)05016-3).

ALAMI-DURANTE, H., WRUTNIAK-CABELLO, C., KAUSHIK, S.J., MÉDALE, F. 2010. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 156, 561–568. DOI: [10.1016/j.cbpa.2010.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.04.015).

ASAOKA, Y., TERAJ, S., SAKAIDA, I., & NISHINA, H. 2013. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. **Disease models & mechanisms**, 6(4), 905–914. <https://doi.org/10.1242/dmm.01198>.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999).

CABALLERO, M. J.; IZQUIERDO, M. S.; KJØRSVIK, E.; FERNANDEZ, A. J. AND ROSEN LUND, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology

after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases** 27:531-541. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572>.

CARDOSO, M. S., GODOY, A. C., OXFORD, J. H., RODRIGUES, R., DOS SANTOS CARDOSO, M., BITTENCOURT, F., & FEIDEN, A. 2021. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile tilapia. **Aquaculture**, 530, 735720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>

COGO AJD, SIQUEIRA AF, RAMOS AC, CRUZ ZMA & SILVA AG (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line** 7 (1): 37-42.

DAIRIKI, JK, CORREA, RB, INOUE, LAKA, MORAIS, IS. 2013. Feijão-caupi autoclavado na nutrição de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48: 450-453. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000400014>.

DALCIN MO, PIANESSO D, SILVA VC, MOMBACH PI, ADORIAN TJ, LIMA JS, GOULART FR, SILVA LP. 2018. Concentrado proteico de arroz na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70(1), 306-314. DOI: [10.1590/1678-4162-9730](https://doi.org/10.1590/1678-4162-9730).

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. 2000. **Progress in neurobiology**; 62(6): 649-669 DOI: [10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x)

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Aquicultura. **A Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020. Sustentabilidade em Ação**, FAO, Roma (2020), 10.4060/ca9229en. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>

FEDERICI, G., B.J. SHAW AND R.D. HANDY, 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, 84: 415–430. DOI: [10.1016/j.aquatox.2007.07.009](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009)

FORMAN HJ, RINNA A, ZHANG H. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine** .2009; 30(1-2): 1-12. DOI: [10.1016/j.mam.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006).

FRIES, E.M.; LUCESI, J.D.; COSTA, J.M.; RESSEL, C.; SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. 2011. Hidrolisados cárneos proteicos em rações para alevinos de kinguios (*Carassius auratus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 4, p. 401-407, 2011.

- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia em cores. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2007.
- GIODA, C.R., PRETTO, A., FREITAS, C.S., LEITEMPERGER, J., BALDISSEROTTO, B., SALBEGO, J. 2017. Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. **Ciência Rural**, v.47. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160113>
- GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Collossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 32:426-431. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x>
- HUMMEL, B. C. W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 12, p. 1393-1399, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1139/o59-157>.
- Iregui, C., Hernández, E., Jiménez, A., Pulido, A., Rey, A., Comas, J., Peña, C. & Rodríguez, M. 2004. Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia, Universidad Nacional de Colombia, **Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia**, 1: pp 9-45.
- KITAGIMA RE, FRACALOSSO DM .2011. Digestibility of alternative protein-rich feedstuffs for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 42(3), 306–312. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2011.00468.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00468.x)
- KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p.43-81, 2000. DOI: [10.1080/10408690091189266](https://doi.org/10.1080/10408690091189266).
- LEWANDOWSKI, V., SARY, C., SCHULLER, J.M., DIETERICH, F., FEIDEN, A., SIGNOR, A., BOSCOLO, W.R. Hidrolisados proteicos em dietas para larvas de peixes. **Revista Acadêmica Ciência Agrária e Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 277-282, 2014.
- LOVELL, R.T. Nutrition and feeding of fish . 2.ed. Boston: Kluwer Academic, 1998. 267p.
- LUO Z, LIU C-X, WEN H. 2012. Effect of Dietary Fish Meal Replacement by Canola Meal on Growth Performance and Hepatic Intermediary Metabolism of Genetically Improved Farmed Tilapia Strain of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Reared in Fresh Water. **Journal**

of the **World Aquaculture Society**, 43(5), 670–678. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2012.00601.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00601.x).

MARCHISELLO, s. 2019. Pathophysiological, molecular and therapeutic issues of nonalcoholic fatty liver disease: an overview. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1948.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. 2005. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 383-387. DOI: [10.1016/j.biortech.2004.04.008](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.008).

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. 2003. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 262 – 267. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000200003>.

MO WY, MANA YB, ZHANGA F, WONG MH. 2019. Fermented food waste for culturing jade perch and Nile tilapia: Growth performance and health risk assessment based on metal/oids. **Journal of Environmental Management**, 236 (2019) 236–244. DOI: [10.1016/j.jenvman.2019.01.102](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.102).

MORAES, A.C., PRADO, ED J.R., FOZ, E.P., BARBUIO, R., FARIA, V.P. & BELO, M. A. 2018 . Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilapias do Nilo durante aerocistite infecciosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.38(8):1570-1576.<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5533>

MOURA, G.S., OLIVEIRA, M.G.A. E LANNA, E.A.T. 2012. Atividade de tripsina no quimo de tilápia- tailandesa submetida a diferentes temperaturas da água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38: 2086-2090. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100002>.

NRC (National Research Council). 2011. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington D.C.: The National Academies Press.** 376 p.

OSTASZEWSKA, T., DABROWSKI, K., KWASEK, K., VERRI, T., KAMASZEWSKI, M., SLIWINSKI, J. & NAPORA-RUTKOWSKI, L. 2011. Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the morphology of the liver and intestine of 46 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. **Aquaculture Research**, 42(12): 1796-1806. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02779.x>.

PARK WH, YOU BR. 2010. Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicol in Vitro**. 24(5): 1356-62. DOI: [10.1016/j.tiv.2010.04.009](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.009)

PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; BARROS, M. M.; PINTO, L. G. Q.; PEZZATO, A.; FURUYA, W. M. 2000. Valor nutritivo do farelo de coco para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 22, n. 3, p. 695-69. DOI: [10.4025/actascianimsci.v22i0.2924](https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v22i0.2924).

PINER, P.; UNERB, N. 2013. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosadin the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 36, p. 956–963.

RAŠKOVIĆ, B., ČIČOVAČKI, S., ĆIRIĆ, M., MARKOVIĆ, Z., & POLEKSIĆ, V. 2011. Integrative approach of histopathology and histomorphometry of common carp (*Cyprinus carpio* L.) organs as a marker of general fish health state in pond culture. **Aquaculture Research**, V. 47, n.11, p 3455-3463. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/are.12795>

ROCHA, J. D. M; ROSSETTO, J. F.; SILVA, T. C.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. 2021. Proteína hidrolisada de frango em dietas para alevinos de tilápia. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, e154101421796, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21796>

SANCHES-ALVES, D. R., SILVA, T. C., ROCHA, J. D. M., OLIVEIRA, S. R., SIGNOR, A., BOSCOLO, W. B. 2019. Compelling palatability of protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaíso, v. 47, n. 2, p. 371-376. <http://dx.doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-19>.

SANTOS EL, LUDKE MCM, BARBOSA JM, RABELLO CBV, LUDKE JV, WINTERLE WMC, SILVA EG. 2009. Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 10: 390-397. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v22i0.2924>.

SANTOS MQC, OISHI CA, PEREIRA FILHO M, LIMA MAC, ONO EA, AFFONSO EG. 2010. Physiological response and performance of tambaqui fed with diets supplemented with Amazonian nut. **Ciência Rural**, 40(10). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010001000021>

- SARY C, PARIS LD, BERNARDI DM, LEWANDOWISKI V, SIGNOR A, BOSCOLO WR .2017. Tilapia by-product hydrolysate powder in diets for Nile tilapia larvae. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 39 (1), 1. Doi: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i1.32805>
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E. ET AL. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**. 9, 676–682. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- 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 Agropecuaria Brasileira*, n. 52, p. 485-492, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000700002>
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T. & Tomasi, V. 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts, **Journal Fish Diseases**; 21: pp 177-184.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; KRAUSE, R. A.; MEURER, F.; NATALI, M. R. M. AND BOMBARDELLI, R. A. 2014. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture Research** 45:1425-1433. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.12087>
- USHER, M.L.; STICKLAND, N.C.; THORPE, J.E. 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. **Journal of Fish Biology**. Vol 44, p. 953-964. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01267.x>
- VALENTE, W., BARROS, H., MORAES-VALENTI, P., BUENO., G., CAVALLI, R. 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future, **Aquaculture reports**, v.19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611.X>
- WOLD, P. A.; HOEHNE-REITAN, K.; CAHU, C. L.; INFANTE, J. Z.; RAINUZZO, J.; KJORSVIK, E. 2009. Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: Effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Aquaculture Nutrition**, 15(1), 73–84. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00569.x>)
- Wolf, J. C., & Wolfe, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicologic pathology**, 33(1), 75–85. <https://doi.org/10.1080/01926230590890187>.

CAPÍTULO 4

PROTEÍNA HIDROLISADA DE PENAS COMO ADITIVO EM DIETAS PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

A pesquisa objetivou-se verificar o efeito da inclusão de proteína hidrolisada de penas em alevinos de tilápia do Nilo, no desempenho zootécnicos, respostas histológicas, atividades enzimáticas e estresse ao ar. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, com duração de 30 dias. Os exemplares foram advindo de piscicultura comercial na fase de alevinagem peso inicial médio de $\mu = 1,96 \pm 0,15$ g, distribuídos inteiramente casualizado 720 exemplares com em 24 aquários de 120 L, totalizando seis tratamentos e quatro repetições. As rações foram formuladas de maneira a serem isoprotéicas e isoenergéticas, com níveis de inclusão de proteína hidrolisada de penas, sendo: T₁: 0% (sem a adição de PHP), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4% e T₆: 5%. Ao final do experimento, verificaram-se os parâmetros de desempenho zootécnicos, respostas histológicas, atividades enzimáticas e estresse ao ar em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os peixes que foram alimentados com PHP apenas após 1 grama, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para o desempenho produtivo e análises biométricas das vísceras dos exemplares. As enzimas digestivas lipase, maltase e amilase apresentaram melhores absorção nos tratamento de 1% de inclusão do ingrediente teste, onde os piores resultados, correspondendo aos níveis mais reduzidos de absorção foram encontrados no tratamento 4 e 5%. Tal fato, pode esta relacionado com qualidade e quantidade de proteína, sendo que este fator pode limitar o crescimento, caso não atenda às necessidades da espécie alvo do cultivo. Entretanto, não observou-se melhores resultados no desempenho zootécnicos, com o aumento dessas taxas de ingestão.

Palavras-chave: Aditivo, enzimas digestivas, peixe, metabolismo, aditivo.

Abstract

The research aimed to verify the effect of the inclusion of hydrolyzed feather protein in Nile tilapia fingerlings on zootechnical performance, histological responses, enzymatic activities and air stress. The experiment was conducted at the Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, with a duration of 30 days. The specimens came from commercial fish farming in the nursery phase, average initial weight of $\mu = 1.96 \pm 0.15$ g, distributed in a completely randomized 720 specimens with 24 aquariums of 120 L, totaling six treatments and four replications. The rations were formulated to be isoproteic and isoenergetic, with levels of hydrolyzed feather protein inclusion, as follows: T₁: 0% (without the addition of PHP), T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4% and T₆: 5%. At the end of the experiment, zootechnical performance parameters, histological responses, enzymatic activities and air stress were verified in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. The fish that were fed with PHP only after 1 gram showed no statistical differences ($p > 0.05$) for productive performance and biometric analysis of the viscera of the specimens. The digestive enzymes lipase, maltase and amylase showed better absorption in the treatment of 1% inclusion of the test ingredient, where the worst results, corresponding to the lowest levels of absorption were found in the treatment 4 and 5%. This fact may be related to the quality and quantity of protein, and this factor can limit growth if it does not meet the needs of the target species of cultivation. However, better results were not observed in the zootechnical performance, with the increase of these ingestion rates.

Keywords: Additive, digestive enzymes, fish, metabolism, additive.

Introdução

Em função do aumento do consumo de pescados no Brasil e no mundo, estima-se que a produção total de peixes deverá aumentar para 204 milhões de toneladas em 2030 (FAO, 2020). Para atender essa demanda crescente, a aquicultura está crescendo a cada ano, uma vez que a produção da pesca extrativista encontra-se estagnada.

De acordo com o IBGE (2020), nos últimos 5 anos verificou-se aumento de cerca de 25% na produção de peixes de água doce do Brasil, o que representa quase 90% da produção aquícola do país. Sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) principal espécie de água doce cultivada no Brasil, destacando-se pelo rápido crescimento, reprodução precoce e parcelada e alta prolificidade, proporcionando a produção de grandes quantidades de alevinos, além de apresentar resistência às doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e em ambientes adversos e estressantes, o que a impulsionou como principal espécie da piscicultura brasileira (VALENTI et al., 2021; SILVA et al., 2015).

Para acompanhar esse aumento de produção aquícola, é preciso fornecer dietas balanceadas com níveis adequados de aminoácidos e proteínas, evitando o estresse nutricional e diminuição na produção (WU et al., 2021).

Uma das fontes de proteína animal muito utilizada na piscicultura é a farinha de peixe. No entanto, sua falta no mercado mundial leva à busca de um substituto adequado, como o hidrolisado de pescado (sardinha e de carcaça de tilápia), hidrolisado de fígado de suínos (SILVA et al., 2012), hidrolisados proteico obtido a partir de subprodutos de processadoras avícolas (HISANO e PORTZ, 2007), entre outros. O aproveitamento desses resíduos sólidos das indústrias alimentícias agregar valor ao material residual e proporcionar vantagens econômicas para as indústrias processadoras e de ração e minimizar o impacto ambiental (HISANO; BORGHESI, 2015).

O hidrolisado proteico é um produto, fruto da aplicação de uma metodologia de biotecnologia desenvolvida para melhorar propriedades funcionais e nutricionais de subprodutos da indústria animal e transformá-los em ingredientes dietéticos com alto valor proteico e digestibilidade adequada da proteína, possibilitando a conversão de proteínas em peptídeos funcionais e com balanceamento de aminoácidos (BUI et al., 2014). São misturas complexas de peptídeos e aminoácidos, resultantes da clivagem de ligações peptídicas da cadeia proteica. Em geral, a escolha do método ocorre conforme análise das características do substrato proteico, disponibilidade de insumos adequados para a hidrólise, qualidade do produto final e aplicações pretendidas (HOU et al., 2017).

Considerando a composição majoritariamente proteica, o baixo custo e as quantidades consideráveis de penas produzidas pela indústria avícola, estes subprodutos são recurso atrativo e valioso para a obtenção de hidrolisados proteicos, cujas propriedades funcionais dependem do método de conversão adotado (LASEKAN et al., 2013; LEMES et al., 2016). A hidrólise de substratos queratinosos pode ser realizada por meio de métodos químicos (ácidos ou alcalinos), enzimáticos ou microbianos (SINKIEWICZ et al., 2018).

No entanto, as potenciais atividades biológicas de hidrolisados de penas são amplamente desconhecidas (BRANDELLI et al., 2015). Isso representa amplo campo a ser explorado, especialmente pelo fato de estes materiais queratinosos serem recursos renováveis, amplamente disponíveis e de baixo custo (LEMES et al., 2016).

Diante disto, o uso de hidrolisados proteicos provenientes das indústrias alimentícias, tem despertado interesses científicos e tecnológicos, visto que esses co-produtos possuem em suas composições proteínas que podem ser precursoras de peptídeos com atividades biológicas. Esta pesquisa objetiva-se caracterização do desempenho zootécnicos, respostas histológicas, atividade enzimática e estresse ao ar de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com proteína hidrolisada de penas.

Metodologia

O estudo foi desenvolvido 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 estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Protocolo N°/42-19) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Delineamento experimental

Utilizou-se 720 exemplares com peso inicial médio de $\mu = 1,96 \pm 0,15$ g e comprimento médio de $\mu = 4,26 \pm 0,14$ cm. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 24 caixas de polietileno com capacidade para 210 litros, em sete tratamentos com três repetições, totalizando 120 animais por unidade experimental.

Estrutura experimental

A estrutura experimental apresentava sistema com recirculação de água, filtro mecânico, aeração e aquecimento constante sendo realizado sifonamentos diários. Durante o

período experimental foram monitorados semanalmente os parâmetros de qualidade de água utilizando o multiparâmetro portátil (modelo YSI-PRO PLUS).

Ingrediente alternativo

A proteína hidrolisada de penas (PHP), foi disponibilizada pela empresa BRF Ingredient's® (Toledo-PR, Brasil). Sendo coproduto resultante da indústria avícola, obtido através do procedimento de hidrólise enzimática (Tabela 1, 2, 3 e 4).

Tabela 1. Composição química da proteína hidrolisada de penas (matéria seca como linha de base)

Ingrediente alternativo	
Composição química	Proteína hidrolisada de penas
Matéria seca (g.kg ⁻¹) ^a	962,74
Proteína bruta (g.kg ⁻¹) ^a	763,33
Gordura bruta (g.kg ⁻¹) ^a	26,12
Energia bruta (kJ.g ⁻¹) ^a	20,52
Aminoácidos essenciais (EAA) (g.kg ⁻¹) ^{bc}	
Arginina	48,6
Histidina	7,16
Isoleucina	37,91
Leucina	63,66
Lisina	20,04
Metionina	6,95
Fenilalanina	38,63
Treonina	32,50
Triptofano	4,25
Valina	80,28
EAA total	339,98
Aminoácidos não essenciais (NEAA) (g.kg ⁻¹) ^b	
Ácido aspártico	57,43
Ácido glutâmico	83,61
Alanina	37,59
Cistina	20,98
Glicina	60,65
Prolina	73,74
Serina	77,48
Taurina	1,45

Tirosina	25,13
Total NEAA	438,06
Aminoácidos totais	778,04

Tabela adaptada.

Fonte: Marjana dos Santos Cardoso et al. (2021).

^aValores determinados no Laboratório de Análise de Alimentos (LQA) -Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura - GEMAQ-Unioeste, Toledo-PR.

^bLaboratório Comercial (CBO Análises Laboratoriais Ltda., Valinhos-SP, Brasil.

^cValores da análise realizada em triplicata.

Tabela 2. Propriedades antioxidantes dos hidrolisados proteicos

Amostra	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol de TE/g amostra}$)		
	ABTS	DPPH	FRAP
PHP	$23,86 \pm 1,98$	$116,94 \pm 1,93$	$90,48 \pm 0,74$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

Tabela 3. Propriedades anti-hipertensivas dos hidrolisados proteicos

Amostras	Atividade anti-hipertensiva (inibição % da ECA)
PHP	$47,29 \pm 0,99$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 4$) \pm desvio padrão.

Tabela 4. Propriedades antidiabéticas dos hidrolisados proteicos

Amostra	Inibição (%) da atividade da α -glicosidase	Inibição (%) da atividade da α -amilase
PHP	$15,74 \pm 1,16$	$30,57 \pm 1,36$

Os resultados estão expressos como a média ($n = 4$) \pm desvio padrão

Dietas experimentais

As rações experimentais foram formuladas de maneira a serem isoprotéicas (40 % PB) e isoenergéticas (4000 kcal de ED/kg), com inclusão ou ausência de inclusão de PHP, sendo: T₁: 0% (sem a adição de PHP) controle, T₂: 1%, T₃: 2%, T₄: 3%, T₅: 4%, T₆: 5%, respectivamente (Tabela 1). O cálculo da quantidade de inclusão dos hidrolisados proteicos nas dietas foi baseado na matéria seca do produto.

Tabela 5. Composição das dietas experimentais utilizando proteína hidrolisada de penas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (com base na matéria seca).

INGREDIENTES	Tratamentos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Arroz quirera	70,34	69,98	69,63	69,27	68,92	68,56
Trigo farelo	0,00	0,56	1,12	1,69	2,25	2,82
Vísceras farinha aves	274,61	269,69	264,76	259,84	254,92	250,00
Hidrolisado de penas	0,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
Fubá de milho	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00
Farinha de peixe tilápia 58	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	0,00
Sangue farinha	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00
Soja farelo 45%	281,45	282,16	282,86	283,57	284,27	284,98
Carne e osso farinha 45%	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00
Óleo de soja	30,00	30,57	31,14	31,71	32,29	32,86
Calcário	0,00	1,12	2,25	3,37	4,50	5,62
Cloreto de colina	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
DI-metionina	2,47	2,59	2,70	2,82	2,93	3,05
Fosfato bicálcio	0,00	1,77	3,55	5,32	7,10	8,87
L-lisina hcl	1,53	1,91	2,30	2,69	3,08	3,46
L-treonina	4,02	4,06	4,09	4,12	4,15	4,18
Sal comum	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Vitamina c	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85	2,85
Antifúngico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Níveis Nutricionais						
Amido	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Cálcio (%)	2,18	2,18	2,17	2,17	2,16	2,16
ED tilápia (Kcal/ kg)	3420,59	3416,47	3412,35	3408,23	3404,11	3400,00
Fenil Total (%)	1,86	1,87	1,87	1,88	1,88	1,89
Fenil + Tir. Total (%)	2,91	2,95	2,99	3,03	3,08	3,12
Fosforo total (%)	1,33	1,33	1,32	1,32	1,32	1,32
Gordura (%)	9,09	9,01	8,93	8,84	8,76	8,67
Histidina Total (%)	1,01	1,00	0,99	0,98	0,97	0,96
Isoleucina Total (%)	1,49	1,49	1,50	1,51	1,51	1,52
Leucina Total (%)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Metionina Total	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Proteína bruta (%)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Proteína Digestível Peixes (%)	34,61	34,62	34,62	34,63	34,64	34,64
Treonina Total (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Triptofano Total (%)	0,45	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Valina Total (%)	2,05	2,09	2,13	2,17	2,21	2,25
Vitamina C (mg/kg)	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99	999,99

Níveis de garantia por quilograma do produto: vit. A -500.000 UI; vit. D3-200.000 UI; vit. E -5.000 mg; vit. K3-1.000 mg; vit. B1-1.500 mg; vit. B2-1.500 mg; vit. B6-1.500 mg; vit. B12-4.000 mg; ácido fólico -500 64mg; pantotenato de cálcio -

4.000 mg; vit. C -15.000 mg; biotina -50 mg; inositol -10.000 mg; nicotinamida -7.000 mg; 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.

Os ingredientes vegetais utilizados foram triturados em moinho do tipo martelo, quando necessário, pesados, misturados ao hidrolisado, extrusados em extrusora ExMicro® em matriz de 2 mm e secos em estufa de ar forçado a 55 °C por 24 h para retirada da umidade adquirida para processamento das rações.

Os ingredientes foram triturados (0,3 mm), peneirados, processados em moinho do tipo martelo (modelo MCs 280, marca Vieira Moinhos e Martelo, Tatui-SP, Brasil), pesados, umedecido com 20% de água e homogeneizados por 15 minutos em um misturador mecânico tipo 'Y' (modelo MA 200, marca Marconi Equipamentos Laboratoriais, Piracicaba-SP, Brasil). Posteriormente as dietas foram extrusadas com 2,0 mm de diâmetro em um equipamento modelo Ex-Micro® com capacidade de produção de 10 kg.h⁻¹, secas em estufa de ar forçado a 55 °C por 24 h (Modelo TE-394/3-D (marca Tecnal Equipamentos Científico para Laboratórios, Piracicaba-SP, Brasil). Incluiu-se o óleo de soja pelo método de aspersão. As dietas foram retidas em câmara fria (4 °C), para a melhor conservação.

Arraçoamento

O arraçoamento foi realizado seis vezes ao dia (08h00, 10h00, 12h00, 14h00, 16h00 e 18h00), até a saciedade aparente. Ao final do dia, as excretas e restos alimentares e filtros eram sifonadas.

Qualidade de água

As variáveis físico-químicas da água foram monitoradas utilizando uma sonda multiparâmetro portátil, para mensuração de temperatura, oxigênio dissolvido saturado, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH.

Análises bromatológicas

Para a determinação das análises bromatológicas, amostras de cada uma das dietas experimentais e cinco peixes inteiros de cada uma das repetições foram armazenados em freezer (-20 °C) até o momento das análises (n= 20 peixes por tratamento). Para realização das análises os peixes foram secos previamente em estufas (55 °C por 72 horas) para determinação da umidade, triturados e posteriormente analisadas conforme as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2004), com exceção da análise de energia bruta, que foi determinada por

meio de bomba calorimétrica (IKA[®]C2000), ambas realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) do GEMAAq.

Desempenho produtivo

Após o período experimental, todos os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e anestesiados em solução de benzocaina 100 mg/L (OKAMURA et al., 2010) e avaliados individualmente. A tomada de medidas e os cálculos para o desempenho produtivo foram determinados de acordo com o NRC (2011).

Para os aspectos de desempenho produtivo, avaliou-se:

- PMI = peso inicial médio; (g);
- PMF= Peso médio final;
- GP: Ganho de peso médio (g): (Peso final médio – Peso inicial médio);
- GPD= Ganho de peso diário (g) (Ganho de peso final/Quantidade de dias experimentais);
- CAA= conversão alimentar aparente (CR: consumo de ração / GP: ganho de peso);
- TEP= Taxa de eficiência proteica (%) (ganho em peso/Proteína bruta consumida)* 100;
- TCE (%)= Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) [(ln PFM) – (ln PIM)/ Período experimental] (ln =Logaritmo neperiano);
- CF= Comprimento final (cm): (Comprimento final- Comprimento inicial);
- SO (%) = Sobrevivência;

Dez peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados em solução de benzocaina 200 mg.L⁻¹(GOMES et al., 2001), sendo cinco peixes para a avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes e cinco para a coleta de material da cavidade celomática e histologia para os cálculos dos índices:

- PE: Peixe eviscerado;
- IHS (%) = Índice hepatossomático: [peso do fígado (g)*100/peso final (g)];
- IGV (%): Índice de gordura viscerossomática (peso da gordura(g)/ peso do peixe (g) * 100);
- IVS (%) = Índice viscerossomático (peso do vísceras (g)/ peso do peixe (g) * 100);
- CI= Comprimento do intestino (cm).

Análises histológicas- Intestino

Para as análises histomorfológicas das vilosidades intestinais foi retirado segmento transversal da porção medial dos intestinos dos peixes, fixados em solução Alfac durante seis horas e conservados em etanol 70° para remoção do fixador até serem processadas.

Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos por secções seriadas de 7 µm e coradas em Hematoxilina-Eosina e ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e alcian blue (AB) pH 2,5, em seguida as lâminas foram analisadas em microscopia de luz mensurando segundo a altura dos vilos (distância do topo das vilosidades ao início da camada muscular), largura dos vilos (distância do topo de um enterócito ao topo do enterócito do lado oposto), espessura da túnica (distância total da camada muscular circular e longitudinal), número de células caliciformes e número total de vilos, na objetiva de 20X e 40X.

Análises histológicas - Fígado

Para análise histológica do fígado, os materiais coletados foram fixados em solução Alfac durante seis horas e conservados em etanol 70° para remoção do fixador até serem processadas. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos por secções seriadas de 7 µm e coradas em Hematoxilina-Eosina.

Para as amostras de fígado, os hepatócitos foram quantificados em lente objetiva de 40X e seus diâmetros, área e volume foram tomados com o auxílio de lente objetiva de 100X (50 núcleos de hepatócitos por lâmina). Em ambas análises, utilizou-se o software cellSens Standard 1.15[®] para obtenção das imagens e posterior avaliação.

Foram realizadas medidas do perímetro do núcleo do hepatócito (µm) e área (µm²), volume nuclear do hepatócito ($H_{nv}(\mu\text{m}^3) = 4/3 \pi r^3$), onde o r corresponde ao raio nuclear. As mensurações foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagem Image Pro Plus[®] (version 4.5, Media Cybernetics, USA) e Fiji ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>) (SCHINDELIN et al. 2012).

A avaliação qualitativa de vacuolização hepática foi realizada de acordo com critérios estabelecidos por Caballero et al. (2004). Foi atribuído um *escore* de vacuolização, onde 0= não observado, 1= poucos vacúolos, 2= vacuolização média, 3= vacuolização severa.

Análises histológicas – Músculo

Os fragmentos musculares dos exemplares foram retirados das regiões dorsal (epiaxial). Os peixes foram eutanasiados para a coleta das amostras musculares com benzocaína a 200 mg

L-1, seguida de corte na secção medular, com auxílio de uma lâmina para retirada das amostras de músculo.

As quais foram acondicionadas em solução de alfac por 24 horas e, em seguida, preservadas em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, embebidas em parafina histológica e após emblocadas.

Após o emblocamento das amostras de músculo, foram realizados cortes de 7µm de espessura, corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) descrito por Behmer et al., 1976 e, posteriormente verificado o menor diâmetro de pelo menos 200 fibras de cada peixe em 10 lâminas, totalizando 2000 fibras medidas para cada tratamento, em ocular de 10x. Para avaliar o padrão de crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura branca serão classificados em três classe de acordo com sua morfometria e mensuração do menor diâmetro (ALAMI-DURANTE et al. 2010; ALMEIDA et al. 2010).

Avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes

Para a avaliação das enzimas digestivas e antioxidantes, os peixes foram alimentados uma hora antes de serem submetidos a eutanásia. Após isso, realizou-se a retirada imediata do fígado e intestino integralmente e armazenados em microtubos.

O material coletado foi congelado individualmente em nitrogênio líquido e conservado em freezer a -80 °C. As amostras (a) foram homogeneizadas em tampão PBS (Tampão Fosfato Salina) (t) (1:10, a/t) pH 7,4 com homogeneizador (IKA T10 Basic) e centrifugado a 3.500 RPM por 10 minutos (4 °C), o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

A quantificação dos níveis totais de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como padrão, a fim de padronização dos dados, as amostras foram normalizadas para 1 µmol.mg proteína⁻¹ com auxílio de solução tampão TBE. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade das enzimas digestivas no intestino dos peixes, amilase (BERNFELD, 1955), lipase (ALBRO et al., 1985), maltase (CORRÊA et al., 2007). A tripsina e quimotripsina foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Hummel et al, 1959.

Ao avaliar a atividade enzimática no fígado dos peixes, as seguintes enzimas foram avaliadas: determinação da atividade de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), alanina

aminotransferase (TGP) via kit comercial da marca gold Analisa®, e determinada a atividade da peroxidação de lipídios (LPO/TBARS) (FEDERICI et al., 2007). O GSH A atividade da catalase foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Aebi (1984) e Federici et al. (2007), respectivamente. As análises supracitadas foram realizadas também para os animais que passaram pelo estresse ao ar.

Estresse ao ar

Para a realização dos testes, os animais foram cuidadosamente sifonados em tigelas de plástico, contados e mantidos em recipientes com 2 L de água limpa em sistema de banho termostático (27 ° C). Cada recipiente recebeu 10 espécimes que permaneceram em jejum de 12 horas. Após o jejum, o volume de cada recipiente, junto com os animais, foi vertido em uma peneira de 0,5 mm de diâmetro, submerso em água para evitar lesões pelo contato direto com a malha da peneira. Em seguida, a peneira foi retirada da água, coberta com uma tela para evitar a evasão e colocada em papel secante para retirar o excesso de umidade. A partir deste momento, os exemplares foram expostos ao ar por 7 minutos.

Após o respectivo tempo de exposição ao ar, cada peneira foi submersa e os animais novamente colocados nos recipientes de 2 litros. Após 24 horas, a taxa de resistência ao estresse (Re em %) foi determinada, com base na porcentagem de sobrevivência. Para calcular essa taxa, foram contados os animais vivos de todas as repetições de cada tratamento. A comparação entre os tratamentos foi feita por um estudo de dispersão de frequência, utilizando o teste exato de Fisher, a 5% de probabilidade.

Para a análise enzimática dos peixes expostos ao estresse ao ar, foram coletados os fígados antes do estresse (Sem estresse- SE), 7 minutos após estresse (7 min.) e 24 horas após estresse (24 hrs).

Análises estatísticas

Para fins estatísticos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de *Levine*, para médias homogêneas submeteu-se a *one-way* (ANOVA) com posterior teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância. Para dados que não atenderam ao pressuposto de homogeneidade procedeu-se a análise de *Kruskal-Wallis*. Foi utilizado o programa estatístico computacional *Statistic 7.1* (2005).

Resultados e discussão

Os parâmetros de qualidade de água, durante o período experimental foram satisfatórios para o cultivo de tilápias, de acordo com os limites recomendados pela resolução nº. 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2005).

Tabela 6. As variáveis físico-químicas da água do experimento utilizando proteína hidrolisada de penas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Parâmetro	Tratamentos					
	Controle	1%	2%	3%	4%	5%
¹ T (°C)	30,40 ± 0,35	30,60 ± 0,27	30,42 ± 0,33	30,62 ± 0,35	30,52 ± 0,22	30,37 ± 0,72
² O.D (%)	50,77 ± 21,06	59,35 ± 3,23	60,67 ± 7,00	63,22 ± 2,02	62,47 ± 6,65	62,60 ± 4,04
³ O.D (mg/L)	6,92 ± 1,13	7,47 ± 0,34	6,42 ± 0,59	7,68 ± 0,25	7,61 ± 0,58	6,47 ± 0,38
⁴ C	106,85 ± 0,29	108,72 ± 0,81	107,22 ± 2,19	106,55 ± 1,43	106,40 ± 2,32	107,57 ± 3,86
⁵ pH	7,28 ± 0,06	7,35 ± 0,03	7,36 ± 0,04	7,32 ± 0,05	7,09 ± 0,05	7,14 ± 0,05

¹T: Temperatura; ^{2,3}O.D: Oxigênio dissolvido; ⁴C: Condutividade.

Os peixes que receberam dietas com inclusão do ingrediente teste (PHP), apresentaram melhores resultados no teor de proteína corporal, quando comparados ao tratamento controle, sendo que os melhores resultados foram no tratamento 2 e 5%.

Britto et al. (2014) destacam que o conhecimento da composição corporal dos peixes é necessário para o aumento de sua aceitação como alimento alternativo e assim competir com outras fontes proteicas largamente utilizadas, como as carnes bovina, suína e de aves.

Tabela 7. Composição bromatológica dos peixes e dietas experimentais utilizando proteína hidrolisada de penas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Parâmetros	Peixe						P VALOR
	Tratamentos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
PB ¹	47,86 ± 3,17 ^b	48,90 ± 0,71 ^{ab}	52,24 ± 1,86 ^a	49,41 ± 1,65 ^{ab}	50,74 ± 2,28 ^{ab}	52,93 ± 0,81 ^a	*
MS ²	96,21 ± 0,37	95,36 ± 0,75	96,01 ± 0,32	95,64 ± 0,80	96,18 ± 0,26	95,20 ± 0,11	ns
EE ³	38,50 ± 0,04 ^d	35,81 ± 0,47 ^a	29,19 ± 0,66 ^c	35,65 ± 0,33 ^a	34,79 ± 0,37 ^{ab}	33,87 ± 0,65 ^b	*
MM ⁴	12,96 ± 0,72	14,57 ± 1,17	14,35 ± 0,44	12,86 ± 0,10	12,60 ± 0,82	13,19 ± 0,23	ns
	Ração						
PB ¹	43,01 ± 0,10 ^b	44,26 ± 0,32 ^{ab}	45,59 ± 0,19 ^a	45,04 ± 0,79 ^a	44,51 ± 0,05 ^a	44,36 ± 0,99 ^{ab}	*
MS ²	94,74 ± 0,95	94,39 ± 0,13	94,33 ± 1,61	95,18 ± 1,16	94,33 ± 1,10	94,91 ± 1,15	ns
MM ⁴	10,18 ± 1,61	9,38 ± 0,60	11,26 ± 0,42	10,92 ± 0,07	10,69 ± 0,05	10,53 ± 0,94	ns

¹PB: Proteína Bruta; ²MS: Matéria Seca; ³EE: Extrato etéreo; ⁴MM: Matéria Mineral. *Valores médios seguidos por letra minúscula diferente, na mesma linha, indicam efeito significativo no fator GH pelo teste de Tukey (P<0,05).

Fracalossi et al. (2012) ressaltam que os parâmetros relacionados ao desempenho zootécnico são os aspectos mais importantes para expressar a resposta dos peixes às dietas e ingredientes experimentais, uma vez que é a medida com maior aplicabilidade na produção, onde se espera por maior produtividade e consequente lucratividade pela maior biomassa.

Na presente pesquisa não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) para o desempenho produtivo e análises biométricas das vísceras dos exemplares (Tabela 8). Assim, pode-se observar que o ingrediente teste não compromete as análises supracitadas na fase de alevinagem, sendo esses exemplares expostos ao ingrediente teste (PHP) após média de 1 grama.

Tal fato pode ter ocorrido devido a relação dos principais substratos de energia para o funcionamento corporal dos exemplares (Carboidratos, proteínas e lipídios). As tilápias aproveitam bem os lipídios e carboidratos como fontes de energia. Esses nutrientes, em níveis adequados, possibilitam preservar a proteína dietética para o crescimento (KUBITZA, 2011). Assim, o desequilíbrio das fontes de energia não proteicas na dieta, e/ou seus níveis de inclusão, podem ter efeito direto sobre o desempenho e composição corporal dos peixes (ERFANULLAH, 1998), por isso, é necessário à determinação da concentração energética mais adequada para as diferentes espécies em diferentes períodos de vida.

Tabela 8. Valores de desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 30 dias de cultivo

Parâmetro	Tratamentos						P VALOR
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
¹ PMI (g)	1,91 ± 0,10	1,89 ± 0,07	2,00 ± 0,11	2,00 ± 0,24	1,99 ± 0,18	1,99 ± 0,19	ns
² PMF (g)	25,35 ± 1,45	24,74 ± 1,37	24,10 ± 1,40	24,31 ± 2,15	25,74 ± 1,53	24,28 ± 1,38	ns
³ GPM (g)	23,44 ± 1,46	22,85 ± 1,32	22,10 ± 1,32	22,31 ± 2,08	23,74 ± 1,47	22,29 ± 1,22	ns
⁴ GPD (g dia-1)	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,74 ± 0,07	0,79 ± 0,05	0,74 ± 0,04	ns
⁵ CAA	0,92 ± 0,15	1,05 ± 0,07	0,94 ± 0,16	1,07 ± 0,29	0,85 ± 0,24	0,90 ± 0,12	ns
⁶ TEP (%)	2,64 ± 0,49	2,26 ± 0,14	2,59 ± 0,45	2,38 ± 0,76	2,95 ± 0,74	2,66 ± 0,36	ns
⁷ TCE	1,69 ± 0,14	1,69 ± 0,07	1,53 ± 0,10	1,55 ± 0,25	1,61 ± 0,20	1,55 ± 0,17	ns
⁸ S (%)	91,67 ± 5,77	90,00 ± 7,20	92,50 ± 8,77	94,16 ± 3,19	93,33 ± 4,71	93,33 ± 7,20	ns
⁹ CF(cm)	10,47 ± 0,59	10,11 ± 1,11	9,98 ± 1,32	10,50 ± 0,23	10,78 ± 0,22	10,61 ± 0,12	ns
Índice Viscerosomático							
¹⁰ IHS (%)	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,03	ns
¹¹ IGS (%)	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,04	ns
¹² IVS (%)	0,61 ± 0,15	0,74 ± 0,26	0,82 ± 0,15	0,75 ± 0,12	0,85 ± 0,14	0,94 ± 0,24	ns
¹³ CI (cm)	56,37 ± 2,61	63,61 ± 11,40	56,06 ± 2,40	48,34 ± 7,68	55,37 ± 4,33	54,16 ± 11,50	ns
¹⁴ PE (g)	20,95 ± 1,77	20,22 ± 2,73	21,49 ± 1,69	20,07 ± 3,21	23,55 ± 2,41	21,63 ± 2,47	ns
24 horas após estresse ao ar							

¹⁵S (%) 100 ± 0,00 90,00±0,10 100,00±0,00 90,00±0,10 100,00±0,00 100,00±0,00 ns

¹PMI = peso inicial médio; (g). ²PMF= Peso médio final; ³GPM: Ganho de peso médio (g): (Peso final médio – Peso inicial médio). ⁴GPD= Ganho de peso diário (g) (Ganho de peso final/Quantidade de dias experimentais). ⁵CAA= conversão alimentar aparente (CR: consumo de ração / GP: ganho de peso). ⁶TEP= Taxa de eficiência proteica (%) (ganho em peso/Proteína bruta consumida)*100. ⁷TCE (%)= Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) [(In PFM) – (In PIM)/ Período experimental] (In =Logaritmo neperiano); ⁸¹⁵S (%) = Sobrevivência; ⁹CF (cm): Comprimento final- comprimento inicial; ¹⁰IHS (%) = Índice hepatossomático: [peso do fígado (g)*100/peso final (g)]; ¹¹IGV (%): Índice de gordura viscerossomática (peso da gordura(g)/ peso do peixe (g) * 100); ¹²IVS (%) = Índice viscerossomático (peso do vísceras (g)/ peso do peixe (g) * 100); ¹³CI: Comprimento do intestino (cm); ¹⁴PE: Peixe eviscerado; NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Para frequência do diâmetro das fibras nos peixes não houve diferenças significativa (p>0,05), porém ambos apresentaram maior número de fibras em desenvolvimento para alevinos classificados como médio (M) e pequeno (P), indicando um maior número de fibras em desenvolvimento, o que pode refletir em um maior crescimento muscular dos peixes durante o ciclo da vida (Tabela 9).

Tabela 9. Fibras musculares e frequência das fibras musculares de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 30 dias de cultivo

Músculos	Tratamentos						p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Fibras 5-10 (µm)	8,10 ± 0,55	8,45 ± 0,35	9,00 ± 0,64	8,83 ± 0,98	8,81 ± 0,46	8,91 ± 0,87	ns
Fibras 10-15 (µm)	12,16 ± 0,36	12,29 ± 0,51	12,50 ± 1,06	12,11 ± 1,26	12,49 ± 1,15	12,17 ± 1,30	ns
Fibras 15-20 (µm)	16,97 ± 0,71	16,30 ± 0,19	16,37 ± 0,66	16,20 ± 0,44	15,76 ± 0,58	16,07 ± 0,39	ns
	Frequência (%)						
Fibras 5-10	51,57	70,094439	22,38	32,61	28,04	27,86	ns
Fibras 10-15	40,08	29,485834	55,12	55,08	53,12	58,64	ns
Fibras 15-20	8,35	0,1049318	22,49	12,31	19,05	13,49	ns

NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Considera-se o fígado um órgão crucial para o metabolismo de nutrientes, sendo considerado um ótimo indicador para patologias nutricionais (RASKOVIC et al., 2011). Assim, o fígado pode apresentar alterações morfológicas por exposições à substâncias químicas, drogas e até mesmo pela alimentação desbalanceada, as quais são importantes causas de adaptações, lesão e até morte celular.

Os fígados das tilápias do Nilo que foram alimentadas com dietas contendo proteína hidrolisada de penas, caracterizou-se por apresentar apenas diferenças significativas no perímetro do hepatócito, onde a menor perímetro do hepatócito foi apresentada pelo tratamento controle (Tabela 10).

Portanto, as análises de números de hepatócitos, diâmetro (µm), Raio (µm) e volume (µm³) não sofreram alterações significativas, desta maneira podemos considerar que a PHP nesta fase de cultivo não comprometeu negativamente os animais experimentais.

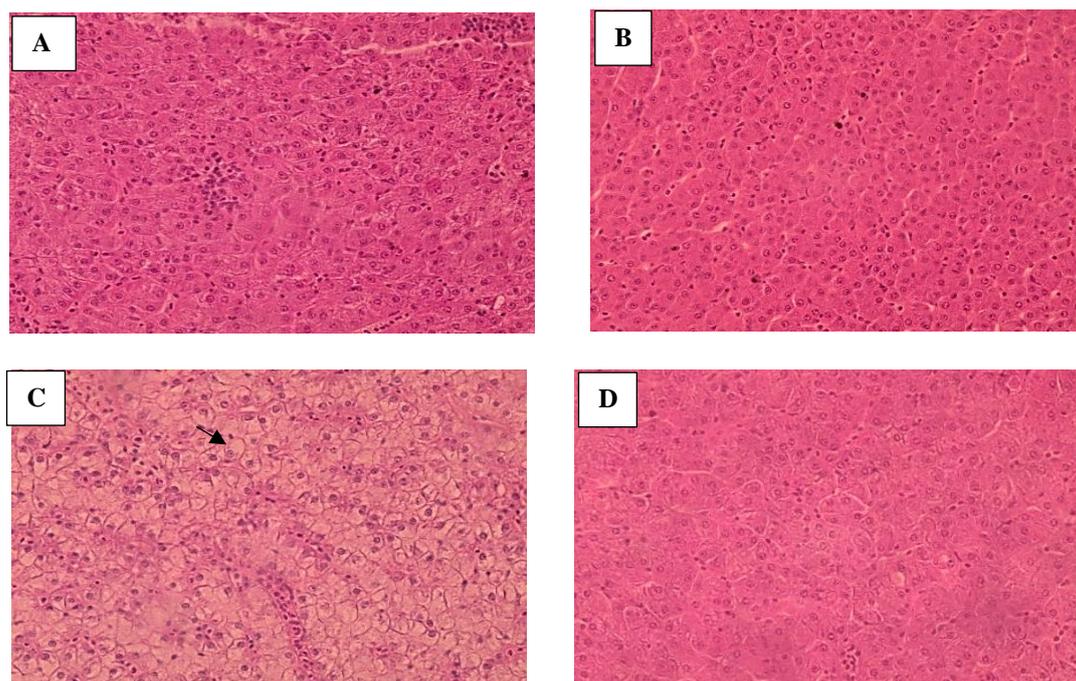
Tabela 10. Características morfométricas dos hepatócitos de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 30 dias de cultivo.

Fígado	Tratamentos						p-valor
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
NH ¹	524,00 ± 76,90	597,50 ± 190,73	510,11 ± 134,53	493,00 ± 65,67	579,28 ± 82,55	592,50 ± 114,86	ns
DN(μm) ²	3,66 ± 0,14	3,71 ± 0,16	3,60 ± 0,18	3,60 ± 0,10	3,64 ± 0,11	3,61 ± 0,09	ns
PN (μm) ³	10,06 ± 1,23 ^b	14,17 ± 1,51 ^a	13,36 ± 1,18 ^a	13,23 ± 0,38 ^a	13,32 ± 1,07 ^a	12,89 ± 0,89 ^a	*
RN (μm) ⁴	1,71 ± 0,15	1,71 ± 0,15	1,63 ± 0,11	1,62 ± 0,19	1,69 ± 0,24	1,64 ± 0,10	ns
VN (μm ³) ⁵	21,44 ± 5,41	22,76 ± 4,45	18,23 ± 3,81	20,56 ± 2,54	23,77 ± 2,60	18,87 ± 3,79	ns

¹NH: Número de hepatócitos; ²DN: Diâmetro do núcleo; ³PN – Perímetro do núcleo; ⁴RN- Raio do núcleo; ⁵VN - volume do núcleo. NS= não houve diferença significativa. * Diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey.

O fígado desempenha papel-chave na homeostase da glicose e lipídios dos animais. Quando os peixes se encontram adequadamente alimentados, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grande quantidade de lipídios (POSTIC, DENTIN & GIRARD, 2004; SANTOS et al., 2004).

Avaliando os hepatócitos dos animais experimentais, verificou-se pequenos vacúolos lipídicos ou ausência de vacúolos nos tratamentos estudados. Desta forma, observa-se que os alevinos alimentados com proteína hidrolisada de penas, sendo de forma mais expressiva no tratamento com a inclusão de 2, 4 e 5% apresentaram depósito de gordura no fígado, caracterizando esteatose hepática (Figura 1).



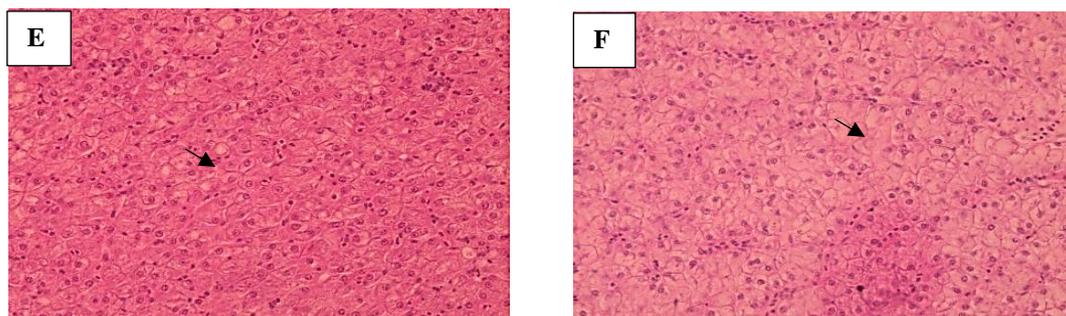


Figura 1. Vacuolização de hepatócitos em diferentes graus (H.E. 40X). (a) Limite celular do hepatócito definido e núcleo bem marcado (score = 0); (b) Presença de pequenos vacúolos intracelulares, porém sem alteração de formato e posicionamento do núcleo dos hepatócitos (score= 1); (c) Hepatócitos com vacúolos aparentes e mais volumosos, (score= 2); (d) Vacuolização intensa do citoplasma, perda do formato celular presença e núcleo periférico (score=3). Legendas das imagens: A- controle; B- 1%; C- 2%; D- 3%; E- 4%; F- 5%; G- Controle comercial.

As alterações observadas no fígado de tilápia do Nilo, são indicativos de saturamento do órgão. As modificações observadas no fígado como esteatose hepática, fígado pálido e deposição de glicogênio em excesso podem ser atribuídas ao metabolismo de degradação das proteínas (Transaminação/desaminação oxidativa) (HONORATO et al. 2013).

Portanto o excesso de proteína ou o desbalanço dela nas dietas ofertadas, proporcionam ações desfavoráveis aos animais. Assim, formulação de dieta desbalanceada pode causar disfunção metabólica, considerada uma condição patológica (TUCKER JÚNIOR; LELLIS; VERMEER, 2001). No entanto, o acúmulo de lipídios no fígado pode ser uma adaptação fisiológica relacionada ao período de vida (CRAIG et al., 2000).

Para as avaliações histológicas do intestino verificaram-se maiores alturas da vilosidade e maior altura da túnica no tratamento 4% de inclusão do ingrediente teste (Tabela 7). Quanto maior o tamanho da vilosidade intestinal, maior a capacidade de absorção de nutrientes pelo animal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; MORAES e ALMEIDA, 2014). Mesmo apresentando essa diferença significativa na morfologia do intestino, isso não foi o suficiente para alterar dados de desempenho produtivos dos animais experimentais.

Tabela 7. Histologia dos intestinos de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 30 dias de cultivo.

Intestino	Tratamentos						p-valor
	Controle	1%	2%	3%	4%	5%	
¹ AV (µm)	188,40 ± 55,67 ^a	212,18 ± 29,47 ^{ab}	177,00 ± 31,11 ^a	190,53 ± 29,06 ^{ab}	260,40 ± 49,84 ^b	229,13 ± 66,60 ^{ab}	*
² LV (µm)	98,97 ± 19,05	99,21 ± 13,10	124,21 ± 27,94	121,16 ± 24,75	128,14 ± 10,71	103,35 ± 15,42	ns
³ AT (µm)	34,37 ± 3,89 ^{ab}	28,42 ± 3,65 ^b	34,27 ± 9,98 ^{ab}	38,43 ± 4,17 ^a	39,94 ± 6,64 ^a	31,63 ± 2,64 ^{ab}	*
⁴ NV (un.)	26,00 ± 2,64	34,00 ± 2,65	29,67 ± 6,11	26,33 ± 1,52	29,33 ± 0,58	27,00 ± 4,35	ns

Intestino: ¹AV - altura dos vilos; ²LV - largura dos vilos; ³AT- Altura da túnica; ⁴NV- Número de vilos. Médias seguidos por letra diferente, na mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey

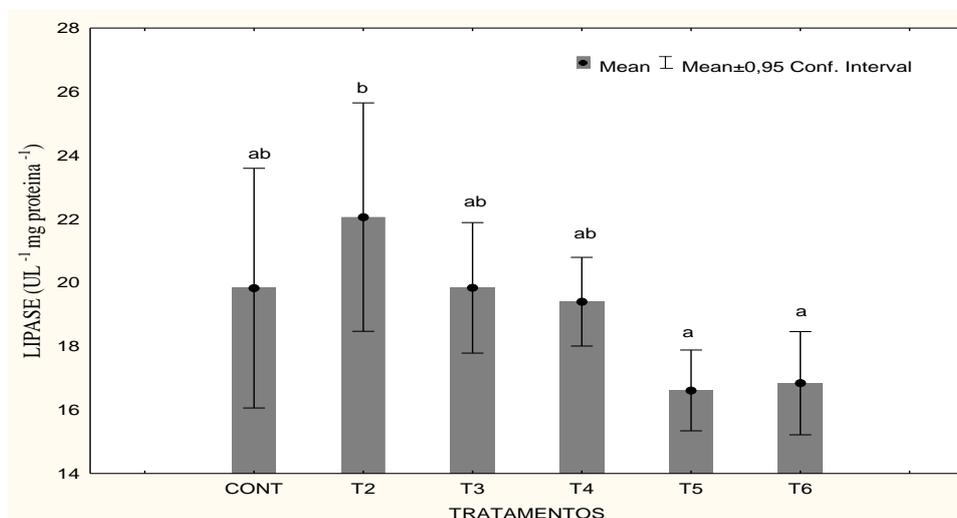
($p < 0,05$). ns – não significativo. * – significativo.

No pâncreas são produzidas e armazenadas as enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina, caboxipolipeptidase, elastase, colagenase, amilases, lipases, fosfolipase A2 e quitinases. Estas enzimas são transportadas pelos ductos pancreáticos para a região anterior do intestino ou cecos pilóricos. A quantidade e atividade das enzimas pancreáticas variam de acordo com a espécie (FRACALOSSI & CYRINO, 2013).

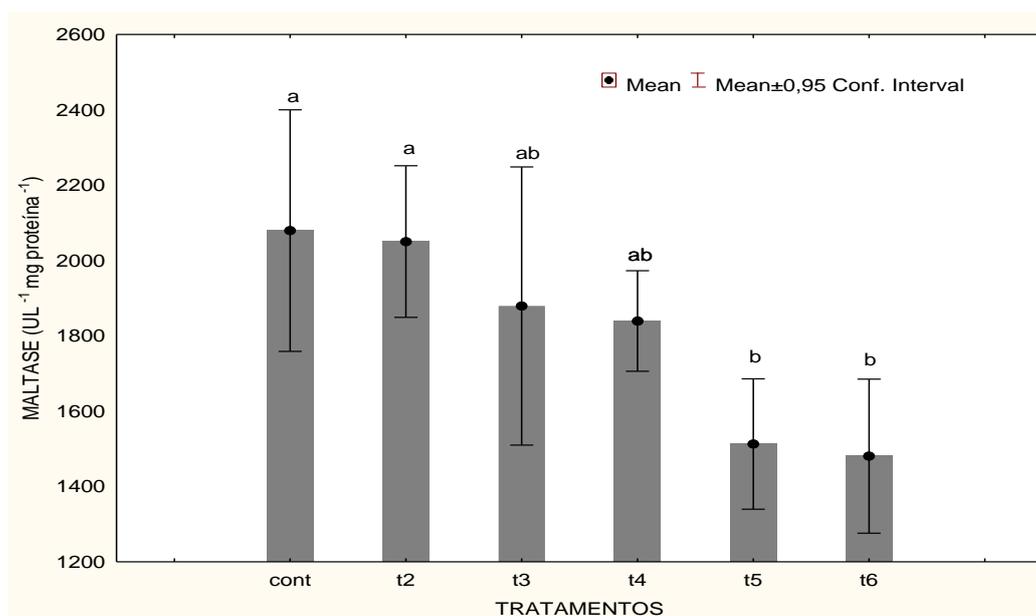
A avaliação das enzimas digestórias pode contribuir para determinar qual a melhor concentração e inclusão do hidrolisado protéico, através da avaliação do desempenho zootécnico de organismos submetidos a estas dietas (SANTOS et al., 2013), uma vez que a análise das enzimas digestivas é a ferramenta utilizada para compreender as exigências nutricionais das espécies cultivadas e o efeito dos ingredientes fornecidos nas dietas sobre a atividade enzimática. Alguns estudos afirmam que a mudança na quantidade ou no tipo de ingrediente utilizado na formulação de rações, pode influenciar a atividade das enzimas, desde sua concentração até o perfil enzimático no trato digestório (LUNDSTED et al., 2004; FOUNTOULAKI et al., 2005).

Na presente pesquisa verificou-se que as enzimas digestivas lipase, maltase e amilase apresentaram melhores absorção nos tratamento de 1% de inclusão do ingrediente teste, onde os piores resultados, correspondendo aos níveis mais reduzidos de absorção foram encontrados no tratamento 4 e 5% (Figura 5 A, B e C). Tal fato, pode esta relacionado com qualidade e quantidade de proteína, sendo que este fator pode limitar o crescimento, caso não atenda às necessidades da espécie alvo do cultivo (FERNÁNDEZ GIMENEZ et al., 2002; OUJIFARD et al., 2012; SILVA, 2014). Entretanto, não observou-se melhores resultados no desempenho zootecnicos, com o aumento dessas taxas de ingestão.

(A)



(B)



(C)

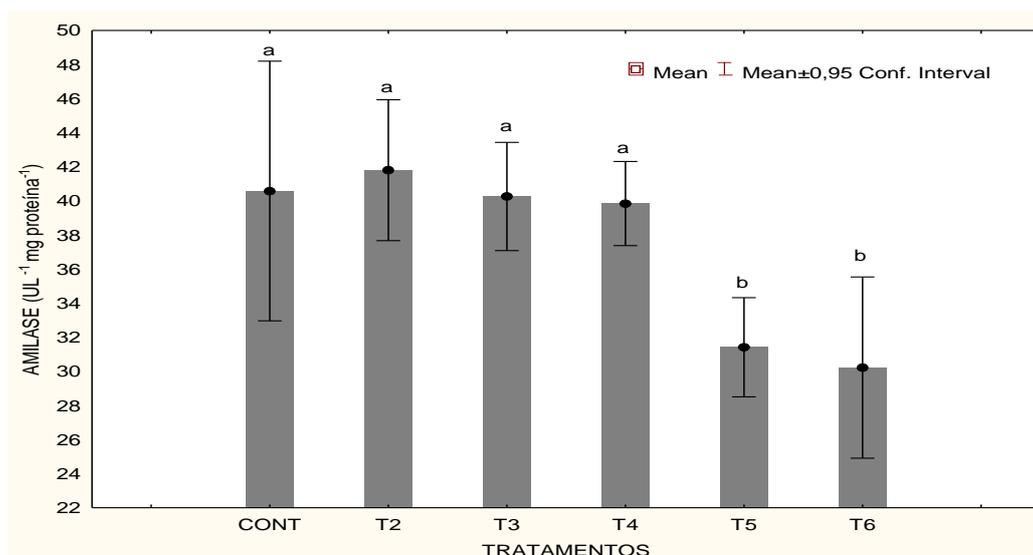


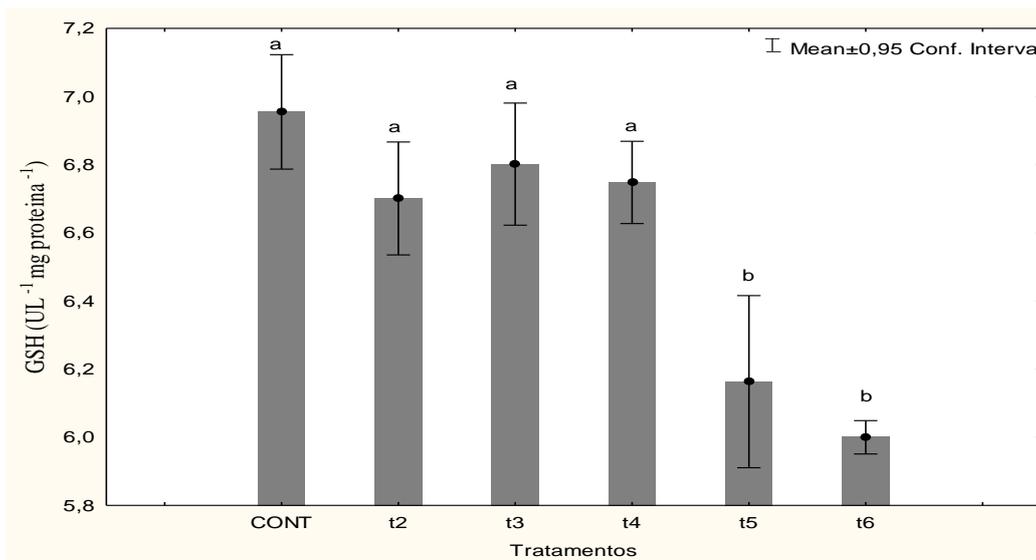
FIGURA 2. Lipase, maltase e amilase em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

O GSH é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais. É considerado um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, descrita como um importante agente antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1989).

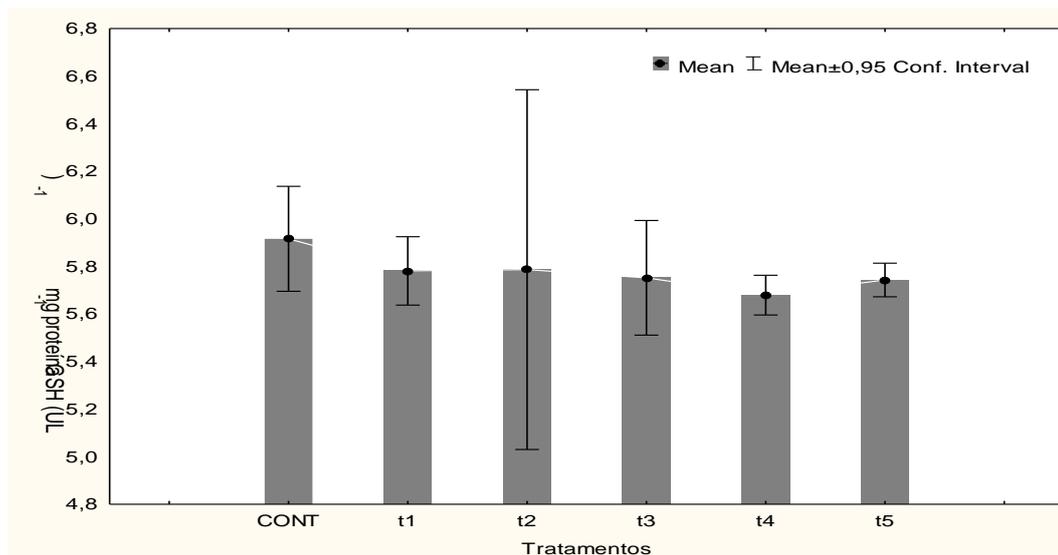
O GSH apresentou diferença significativa apenas nos peixes normais (Figura 3A), onde os animais com maiores inclusões do produto alternativo (T4 e T5), apresentando que esse teor de PHP fazem com que os animais experimentais respondam negativamente.

Na atividade de GSH, quando os exemplares foram expostos ao estresse agudo, os peixes tem respostas semelhantes (sem diferenças significativas) (Figura 3 (B) (C) e (D)).

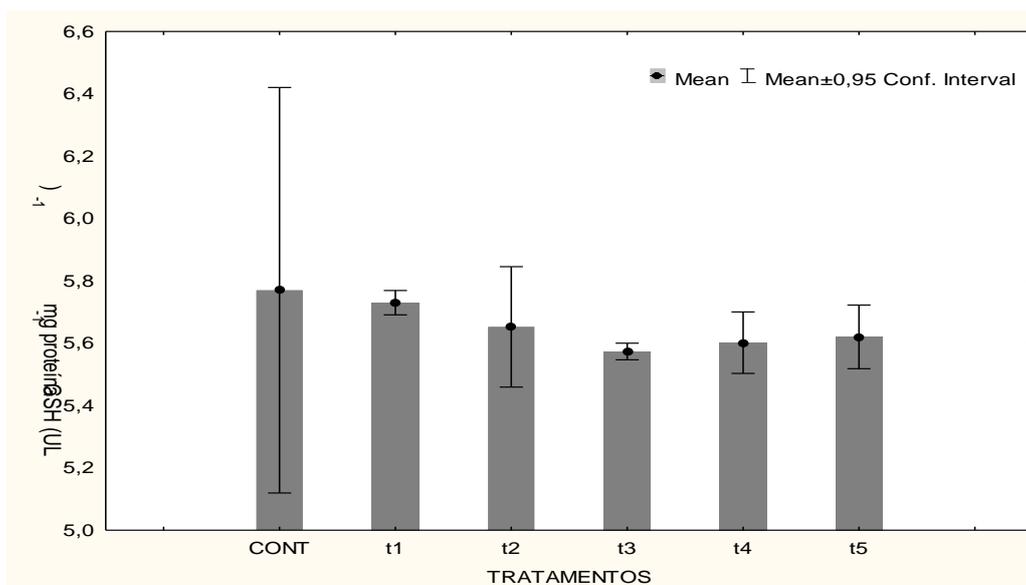
A. GSH- Animais experimentais normais



B. GSH- Sem estresse (0 minuto)



C. GSH- 7 minutos após estresse ao ar



D. 24 horas após o estresse ao ar

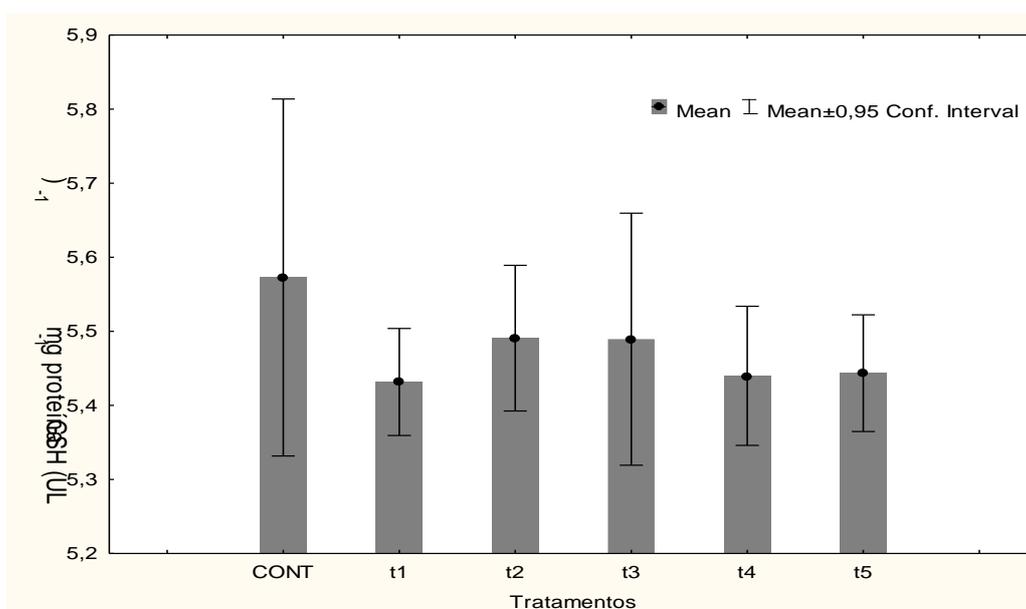


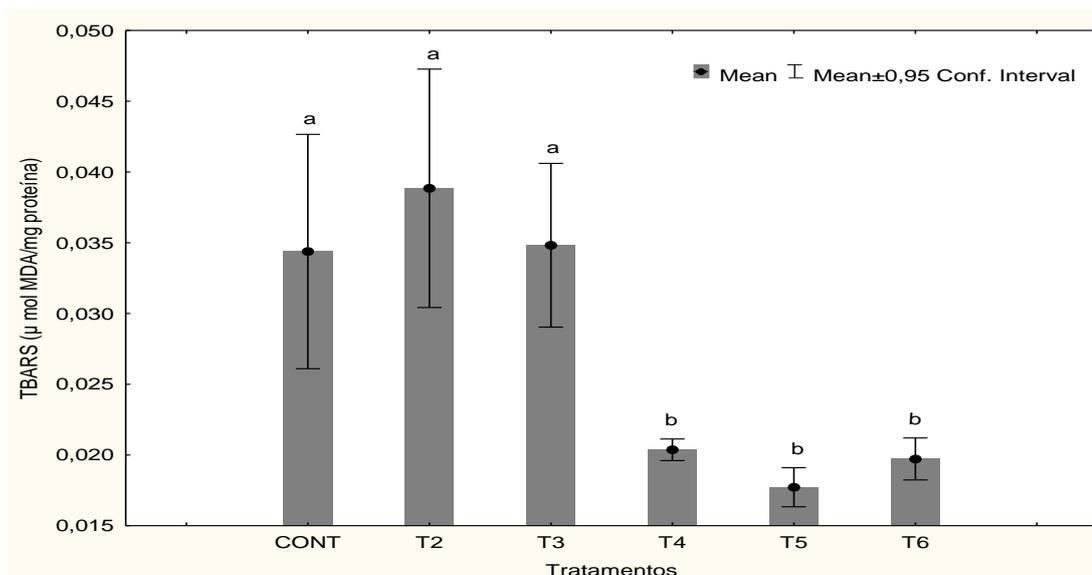
FIGURA 3. Atividade de GSH em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

O TBARS apresentou resultados semelhantes aos encontrados pelo GSH. Onde os níveis mais reduzidos foram encontrados no maiores percentuais de inclusão do ingrediente teste (T3, T4 e T5). Esta redução pode indicar efeitos mais graves, possivelmente relacionados a uma diminuição nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados devido à degradação oxidativa

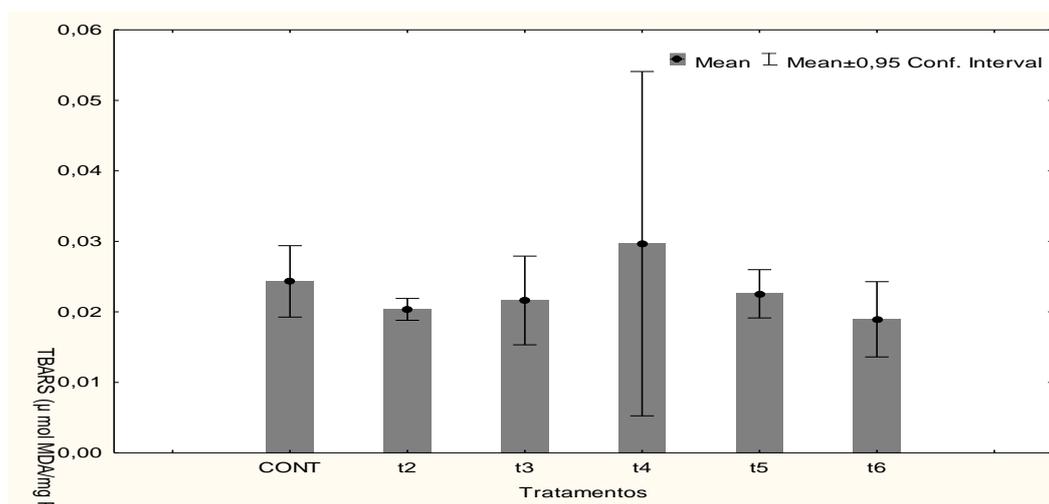
precoce (SUN et al. 2014), e poderia explicar a razão para os níveis reduzidos de TBARS no fígado de peixes.

FIGURA 4. Atividade TBARS em alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo proteína hidrolisada de penas, após 35 dias de cultivo. Barras indicam valores médios \pm desvio padrão dos grupos tratados com diferentes dietas. Letras diferentes identificam diferenças significativas entre os grupos. $P < 0,005$.

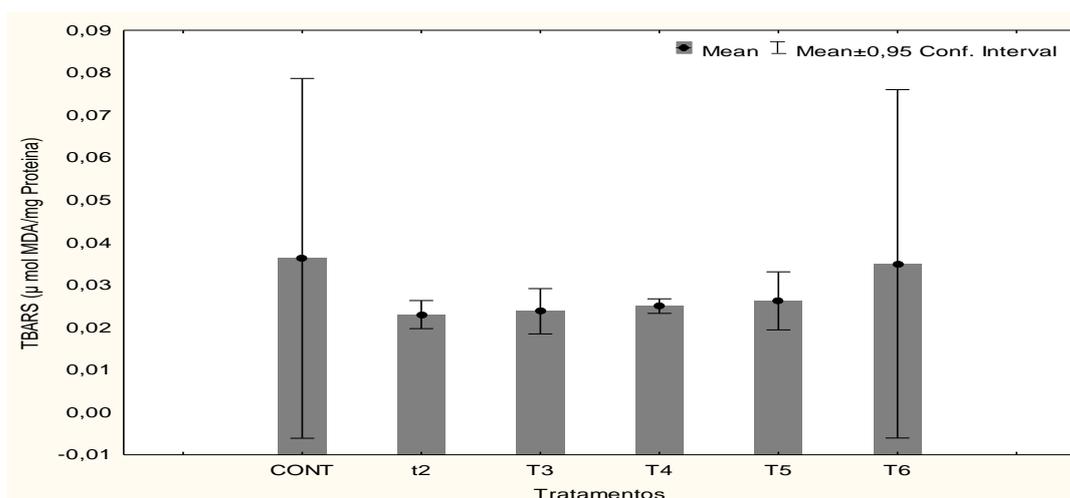
A. TBARS- Animais experimentais normais



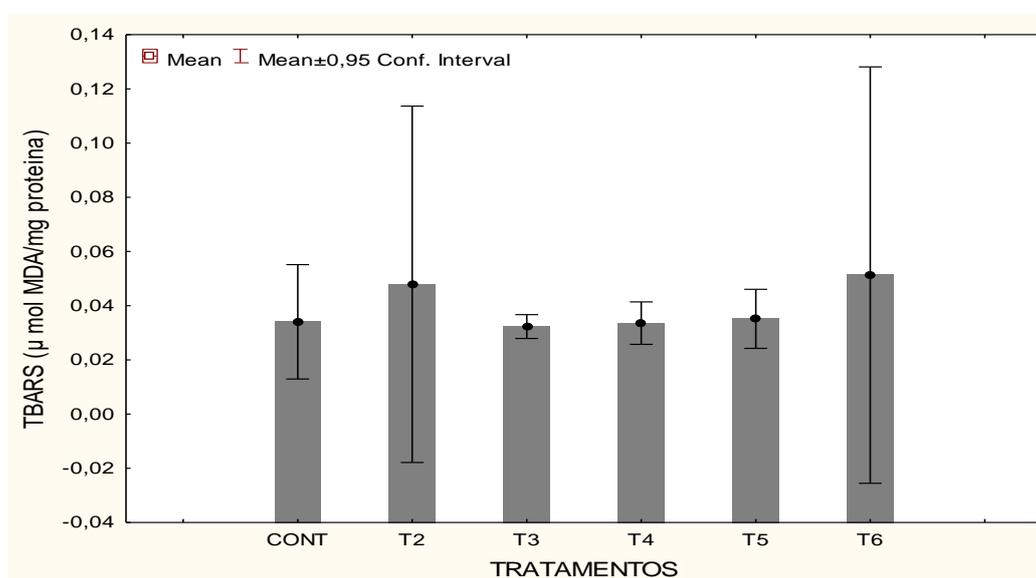
B. TBARS- Sem estresse (0 minuto)



C. TBARS- 7 minutos após estresse ao ar



D. TBARS- 24 horas após estresse ao ar



Conclusão

Os peixes que foram alimentados com PHP apenas após 1 grama, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para o desempenho produtivo e análises biométricas das vísceras dos exemplares.

Na presente pesquisa verificou-se que as enzimas digestivas lipase, maltase e amilase apresentaram melhores absorção nos tratamento de 1% de inclusão do ingrediente teste, onde os piores resultados, correspondendo aos níveis mais reduzidos de absorção foram encontrados no tratamento 4 e 5%. Tal fato, pode esta relacionado com qualidade e quantidade de proteína, sendo que este fator pode limitar o crescimento, caso não atenda às necessidades da espécie alvo do cultivo. Entretanto, não observou-se melhores resultados no desempenho zootécnicos,

com o aumento dessas taxas de ingestão.

Agradecimento

Agradecimento á CAPES/ Fundação Araucária pela a concessão da bolsa de estudo e BRF S.A pelo financiamento da pesquisa.

Referências

- ALAMI-DURANTE, H., WRUTNIAK-CABELLO, C., KAUSHIK, S.J., MÉDALE, F. 2010. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 156, 561–568.
- ALMEIDA, F.L.A., PESSOTTI, N.S., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., LEITÃO, N.J., CARVALHO, R.F., MARTINS, C., PORTELLA, M.C., DAL PAI-SILVA, M. 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, 41, 997-1004.
- ALMEIDA L.C., AVILEZ I.M., HONORATO C.A. & MORAES G. 2011. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed diets level of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**. 17:283-262.
- AKSNES, A., HOPE, B., JÖNSSON, E., BJÖRNSSON, B.T., ALBREKTSSEN, S., 2006. Sizefractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. **Aquaculture**. 261(1), 305-317.
- BERTSCH, A.; COELLO, N. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1703- 1708.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161.
- CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M.S.; KJORSVIK, E. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short- or long – term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. **Journal of Fish Disease**, v.27, p.531-541, 2004.

CAO, Z. J.; LU, D.; LUO, L. S.; DENG, Y. X.; BIAN, Y. G.; ZHANG, X. Q.; ZHOU, M. H. 2012. Composition analysis and application of degradation products of whole feathers through a large scale of fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2690-2696.

FABREGAT, T. E. H. P., RODRIGUESM T. M., TORRES, N. E. C., URBINATI, N. K., SAKAMURA, J. B. K. 2011. Fontes de fibra na alimentação do pacu: desempenho, composição corporal e morfometria intestinal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.63, n.6, p.1533-1540.

FAKHFAKH, N.; GARGOURI, M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; EL FEKI, A.; NASRI, M. 2012. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 938-949.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2020: sustainability in action**. Rome: FAO, 2020. 206 p.

FRACALOSSI, D. M., RODRIGUES, A. P. O., SILVA, T. S. C., & CYRINO, J. E. P. 2012. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: FRACALOSSI, D. M. CYRINO, J. E. P. (Ed.). Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira. **Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**. p.37-64.

GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 32:426-431.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; JONG, E. V.; BRANDELLI, A. 2008. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 61-67.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; DE JONG, E. V.; BRANDELLI, A. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. **Science and Technology**, v. 126, p. 135-144.

HISANO, H.; BORGHESI, R. 2015. Composição química e qualidade microbiológica de silagens ácidas de vísceras de surubim (*Pseudoplatystoma* spp.) preparadas com diferentes proporções de ácidos fórmico e cítrico. **Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste.**

HISANO, H.; PORTZ, L. 2007. Redução de custos de rações para tilápia: A importância da proteína. **Bahia Agrícola**, v. 8, n. 1, p. 42-45.

HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G.; WU, G. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-13.

HONORATO C.A., ALMEIDA L.C. & MORAES G. 2013. Processamento de dieta: seus efeitos no aproveitamento de carboidrato para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime** 10(5):2700-2715.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2017, 2018 e 2019**. [Rio de Janeiro]: IBGE, 2020. Disponível em: Acesso em: 07 jun. 2021.

JAIN, R.; JAIN, A.; RAWAT, N.; NAIR, M.; GUMASHTA, R. 2016. Feather hydrolysate from *Streptomyces sampsonii* GS 1322: a potential low cost soil amendment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 672-677.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., 2013. *Histologia básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

KASUMYAN, A.O., DOVING, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. **Fish and fisheries**. 4(4), 289-347.

KOLKOVSKI, S.; CZESNY, S.; DABROWSKI, K. 2000. Use of Krill Hydrolysate as a feed attractant for Fish larvae and juveniles. **Journal of the world aquaculture society**, v.31, n. 1, p. 81-88, 2000.

KUBIZA, F. (2000). **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 285 p

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p. 552-565.

LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEEA, M. B.; FERNANDES, K. F. 2016. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-24.

LEMES, A. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; EGEEA, M. B.; FERNANDES, K. F. 2016. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, article 950.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Apparent digestibility of some protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1801-1809, 2003.

MORAES, G., ALMEIDA, L.C., 2014. **Nutrição e aspectos funcionais da digestão de peixes**. in: BALDISSEROTTO, B. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. FUNEP, Jaboticabal. pp. 233-252.

NRC (National Research Council). 2011. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington D.C.: The National Academies Press. 376 p.

OKAMURA, D.; ARAÚJO, F. G.; ROSA, P. V.; FREITAS, R. T. F.; MURGAS, L. D. S.; CESAR, M. P. 2010. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 971-976, 2010.

PAUL, T.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; DASMOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. 2014. Valorization of chicken feather waste for concomitant production of keratinase, oligopeptides and essential amino acids under submerged fermentation by *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 575-584.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. 2000. Nutritional value of coconut meal in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v.22, p.695-699.

RAŠKOVIĆ B.S., STANKOVIĆ M.B., MARKOVIĆ Z.Z. & POLEKSIĆ V.D. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Science**. 56(1):87-100.

REFSTIE, S.; OLLI, J. J.; STANDAL, H. 2004. Feed intake, growth, and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. **Aquaculture**, v. 239, p. 331–349.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E. ET AL. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**. 9, 676–682.

SCHWARZ, F., DERKS, J., MONJE, A., AND WANG, H. L.. 2018 . Peri-implantitis. **Journal of Clinical Periodontology**. 45(Suppl. 20), S246–S266.

SEGOVIA, M. 2000. El cultivo de tilapia en sistemas cerrados en los Estados Unidos. **Panorama Acuícola**, 5 (5), 26-29.

SHAMUSHAKI, V.J., ABTAHI, B., KASUMYAN, A.O., KENARI, A.A., GHORBANI, R., 2008. Taste attractiveness of free amino acids for juveniles of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. **Journal of Ichthyology**, 48(1), 124-133.

SILVA, R. D., ROCHA, L. O., FORTES, B. D. A., VIEIRA, D., FIORAVANTI. 2012. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, sup. 1, p. 99-107.

SINKIEWICZ, I.; STAROSZCZYK, H.; ŚLIWIŃSKA, A. 2018. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, article e12494, p. 1-11.

VALENTI, W. C., BARROS, H. P., VALENTI, M. P., BUENO, G. W., CAVALLI, R. O. 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, 100611.

VILLA, A. L. V.; ARAGÃO, M. R. S.; SANTOS, E. P.; MAZOTTO, A. M.; ZINGALI, R. B.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. 2013. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, 15, p. 1-11, 2013.

WEATHERLEY AH, GILL HS, LOBO AF. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. **Journal of Fish Biology.**; 33: 851-59.

WU, J., LUI, W., WEN, H., ZHOU, Y., WU, J. 2021. Animal by-products with or without enzymatic hydrolysis completely replacement of fish meal in genetically improved farmed tilapia diets (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 52, p. 291-301.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os avanços produtivos no setor da piscicultura, demandas por pesquisas referentes produtos inovadores que venham beneficiar a cadeia produtiva do pescado é de extrema valia, principalmente quando priorizam coprodutos e subprodutos, buscando enfatizar a sustentabilidade.

As Conclusões desta pesquisa e as observações realizadas durante os ensaios experimentais, além dos levantamentos bibliográficos realizados, apresento algumas sugestões que podem ser utilizadas para experimentações futuras complementando os estudos aqui realizado:

- a) Realizar novos experimentos com níveis de inclusão mais reduzidas do ingrediente teste (Proteína hidrolisada de penas), para avaliar se isso foi a principal causa das alterações encontradas no fígado.
- b) Realizar testes mais intensificados para entender as alterações encontradas no fígados dos animais experimentais em todos os experimentos realizados.
- c) Realizar novos experimentos avaliando outras fases de cultivo (juvenis e engorda), para identificar se o custo/benefício é potencial para a agregação na piscicultura.
- d) Determinar o melhor níveis de inclusão da PHP em cada fase produtiva da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticues*): Larva, alevinos, juvenis e engorda.
- e) Realizar novos experimentos com novos delineamento produtivo, para a realização de um comparativo do experimento campo e laboratorial. avaliando outras fases de cultivo (juvenis e engorda), para identificar se o custo/benefício é potencial para a agregação na piscicultura.

