

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JULIANA RODRIGUES GOMES

**HIDROLISADO PROTEICO DE FÍGADO DE AVES COMO ADITIVO EM DIETAS
PARA TILÁPIA DO NILO**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

JULIANA RODRIGUES GOMES

**HIDROLISADO PROTEICO DE FÍGADO DE AVES COMO ADITIVO EM DIETAS
PARA TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon

Coorientadores: Ana Lúcia Salaro
Hamilton Hisano
Pollyanna de Moraes França
Ferreira

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633h
2020
Gomes, Juliana Rodrigues, 1993-
Hidrolisado proteico de fígado de aves como aditivo em dietas para tilápia do Nilo / Juliana Rodrigues Gomes. – Viçosa, MG, 2020.
70 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Peixes - Criação. 2. Tilápia (Peixe) - Alimentação e rações. 3. Antioxidantes. 4. Stress (Fisiologia). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 639.3

JULIANA RODRIGUES GOMES

**HIDROLISADO PROTEICO DE FÍGADO DE AVES COMO ADITIVO EM DIETAS
PARA TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2020.

Assentimento:



Juliana Rodrigues Gomes
Autora



Jener Alexandre Sampaio Zuanon
Orientador

*A Deus, pela saúde, força e sabedoria durante toda a caminhada.
Aos meus pais, **Geraldo Moreira Gomes e Antônia Rodrigues Gomes**, que sempre
priorizaram meus estudos e nunca mediram esforços para que chegasse até aqui.
Ao meu orientador, **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, por todo apoio e exemplo.
Aos meu namorado **Marcos Aurélio da Silva**, por ser meu companheiro de vida.
Aos demais familiares e amigos pelo apoio e torcida.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** e ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, pela oportunidade de realização deste curso, concedendo todo o suporte e auxílio necessário.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

A **Deus** por me permitir viver essa experiência com saúde, ânimo e força para concretizar mais um ciclo. Por nunca ter me desamparado nos momentos mais difíceis e por me enviar pessoas maravilhosas, que me acompanharam durante toda essa caminhada, as quais sou muito grata e que foram essenciais para conclusão dessa etapa.

Aos meus pais **Geraldo Moreira Gomes** e **Antônia Rodrigues Gomes**, por serem minha base, minha motivação e pelo apoio incondicional. Por contribuírem de todas formas possíveis para que conseguisse chegar até aqui, sem seus esforços e exemplos diários, jamais seria possível alcançar qualquer vitória, em que todas serão sempre dedicadas a vocês.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, que ao tentar descrevê-lo me faltam palavras para expressar o exemplo de ser humano e o significado que tem na minha vida. Pela orientação, desde o início da minha graduação, por toda paciência, dedicação, ensinamentos e sabedoria compartilhada. Por ser mais que um orientador, por ser amigo, conselheiro e pela sua real preocupação em formar seres humanos. Por me incentivar e acreditar, mesmo quando eu não podia, por me fazer ir além, mas sempre respeitando meus limites e por estar sempre lado a lado. A admiração, respeito e aprendizado irei levar sempre comigo.

A minha coorientadora **Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Salaro**, por toda contribuição ao longo de todos esses anos, desde o início graduação até a finalização do mestrado. Por todos ensinamentos, sábias conversas, pelos incentivos, dedicação em ajudar e assim, contribuir para me tornar uma profissional melhor.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Hamilton Hisano** que me acompanhou desde o início do mestrado, sendo essencial para o desenvolvimento desse projeto. Por todo auxílio e contribuição diretamente com recursos fornecidos através da **Embrapa Meio Ambiente**, além de considerações extremamente importantes na concretização desse estudo.

A minha coorientadora **Dr.^a Pollyanna de Moraes França Ferreira**, por todos os ensinamentos e auxílio durante a graduação e agora ao longo do mestrado. Sempre serei grata por todas as oportunidades e conhecimentos compartilhados.

A **Prof.^a Dr.^a Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (DBA/UFV) para as análises de estresse oxidativo.

Ao Prof. **Dr Jorge Abdala Dergam dos Santos**, pela disponibilização do Laboratório de Sistemática Molecular (*Beagle*- DBA/UFV) que me permitiu a utilização de equipamentos para o pH da água e o freezer para conservação das amostras.

A **Prof.^a Dr.^a Reggiani Vilela Gonçalves** pela disponibilização do Laboratório de Patologia Experimental, em quem ambos foram utilizados equipamentos para realizar análises de estresse oxidativo.

A **Prof.^a Dr.^a Poliane Alfenas Zerbini** e ao doutorando **Rafael Reis de Rezende** pela disponibilização do Laboratório de Vírus (BIOAGRO) e todo auxílio em armazenar e conservar as amostras experimentais, sem se importar com as horário.

Ao Prof. Dr. **Edenio Detmann**, por disponibilizar o Laboratório de Nutrição Animal (DZO/UFV) para as análises químicas das rações e carcaças. Aos técnicos do laboratório, **Faustino Pereira Monteiro, Mateus Dias Nunes, Plínio Madureira Magalhães e Mário Rita Julião** por toda paciência, ensinamentos e auxílio durante as análises, além da ajuda com a explicação dos dados.

Aos membros da banca **Prof. Dr. Daniel Vasconcelos Abreu Campelo e Prof. Dr. Hamilton Hisano** pela disponibilidade e valiosas considerações

Ao **Laboratório de fisiologia aplicada a piscicultura (LAFAP)** que se resume em um único sentimento: gratidão! Um laboratório que significa mais que experimento, aprendizado, mas que se tornou minha segunda casa, com amigos que irei levar para vida. Ao **Márcio Yoshiyuki Kanashiro, Pollyanna de Moraes França Ferreira e Sendy Moreira Reis**, por paciência e dedicação em meu primeiro contato as atividades do laboratório, pelos ensinamentos compartilhados desde o início de estagiária. Aos amigos que fiz ao longo dos anos **Débora Werneck, Isabel Gertrudes Arrigui de Araújo Neves, Maria Tatiana Martins Soares, Wanderson Valente dos Santos, Luana Belique**, por toda amizade construída, pelas risadas, pelos ensinamentos as histórias compartilhadas e pelas vitórias conquistadas ao longo de todos esses anos.

Aos estagiários **Filipe Azevedo, Caio William, Daniele Gomes e Alisson Duarte**, por me acompanharem durante o meu experimento e nas análises realizadas. Compartilhando alegria e esforços, e assim, tornando o trabalho menos cansativo. A mestre **Jheneze Rocha** por todo auxílio na peletização das rações, por toda boa vontade em enfrentar chuva e o frio somente para ajudar. Ao mestrando **Felipe Martins dos Santos** que me permitiu viver aos fins de

semanas, cuidando do experimento com toda atenção possível, como se fosse o seu, por ser prestativo sempre que possível, com tudo que estava ao seu alcance.

A mestranda **Karina Ventura Boechat Martins**, que me acompanhou diariamente durante um ano. Sendo companheira essencial em todas as situações rotineiras do laboratório e na vida. Seja nas dificuldades, como um ombro amigo, me escutando e apoiando, sendo nas loucuras, risadas e na tentativa de vida *fitness*. O importante é que sempre esteve e estará sempre por perto, em qualquer situação.

A mestranda **Renata Maria Pereira de Freitas**, uma pessoa humilde com coração enorme, sempre disposta a ajudar a todos. Que entre uma análise e outra, sempre se encontra com o melhor sorriso e com toda paciência em ensinar. Um presente do SEEA e irei levar para a vida, sempre.

A mestranda **Stella Bicalho Silva**, aquela que sempre está quando “o barraco desaba”, com as melhores músicas e parceria durante as insanidades que só um experimento proporciona. Que sempre escutou minhas reclamações e preocupações diárias, amenizando os longos 45 dias que vivemos.

Ao doutorando, amigo e estatístico preferido, **Alex Júnio da Silva Cardoso**, por toda força desde o início, por sempre estar disposto a ajudar, sem mesmo esperar nada em troca. Por me apresentar sempre as melhores soluções, em qualquer tipo de situação inusitada e por toda resolução de problemas em pautas. Pela humildade em ensinar, por todas as estatísticas que rodou, por todas valiosas e importantes considerações. Por toda companhia e parceria na vida. Chega ser difícil expressar toda minha gratidão, por tudo que ao longo dos anos.

A mestranda **Naiara Aparecida Marcos**, por toda ajuda nas análises bromatológicas, que esteve no laboratório mesmo sem precisar, somente para me dar o suporte. E por ter sido essencial durante toda minha jornada na UFV, sem sua amizade, chegar aqui teria sido muito mais difícil.

A minha família **Bataclã**, que foi um dos melhores presentes que a zootecnia me proporcionou. Por serem mais do que preciso e estarem presentes, mesmo quando existe distância: **Alex Júnio Cardoso, Joao Vítor Lopes Dias, Naiara Aparecida Marcos, Raully Lucas da Silva, Camila Miranda, Felipe Martins dos Santos, Mariana Freitas Pontes e Renata Sampaio**. Grata por essa amizade tão sincera, uma união capaz de tornar todos os problemas pequenos através das melhores risadas. Obrigada por compartilharem os mais belos e loucos sentimentos, amo vocês.

Ao meu namorado **Marcos Aurélio**, que vivenciou cada experiência de perto, por nunca me deixar desanimar, por sempre me mostrar que posso ir ainda mais longe. Por me fazer sorrir

nos dias que não era capaz, por ser meu companheiro de todas as horas, você é parte importante de todas as conquistas.

Aos amigos que o Departamento de Biologia Animal proporcionou **Barbara Linhares, Maria Luiza Rodrigues, Filipe Iglesias e Lorene Reis**, por todas alegrias compartilhadas nos corredores, vocês trouxeram leveza durante a caminhada.

A **Piscicultura Sol Nascente** por fornecer os peixes e pela doação do segundo lote, para o desenvolvimento do experimento, com incentivo dos proprietários e amigo **Leandro Novaes e Adilson Novaes**.

A empresa **SOMA Nutrição Animal** que realizou a doação do ingrediente glúten de milho e da farinha de vísceras, por intermédio dos profissionais **Rodrigo Toledo Barbosa e Bruna Lacerda**. A empresa **NUTRIAVES** pela doação da farinha de peixe, contribuindo de forma essencial para o desenvolvimento das dietas utilizadas no experimento.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, **Nilo Sérgio de Souza e Lúcia Helena Campos**, por todo auxílio e suporte na resolução de diversas situações. Ao técnico **Donizete Aparecido da Silva**, que sempre foi solícito em tudo que foi necessário. Ao secretário do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, **Adnilson Antônio Brasileiro**, por todos os esclarecimentos e ajuda desde a inscrição ao programa.

Aos meus **familiares e amigos** que sempre torceram e me apoiaram em diversas formas.

Muito grata a todos, vocês fizeram a real diferença.

“A felicidade as vezes é uma benção, mas geralmente é uma conquista”

RESUMO

GOMES, Juliana Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Hidrolisado proteico de fígado de aves como aditivo em dietas para tilápia do Nilo**, Minas Gerais. Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadores: Hamilton Hisano, Ana Lúcia Salaro e Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Em função dos elevados custos com alimentação e da alta exigência por proteína dos peixes, é necessário buscar alternativas para redução dos custos de produção de peixes, sem prejudicar o desempenho produtivo e a capacidade de enfrentar os desafios impostos pelos sistemas intensivos de criação, como elevadas densidades de estocagem, alta frequência de manejos e alterações na qualidade da água. Durante os manejos de biometrias e classificações, os peixes são capturados, contidos em redes em altas densidades e expostos ao ar, o que pode causar estresse e conseqüentemente provocar redução no consumo de ração e no crescimento, diminuição da atividade do sistema imune e na sobrevivência. Peixes onívoros podem ser alimentados com dietas a base de ingredientes vegetais sem comprometer o crescimento, entretanto, em condições de desafio, são necessárias estratégias para compensar as exigências nutricionais aumentadas. A utilização de aditivos em rações pode melhorar a palatabilidade e o consumo de ração, a eficiência de utilização dos nutrientes, a capacidade de enfrentar fatores estressores e proteger contra danos oxidativos. Os hidrolisados proteicos são comumente utilizados como ingredientes proteicos em substituição à farinha de peixe, porém, têm sido avaliados como aditivos em dietas para organismos aquáticos, devido a boa palatabilidade, quantidade de nutrientes essenciais, por promover o equilíbrio da microbiota intestinal, modular a atividade do sistema imune e atuar como antioxidante. Diante disso, objetivou-se avaliar o potencial do hidrolisado proteico do fígado de aves, como aditivo sensorial, nutricional e zootécnico, em dietas para alevinos de tilápia do Nilo. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados com cinco tratamentos e seis repetições. Foram avaliadas quatro dietas formuladas a base de ingredientes de origem vegetal, suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado proteico (0; 1, 2 e 4%) e uma dieta premium, formulada a base de ingredientes de origem animal. Os blocos foram constituídos por duas classes de peso inicial ($1,38 \pm 0,13\text{g}$ e $1,70 \pm 0,10\text{g}$). Ao final de 45 dias de alimentação, foi avaliado o desempenho produtivo, índices corporais e variáveis metabólicas sanguíneas. cinco peixes de cada tratamento foram submetidos a um desafio por exposição ao ar e avaliados a glicose e lactato sanguíneos e o status oxidativo nas brânquias. A avaliação do efeito da suplementação de hidrolisadoproteico sobre as variáveis analisadas foi realizada por meio da análise de variância e em caso

significativo, foi realizada análise de regressão polinomial. O melhor nível de hidrolisado proteico obtido, foi comparado com uma dieta referência através do teste t de Student. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5%. Não houve efeito significativo do HP para as variáveis de desempenho produtivo, índices corporais e variáveis metabólicas. A exposição ao ar desencadeou respostas de estresse nos peixes, com aumento da glicose sanguínea, entretanto, não houve efeito do HP nas respostas de estresse. Para as variáveis de estresse oxidativo nas brânquias, houve efeito linear decrescente do hidrolisado proteico para proteína carbonilada e efeito quadrático para a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase. Com base nestes resultados, o nível de 4% de HP foi considerado o melhor, e utilizado para comparação com a ração premium. Apesar da suplementação da dieta com 4% de HP ter proporcionado maior taxa de sobrevivência nos peixes, também resultou em menor consumo de ração, crescimento, eficiência de utilização dos nutrientes, rendimento de carcaça e índice hepatossomático quando comparada com a ração premium. Para as variáveis metabólicas, respostas de estresse e variáveis do status oxidativo nas brânquias não houve diferenças significativas. Apesar do HP não ter apresentado efeito palatilizante e promotor de crescimento para juvenis de tilápia do Nilo, em condições de desafio, o nível de inclusão de 4% protegeu contra danos oxidativos.

Palavras-chave: Exposição ao ar. Antioxidante. Fígado de aves

ABSTRACT

GOMES, Juliana Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Hydrolyzed protein of bird's liver as na additive in diets for nile tilapia**, Minas Gerais. Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisers: Hamilton Hisano, Ana Lúcia Salaro and Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Due to the high costs of food and the high demand for protein, it is necessary to look for alternatives to reduce the costs of fish production, without compromising the productive performance and the capacity to face challenges imposed by intensive farming systems, such as, high densities of fish, storage, high frequency of handling and changes in water quality. During the management of biometrics and classifications, fish are captured, contained in nets under high densities and exposed to the air, which can cause stress and consequently a reduction in feed consumption and growth, decreased activity of the immune system and survival. Omnivorous fish can be fed diets based on plant ingredients without compromising growth, however, in challenging conditions, strategies are needed to compensate the increase on nutritional requirements. The use of additives in feed can improve palatability and feed consumption, the efficiency of nutrient use, the ability to face stressors and to protect against oxidative damage. Hydrolyzed proteins are commonly used as protein ingredients to replace fishmeal, however, it has been evaluated as additives in diets for aquatic organisms, due to its good palatability, to provide essential nutrients, to promote the balance of intestinal microbiota, to modulate the activity of immune system and act as an antioxidant. Therefore, the aim was to evaluate the potential of poultry liver hydrolyzed protein, as a sensory, nutritional and zootechnical additive, in diets for Nile tilapia. A randomized block design with five treatments and six replication per treatment was used. Four diets based on ingredients of vegetable origin were formulated to be evaluated. The diets were supplemented with increasing levels of protein hydrolyzate (0, 1, 2 and 4%) and a premium diet was formulated based on ingredients of animal origin. The blocks consisted of two classes of initial weight ($1.38 \pm 0.13\text{g}$ and $1.70 \pm 0.10\text{g}$). At the end of 45 days of feeding, productive performance, body indexes and blood metabolic variables were evaluated. Five fish from each treatment were subjected to a challenge for exposure to the air and were evaluated the blood glucose and lactate, and also the oxidative status in the gills. The evaluation of hydrolyzed protein supplementation effect on analyzed variables was carried out through analysis of variance and, in a significant case, polynomial regression analysis was performed. The best level of hydrolyzed protein obtained was compared with a reference diet using the Student's t test. In all analyzes, a significance level of 5% was

considered. There was no significant effect of HP for variables of productive performance, body indexes and metabolic variables. Exposure to the air triggered stress responses in fish, with an increase in blood glucose, however, there was no effect of HP on stress responses. For variables of oxidative stress on the gills, there was a decreasing linear effect of hydrolyzed protein for carbonylated protein and a quadratic effect for activity of the enzymes catalase and superoxide dismutase. Based on these results, the level of 4% HP was considered the best, and used for comparison with the premium diet. Although the 4% diet provided a higher survival rate, it resulted in a lower feed consumption, growth, efficiency of nutrient use, carcass yield and hepatosomatic index when compared to the premium diet. For metabolic variables, stress responses and oxidative status variables on gills, there were no significant differences. Although the HP did not have a palatizing effect and growth promoter for juveniles of Nile tilapia, under challenging conditions, the inclusion level of 4% protected against oxidative damage.

Keywords: Exposure to air. Antioxidant. Bird's liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Principais métodos disponíveis para produção de hidrolisados proteicos 21
- Figura 2** - Principais métodos disponíveis para produção de hidrolisados proteicos 23
- Figura 3** - Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e as principais defesas enzimáticas e não enzimáticas das células 27

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre o teor de proteína carbonilada (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar. 58
- Figura 2** - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar. 58
- Figura 3** - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre a atividade da enzima catalase (CAT) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar. 59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Enzimas proteolíticas utilizadas na hidrólise de proteínas	22
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas vegetais com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves e a dieta premium com farinha de peixe.	47
--	----

Tabela 2 - Composição química e aminoacídica do hidrolisado proteico de fígado de aves (Falbom Agroindustrial Ltda - Faltech F1 [®]).	48
---	----

Tabela 3 - Desempenho produtivo e índices corporais de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves.	55
--	----

Tabela 4 - Variáveis metabólicas sanguíneas de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves. Valores antes e depois do desafio.	56
---	----

Tabela 5 - Valores médios das variáveis para status oxidativo nas brânquias de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves, após serem submetidos a exposição ao ar.	57
---	----

Tabela 6 - Desempenho produtivo e índices corporais de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves comparado a ração premium.	60
---	----

Tabela 7 - Variáveis metabólicas sanguíneas de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves ou ração premium.	61
--	----

Tabela 8 - Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de juvenis de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves, comparado a ração premium.	61
---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	16
1. Panorama da aquicultura	17
2. Ingredientes utilizados para confecção das rações	18
3. Hidrolisado	20
4. Utilização do hidrolisado como aditivo.....	24
5. Estresse oxidativo.....	26
6. Respostas de estresse.....	30
Referências	30
CAPÍTULO 2: Hidrolisado proteico de fígado de aves como aditivo em dietas para tilápia do Nilo	43
Introdução.....	44
Material e métodos	45
Animais e condições experimentais	45
Desempenho produtivo	49
Variáveis metabólicas	50
Teor proteico da carcaça e composição química das rações	50
Teste de exposição ao ar.....	50
Status oxidativo.....	50
Respostas de estresse.....	53
Análise estatística.....	53
Resultados	54
Discussão.....	62
Referências	65
ANEXO	70

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Panorama da aquicultura

O consumo de pescado no mundo tem aumentado desde a década de 1950, a uma taxa média de crescimento de 3,1% ao ano. No período de 1961 a 2017, esse crescimento foi observado com maior ênfase nos países em desenvolvimento, ultrapassando a taxa anual de crescimento populacional de 1,6%. Em 2018, alcançou o valor de 20,5 kg/capta/ano que representou 20% da proteína animal consumida (FAO, 2020). Este aumento foi impulsionado não apenas pelo aumento da produção, mas também por outros fatores, como a melhor utilização dos subprodutos provenientes da piscicultura, a melhoria nos canais de distribuição, o crescimento populacional, aumento da renda e da urbanização, além da maior conscientização da população em busca de alimentos mais saudáveis (FAO, 2020).

A partir da década de 1980, o crescimento da pesca extrativista não acompanhou o aumento no consumo do pescado, o que estimulou o crescimento da aquicultura (FAO, 2018). Em 2018 a aquicultura contribuiu com 46% do pescado consumido no mundo, valor bem acima dos 25,7% em 2000 (FAO, 2020). O cultivo dos peixes foi o setor que mais contribuiu para este crescimento, que em 2015 representou 67,8% de toda a produção (Zhou, 2017).

No Brasil, a produção de peixes passou de 578,800 mil toneladas em 2014 para 758,006 mil toneladas em 2019, o que representou um aumento de 30,96% nesse período (Peixe BR, 2020). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais produzidas mundialmente, ocupando a terceira posição, perdendo apenas para Carpa capim, (*Ctenopharyngodon idellus*) e a Carpa prateada, (*Hypophthalmichthys molitrix*), respectivamente (FAO, 2020). No Brasil ocupa a primeira posição no ranking (Peixe BR, 2020) com grandes indícios que se tornará o peixe de criação mais importante do mundo (Kobayashi, 2015).

O aumento na produção, bem como a intensificação dos sistemas de criação levou a maior demanda de alimentos para os peixes, pois nesses sistemas, a alimentação é exclusivamente por rações (Furuya, 2010). No período de 2007 a 2016, a produção de rações quadruplicou, passando de 168 mil toneladas para 722 mil toneladas (Zani, 2015; 2016; 2017). Esse aumento se deu pela não disponibilidade do alimento natural em quantidade e qualidade que atendam às exigências nutricionais para crescimento e reprodução, nesses sistemas (Furuya, 2010). A alimentação de peixes em sistemas intensivos pode representar até 70% do custo total de produção (Bolivar et al., 2010).

2. *Ingredientes utilizados para confecção das rações*

O alto custo de alimentação, em comparação com outros animais domésticos, se deve a alta exigência por proteína, que eleva os custos na produção de rações, seja a partir de ingredientes de origem animal ou de origem vegetal. Os ingredientes de origem animal mais frequentemente utilizados são provenientes do processamento de subprodutos de abatedouros, como a farinha de peixe, farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos, farinha de penas e farinha de sangue, enquanto os principais ingredientes proteicos de origem vegetal são o farelo de soja, glúten de milho e farelo de algodão (Pezzato et al., 2002; Pezzato et al., 2009).

Dentre os ingredientes de origem animal, a farinha de peixe é a mais amplamente utilizada na confecção de rações, principalmente para peixes carnívoros, por apresentar bom perfil de aminoácidos, ser boa fonte de ácidos graxos essenciais da série n-3, de vitaminas e minerais, além de boa digestibilidade dos nutrientes e da alta palatabilidade (Pezzato et al., 2009). Entretanto, a qualidade deste ingrediente é influenciada principalmente pela composição da matéria prima, que pode ser de origem marinha (peixes inteiros) ou de resíduos do processamento de pescado (principalmente de tilápia ou de salmão).

A farinha de peixe é utilizada tanto em rações para organismos aquáticos, quanto para outros animais de produção e pets, por isso é um produto altamente demandado pela indústria, o que contribui para os elevados valores no mercado. A alta demanda por farinha de peixe na última década e a estagnação na produção tem tornado insustentável a utilização a longo prazo como o principal ingrediente proteico em rações para peixes (Salin et al., 2018). A produção mundial de farinha de peixe atingiu seu pico em 1994 com 30 milhões de toneladas, porém ao longo dos anos ocorreu um declínio contínuo até chegar à metade da sua capacidade em 2016 (FAO, 2018). Essa redução deu-se em decorrência da sobre-exploração dos recursos oceânicos, levando ao esgotamento dos estoques pesqueiros, com destaque para a espécie *Engraulis ringens*, principal fonte de matéria prima da América do Sul. Além disso, fenômenos climáticos como el niño, tem afetado diretamente os estoques pesqueiros e causado oscilações em sua obtenção (Naylor et al., 2000). Essa redução no suprimento da farinha de peixe de origem marinha levou à necessidade de obtenção de ingredientes proteicos de origem animal de forma mais sustentável.

A disponibilidade dos resíduos do processamento de pescado de água doce permitiu a fabricação de farinha de peixe como alternativa à de origem marinha, bem como a redução dos impactos ambientais. Entretanto, esta pode apresentar pior valor nutricional em função da variação na composição da matéria prima (proporções de carne, ossos, pele, escamas e nadadeiras), que resulta em pior palatabilidade, altos teores de cinzas, menor teor proteico e de

ácidos graxos essenciais da série n-3 (Teixeira et al., 2006). Por apresentar composição variável, há necessidade de constante avaliação da composição química de cada lote, o que dificulta a formulação e eleva os custos de produção das rações.

Os demais ingredientes de origem animal, como as farinhas de carne e ossos, de sangue, de penas e de vísceras de aves contribuem para melhorar a palatabilidade das rações, porém, apresentam problemas semelhantes aos da farinha de peixe de resíduos de filetagem, o que limita sua utilização em rações para peixes. Dessa forma, a baixa qualidade da matéria prima e os processamentos inadequados podem resultar em baixa digestibilidade dos nutrientes e prejuízo no desempenho dos peixes (Aksnes et al., 1997; Vergara et al., 1999). Tais características limitam o uso desses ingredientes como fonte de proteína nas dietas, portanto, uma alternativa comum é a utilização de ingredientes proteicos de origem vegetal para a formulação de rações para peixes.

Os ingredientes proteicos de origem vegetal apresentam características positivas como menor custo, maior disponibilidade no mercado e menor oscilação na composição química. Entretanto, algumas dessas fontes de proteína, como o farelo de soja e o concentrado proteico da soja, podem conter fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, oligossacarídeos, polissacarídeos não amiláceos e lecitinas, que prejudicam a digestão proteica, o tempo de permanência no trato digestivo e a absorção dos nutrientes no intestino (Francis et al., 2001). Além disso, apresentam deficiência dos aminoácidos metionina e cistina e baixa disponibilidade de minerais pela presença de fitatos (Francis et al., 2001).

Estes fatores antinutricionais, limitam o uso dessas fontes vegetais, em dietas para aquicultura (Lee et al., 2002; Lin e Luo, 2011), dessa forma, necessitam passar por processamentos que permitem desativá-los. Os processamentos físicos compreendem a limpeza e secagem (máximo de 12% de umidade) para uma melhor armazenagem. Após esse procedimento, ocorre a moagem dos grãos com casca, que posteriormente é separada, tostada e reincorporada ao farelo de soja. A soja sem casca segue para laminação, e em seguida para expansão, onde é pressionado com vapor e torna se esponjoso. Após o resfriamento, a soja segue para o processamento químico, com extração do óleo com hexano, onde são produzidas duas frações: a miscela e o farelo de soja (FS) antes de tostar. O FS é levado ao toaster que tem duas funções: recuperar parte do hexano ainda presente no farelo e desativar os fatores antinutricionais (Bellaver e Snizek Junior, 1999). Entretanto, a substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em rações para peixes pode causar redução na sobrevivência (Fabregat et al., 2018) na atividade do sistema imune (Lin e Luo, 2011), na atividade das enzimas metabólicas (Lin e Luo, 2011), no crescimento (Fontainhas- Fernandes et al., 1999; Lin e Luo,

2011; Fabregat et al., 2018), na eficiência de utilização dos nutrientes (Fabregat et al., 2006; Fabregat et al., 2018) e na qualidade da carcaça (Fontainhas - Fernandes et al., 1999; Fabregat et al., 2018). Tais efeitos são influenciados pelo nível de substituição (Lin e Luo, 2011) e são mais pronunciados para peixes carnívoros (Fabregat et al., 2018).

O glúten de milho é um importante ingrediente proteico em rações para peixes, obtido como coproduto da fabricação de amido e xarope de glicose pelo processamento enzimático do endosperma do milho (Butolo, 2002). Esse processo resulta em um produto altamente proteico, com elevado teor de metionina (Fernandes, 1998), porém deficiente em alguns aminoácidos essenciais como lisina, arginina e triptofano (Kubitza, 1999). Dietas em que o glúten de milho é o principal ingrediente proteico tendem a apresentar menor atratividade, como demonstrado para *Oreochromis niloticus* (Pereira e Pezzato, 2000), para o híbrido *Chrysops Morone* × *M. saxatilis* (Trushenski e Kohler, 2011) e para *Macrobrachium rosenbergii* (Zhou et al., 2010). Assim, são necessárias estratégias para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes em rações onde a principal fonte proteica é de origem vegetal, como a inclusão de aditivos para melhorar a palatabilidade, suplementar aminoácidos essenciais, promover o equilíbrio da flora intestinal e da atividade do sistema imune dos peixes.

3. Hidrolisado

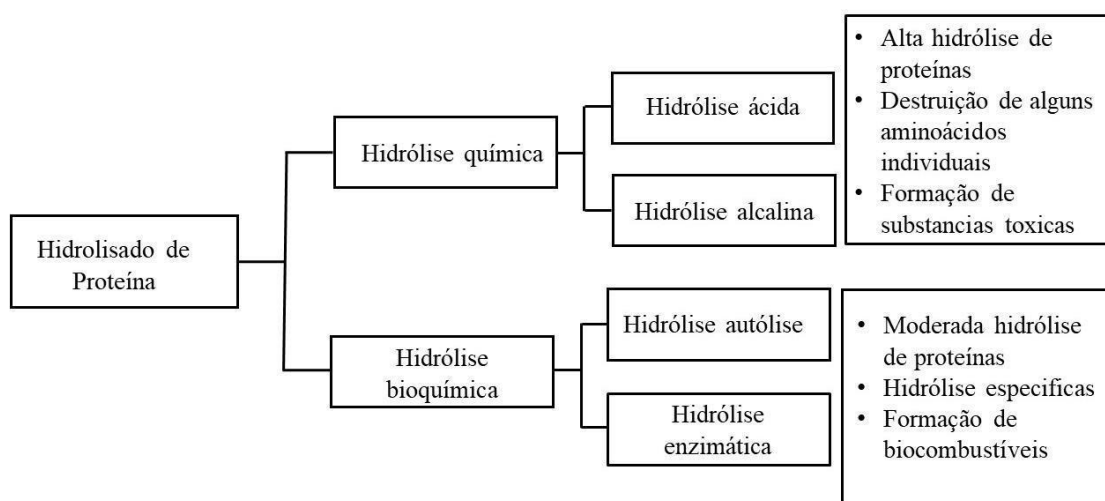
Os hidrolisados proteicos são constituídos de aminoácidos livres e peptídeos de 2 a 20 aminoácidos (Halim et al., 2016), produzidos a partir da clivagem de ligações peptídicas de uma ampla variedade de matérias-primas proteicas, caseína (Lin et al., 1997), proteínas do ovo (Sakanaka e Tachibana, 2006), da soja (Gibbs et al., 2004), tubérculos (Wang e Xiong, 2005), plasma sanguíneo de diversos animais (Bah et al., 2016), resíduos da filetagem de peixes (Amarowicz e Shahidi, 1997), de suínos (Saiga et al., 2003) e frangos (Sun et al., 2012).

A maioria dos hidrolisados proteicos são produzidos a partir de produtos de origem animal e, portanto, a disponibilidade de matéria prima é um fator determinante para a fabricação, distribuição e regulação do preço destes aditivos. Como o Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango no mundo (Schmidt e Sila, 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 fígado de aves é uma matéria prima com alto potencial para produção de hidrolisado proteico em função da boa composição nutricional e sua utilização in natura apresentar limitações devido seu odor indesejável. Apesar de ser utilizado para o consumo humano, seu reduzido valor econômico tem levado as indústrias a processar esse material, com considerável agregação de valores, para

confeção de rações, o que contribui para a geração de renda para a indústria e a diminuição da poluição ambiental proveniente do descarte deste material (Russ e Meyer-Pittroff, 2004).

A hidrólise das proteínas pode se dar por processo químico, bioquímico (amplamente utilizado em escala industrial – Fig. 1), físico ou microbiológico. Os métodos químicos, comumente utilizados devido a facilidade de operação e custo relativamente baixo, envolvem a utilização de ácidos (hidrólise ácida) ou bases fortes (hidrólise alcalina) (Halim et al., 2016). Os métodos bioquímicos incluem a ação de enzimas proteolíticas endógenas (autólise) e de enzimas exógenas (Zamora-Sillero et al., 2018). O processo físico envolve a elevação da temperatura (Wang et al. 2013) e o microbiológico a utilização de *Bacillus* sp (Jemil et al. 2014). Para obtenção dos peptídeos com propriedades funcionais, é essencial controlar o tempo de hidrólise, o tipo de enzima, bem como estabelecer valores ideais de pH e temperatura (Zamora-Sillero et al., 2018).

Figura 1 - Principais métodos disponíveis para produção de hidrolisados proteicos



Fonte: Adaptado de Zamora-Sillero et al. (2018).

As hidrólises químicas são processos que podem causar degradação de alguns aminoácidos devido à sua reação severa e à clivagem inespecífica das ligações peptídicas, o que resulta em produtos com rendimento heterogêneo de peptídeos e pior qualidade nutricional (Celus et al., 2007). A hidrólise ácida tem como principais solventes os ácidos clorídrico e sulfúrico, que podem causar degradação do triptofano, metionina, cistina e cisteína (Bucci e Unlu, 2000; Pasupuleti et al., 2008; Wisuthiphaet et al., 2015). Na hidrólise alcalina, os principais produtos utilizados são os hidróxidos de cálcio, de sódio ou de potássio, porém alguns aminoácidos, como a serina e a treonina são degradados. Além disso, algumas reações alcalinas

podem levar à formação de substâncias tóxicas como a lisinoalanina, que resulta em perda de valor biológico da proteína (Lahl e Braun, 1994).

A hidrólise por autólise enzimática é um método que utiliza as próprias enzimas proteolíticas presentes na matéria prima como tripsina, quimiotripsina e pepsina, além de enzimas proteolíticas presentes nas células musculares. Apesar dos custos de processamento serem reduzidos, é mais difícil controlar o processo hidrolítico devido à variedade de enzimas, com diferentes atividades, o que limita a produção de peptídeos bioativos (Kristinsson e Rasco, 2000). Além disso, a duração do processo de autólise é muito variável (Tungkawachara et al., 2003) e pode afetar de forma negativa as propriedades funcionais do hidrolisado (Shahidi et al., 1994).

O processo por hidrólise enzimática, com a utilização de enzimas exógenas é o mais utilizado para produção de peptídeos bioativos. O início do processo se dá pela preparação da matéria prima, que deve ser triturada e homogeneizada em água destilada e aquecida a 85-90°C por 20 minutos com a finalidade de inativar enzimas endógenas da matéria prima, o que permite maior controle de quais ligações peptídicas serão hidrolisadas (Molla e Hovannisyan, 2011, Benhabiles et al., 2012; Wang et al., 2013). Em seguida, a enzima exógena comercial é adicionada, sendo necessário que toda reação permaneça em sistema de agitação. A temperatura, pH e o tempo de digestão da reação, variam de acordo com a enzima utilizada e o tipo de substrato (Tabela 1). A temperatura e o pH frequentemente são ajustados e mantidos constantes para otimizar a cinética da enzima ou a mistura de enzimas selecionadas (Kristinsson e Rasco, 2000).

Tabela 1 - Enzimas proteolíticas utilizadas na hidrólise de proteínas

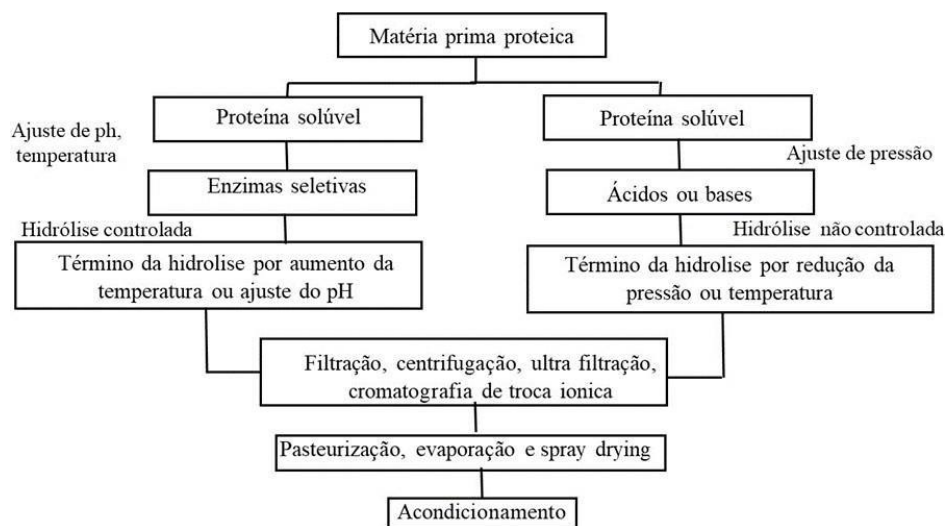
Enzima	Concentração da enzima (%)	nH	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Protamex	-	-	114	39
Alcalase	0,50 – 20,00	7,5 – 10,5	60 - 300	40 - 60
Papaina	0,50	6,0 – 7,0	90	50 - 60
Protease alcalina	-	10 - 11	600	39 – 50
Bromelina	0,50	7,0	90	55
Termolisina	0,01	7,4	120	37
Proteinase K	0,01	7,5	120	37
Flavourzyme	0,02 – 3,0	7,0 – 7,5	120	50
Protease de peixes	-	8,0 – 10,0	180	45 - 55

Fonte: adaptado de Halim et al. (2016).

Diferentes enzimas quebram diferentes ligações peptídicas, em função de suas especificidades. Além disso, a eficiência da hidrólise é influenciada pelo pH, temperatura, a razão enzima/substrato e o tempo de digestão, o que influencia a composição de peptídeos e aminoácidos do hidrolisado (Adler-Nissen, 1984; Kristinsson e Rasco, 2000; DosSantos et al., 2011, Srichanun et al., 2014). Portanto, o controle destas variáveis é essencial para obtenção de peptídeos com propriedades bioativas (Andriamihaja et al., 2013) sem ocorrer a degradação de aminoácidos (Clemente, 2000; Shahidi et al., 1995; Andriamihaja et al., 2013).

Ao atingir o grau de hidrólise desejado, a reação enzimática é interrompida pela elevação da temperatura, com aquecimento de 85-95 °C por 5 a 20 min (Ghassem et al., 2011, Intarasirisawat et al., 2014) ou pela alteração do pH do meio. A inativação das enzimas por meio térmico pode provocar desnaturação de proteínas, que leva a exposição de resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, e consequente agregação de proteínas (Kristinsson e Rasco, 2000), que diminui a qualidade do hidrolisado. Após a inativação enzimática, o produto é centrifugado a fim de separar as frações lipídica, aquosa e proteínas não hidrolisadas. Então, a fração aquosa é liofilizada para secar o hidrolisado sem comprometer a estrutura dos aminoácidos livres e peptídeos bioativos (Kristinsson e Rasco, 2000; Zamora-Sillero et al., 2018) (Fig. 2).

Figura 2 - Principais métodos disponíveis para produção de hidrolisados proteicos



Fonte: Adaptado de Zamora-Sillero et al. (2018).

As enzimas podem ser classificadas como endopeptidases ou exopeptidases, de acordo com a especificidade da posição das ligações peptídicas que hidrolisam. As exopeptidases atuam somente nas extremidades das cadeias polipeptídicas. Quando atuam na ligação peptídica junto ao aminoácido do terminal amino, são chamadas de aminopeptidases, quando atuam junto ao aminoácido do terminal carboxila, são chamadas carboxipeptidases. A ação de exopeptidases produz aminoácidos livres e peptídeos grandes. As endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia polipeptídica, com produção de peptídeos menores, porém, relativamente grandes. Cada endopeptidase hidrolisa ligações entre resíduos de aminoácidos específicos (Rao et al., 1998), assim, diferentes enzimas, agindo em diferentes matérias-primas geram diferentes peptídeos, com diferentes propriedades fisiológicas. As enzimas utilizadas podem ser de origem vegetal, como papaína e bromelina; de origem animal, como pepsina e tripsina (Samaranayaka e Li-Chan, 2011; Kumar et al., 2012; Chi et al., 2015) ou de origem microbiana, como a alcalase produzida pelo *Bacillus licheniformis* (Halim et al., 2016; Samaranayaka e Li-Chan, 2011).

Os pesos e tamanhos moleculares dos peptídeos, bem como a composição de aminoácidos, têm um impacto significativo nas propriedades fisiológicas do hidrolisado (Sarmadi e Ismail, 2010; Picot et al., 2010), assim, os processos de separação e purificação como ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e filtração em gel (GF) permitem aumentar a concentração de peptídeos bioativos no produto comercial e melhorar a eficácia das atividades biológicas dos hidrolisados. A UF de alto peso molecular (20–100 kDa) separa peptídeos de proteínas não hidrolisadas e enzimas proteolíticas, enquanto a UF e NF promovem a separação o hidrolisado de peso molecular ~4–8 kDa, com consequente aumento da concentração de peptídeos de pesos moleculares específicos (Bourseau et al., 2009). A filtração em gel utiliza a cromatografia líquida de desempenho rápido (FPLC) para obter peptídeos com pesos moleculares ≤ 3 kDa (Centenaro et al., 2014). Assim, o tamanho, a sequência de aminoácidos e a concentração de peptídeos bioativos, bem como os tipos e a concentração de aminoácidos livres determinam as propriedades fisiológicas do hidrolisado (Sarmadi e Ismail, 2010), que podem atuar contra microrganismos indesejados, modular a atividade do sistema imune, proteger os tecidos dos animais contra a oxidação, bem como apresentar ações anti-hipertensiva e antitrombótica (Korhonen e Pihlanto, 2006; Kim e Wijesekara, 2010).

4. *Utilização do hidrolisado como aditivo*

Os aditivos mais frequentemente utilizados pelas indústrias de rações são os probióticos e prebióticos, porém, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais também vem sendo

avaliados em pesquisas com diversos animais. Os aditivos podem ser classificados como tecnológicos, que interferem na estrutura e favorecem a conservação das rações; sensoriais, que melhoram as propriedades organolépticas; nutricionais, que fornecem nutrientes essenciais; zootécnicos, que melhoram o desempenho animal e anticoccidianos, que controlam protozoários no intestino dos animais (Gonzales e Mascarenhas, 2014). Entretanto, alguns aditivos podem pertencer a mais de uma categoria por promoverem vários desses efeitos.

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* (Plascencia, et al., 2002) e 10% para *Pseudosciaena crocea* (Tang et al., 2008). Mais recentemente têm sido avaliados como aditivos em dietas para organismos aquáticos (Sary et al., 2017; Silva et al., 2017) em função de suas propriedades sensoriais, por melhorarem a palatabilidade das rações (Chotikachinda et al., 2013), nutricionais, por fornecer aminoácidos essenciais para síntese proteica (Kousoulaki et al., 2013) e por melhorarem o desempenho produtivo dos animais (Aksness et al., 2006).

Como aditivos sensoriais, os hidrolisados atuam principalmente por serem ricos em aminoácidos livres responsáveis pelo efeito estimulatório no consumo dos alimentos (Chotikachinda et al., 2013; Bórquez e Cerqueira 1998; Ruiz-Capillas e Moral 2004). A sensibilidade aos aminoácidos em peixes se dá pelo sistema olfativo, pelo sistema gustativo oral (presentes dentro da cavidade oral; faringe, esôfago, brânquias e lábios) e do sistema gustativo extra oral, em algumas espécies (presente em lábios, nadadeiras, barbilhões e superfície corpórea) (Kasumyan e Dovin, 2003; Shamushaki et al., 2008). Os receptores gustativos de peixes são altamente sensíveis a aminoácidos livres, com respostas espécie-específica (Kasumyan e Dovin, 2003), podendo o mesmo aminoácido apresentar efeito estimulatório da captura e ingestão de alimentos em uma determinada espécie e efeito contrário em outra espécie, mesmo sendo filogeneticamente próximas (Kasumyan e Dovin, 2003). Portanto, os hidrolisados podem apresentar diferentes efeitos no consumo de ração, em diferentes espécies, em função do grau de desenvolvimento do sistema gustativo, da composição da matéria prima e do tipo de processamento do hidrolisado. A inclusão de hidrolisados em dietas proporcionou melhora na palatabilidade em *Oreochromis niloticus* (Sanches- Alves et al., 2019) *Oncorhynchus tshawytscha* (Ho et al., 2012) e *Steindachneridion melanodermatum* (Lewandowski et al., 2013), *Perca flavescens* e *Coregonus clupeaformis* (Kolkovski et al., 2000). Entretanto, para alevinos de *Carassius auratus* (Fries et al., 2011) e para *Salmo salar* (Espe et al., 2006) não foram observadas diferenças significativas na atratividade da palatabilidade com a utilização de hidrolisado nas dietas.

Como aditivos nutricionais, os aminoácidos presentes nos hidrolisados são substrato para síntese proteica e, portanto, contribuem para suprir aqueles em deficiência nos ingredientes vegetais, e assim, reduzir a necessidade de suplementação com aminoácidos sintéticos (Kousoulaki et al., 2013). A suplementação de hidrolisados apresentou efeitos positivos na retenção de aminoácidos essenciais em *Salmo salar* (Refstie et al., 2004) e na eficiência de utilização de proteínas de *Pagrus major* (Bui et al., 2014) e *Paralichthys olivaceus* (Zheng et al., 2012). Porém, para *Scophthalmus maximus* não melhorou o crescimento e a utilização dos nutrientes da dieta (Xu et al., 2016).

Como aditivo zootécnico, a suplementação de hidrolisado de peixe melhorou o crescimento tanto em espécie de peixes onívoro (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% (Sary et al., 2017), e em juvenis da mesma espécie a inclusão não melhorou o desempenho produtivo (Leal et al., 2010).

Além de fornecer aminoácidos e outros nutrientes, os hidrolisados também podem melhorar o desempenho produtivo dos animais por meio da ação de peptídeos com capacidade de regular processos fisiológicos (Korhonen e Pihlanto, 2006; Kim e Wijesekara 2010). Para ser tornarem ativos, os peptídeos precisam ser liberados por hidrólise de ligações peptídicas específicas das proteínas de diversas matérias-primas (Udenigwe e Aluko, 2012).

As atividades antimicrobiana e imunomoduladora de peptídeos bioativos dos hidrolisados podem gerar impactos positivos na produção de peixes pela redução da taxa de mortalidade quando estes estão sob condições de desafio, como observado para larvas de *Dicentrarchus labrax*, quando infectados com *Vibrio anguillarum* e para *Pagrus major* quando infectados com *Edwardsiella tarda* (Kotzamanis et al., 2007; Tang et al., 2008; Bui et al., 2014; Robert et al., 2015).

5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre a formação e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Apesar das ERO e ERN estarem envolvidas em processos fisiológicos como a sinalização na neurotransmissão, relaxamento do músculo liso, regulação da pressão sanguínea e da resposta imune (Beneš et al., 1999; Freidovich, 1999; McCord, 2000; Arrigone e Tullio, 2002; Valko et al., 2007), quando em excesso, podem causar danos em lipídeos, proteínas e DNA e levar à morte celular (Valko et al., 2007).

O radical hidroxila (OH^\bullet) se constitui o mais reativo dos radicais livres, com meia vida muito curta, mas com efeito de extrema toxicidade, sendo responsável pelos danos às estruturas do DNA, com modificações nas bases purínicas e pirimidínicas, o que leva a alterações na expressão gênica (Richter, 1997). Além disso, é capaz de inativar diversas proteínas (enzimas, proteínas de membrana e da matriz extracelular) e iniciar a oxidação dos ácidos graxos insaturados dos fosfolípidos nas membranas celulares, causando peroxidação lipídica, o que gera o radical lipídico (L^\bullet) altamente reativo (Halliwell e Gutteridge, 1986).

A peroxidação lipídica é um processo onde os radicais livres retiram um hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla cis de um ácido graxo polinsaturado (L) nas membranas celulares, o que leva a destruição de sua estrutura. Com o comprometimento dos mecanismos de troca através das membranas, ocorre a liberação de conteúdos de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos como hidrocarbonetos (etanol) e aldeídos como 4-hidroxinonenal e o malonaldeído (MDA), o que pode levar à morte celular (Benzie, 1996). O processo de peroxidação envolve reações em cadeia com capacidade de autopropagação que consiste em três etapas: iniciação, propagação e terminação, conhecido como propagação de reações em cadeia (Gardès-Albert e Ferradini, 1991; Fridovich, 1999; Valko et al., 2007). Um radical livre inicia o processo com a formação de um radical lipídico (L^\bullet), também chamado de radical carbonila. Durante a etapa de propagação, na presença de O_2 , os radicais lipídicos desencadeiam a formação de radicais peróxilos (LOO^\bullet), que podem retirar outro hidrogênio de outro ácido graxo, gerando mais L^\bullet e um hidroperóxido (LOOH). Este, por sua vez, gera o radical alcóxido (LO^\bullet), que é mais reativo que o LOO^\bullet , e pode reiniciar a lipoperoxidação retirando mais um hidrogênio de outro ácido graxo insaturado com a formação de L^\bullet e um álcool, e degradar-se em outros compostos como o malondialdeído (MDA) (Martínez et al., 2003). O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores sejam removidos pela reação com outros radicais, formando produtos inativos – LOOL (Burton e Traber, 1990) ou sejam inativados por reações com antioxidantes como a vitamina E ou a glutatona (Kowaltowski e Vercesi, 1999).

Assim como as EROs, as ERNs, quando em excesso, também podem causar prejuízos para a saúde, sendo o principal radical reativo, o óxido nítrico (NO^\bullet). O seu excesso causa o estresse nitrosativo por meio da nitrosilação de proteínas, que pode prejudicar suas propriedades fisiológicas (Ridnour et al., 2004). O NO^\bullet é solúvel em meios aquosos e lipídicos, difunde-se através do citoplasma e das membranas plasmáticas (Chiueh, 1999). A reação entre o ânion superóxido e o óxido nítrico, resultam no ânion peroxinitrito (ONOO^-), uma molécula

considerada um potente agente oxidante, que pode fragmentar o DNA e contribuir com oxidação lipídica (Carr et al., 2000). Dessa forma, a toxicidade do NO^\bullet está predominantemente ligada à sua capacidade de combinar com os ânions superóxido e aos metais de transição (Archer, 1993).

O aumento na formação das espécies reativas ocorre em condições ambientais subótimas ou sob alguma forma de desafio, em condições fisiológicas, ocorre a neutralização dessas espécies reativas por mecanismos de defesas antioxidantes, o que limita os níveis intracelulares e impede a indução de danos (Sies, 1993). Um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato” (Halliwell e Gutteridge, 1995). Esses agentes podem ser classificados como antioxidante enzimático e antioxidante não enzimático (Bianchi e Antunes, 1999).

Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido a dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-peroxidase (GPx), glutatona-redutase (GRED) e glutatona S-transferase (GST) (Arrigoni e Tullio, 2002; Valko et al., 2007). Os principais antioxidantes não enzimáticos são compostos o ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (vitamina E – antioxidante natural da membrana) e glutatona reduzida (GSH), entre outros como o caroteno, ácido úrico, flavonoides e ácidos fenólicos (Hermes-Lima, 2004; Valko et al., 2007; Ferreira et al., 2009).

A SOD converte $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , protegendo as células aeróbicas da ação do superóxido. O acúmulo de peróxido de hidrogênio, por sua vez, é evitado pela ação das enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) que atuam de maneira integrada. A CAT catalisa a conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O nos peroxissomos e a GPx é uma enzima dependente do selênio, que atua nas mitocôndrias, citosol e núcleo. A ação destas enzimas é de extrema importância pois evita o acúmulo de $\text{O}_2^{\bullet-}$, e consequente formação de OH^\bullet , contra o qual não há sistema enzimático de defesa (Ferreira e Matsubara, 1997; Fang et al., 2002; Koury e Donangelo, 2003; Valko et al., 2007).

A glutatona é um antioxidante insolúvel, um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, que pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). Em situações de estresse oxidativo, a GSH é consumida e ocorre a formação da GSSG., que através da glutatona redutase (GRED), uma enzima citosólica, realiza a regeneração da GSSG em GSH. Assim, essa enzima participa indiretamente no combate aos radicais livres, pois a GSH é uma das principais moléculas antioxidantes dos compartimentos celulares (Valko et al., 2007). A glutatona s-transferase (GST), catalisa reações da glutatona com produtos da peroxidação lipídica. A GSH possui papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo, pode

atuar diretamente na redução dos radicais livres ou indiretamente na regeneração dos diversos agentes antioxidantes, dentre eles, a G-px, a GST e as vitamina E e C. (fig. 2) (Masella et al., 2005; Valko et al., 2007; Ferreira et al., 2009;).

A vitamina C ocorre de forma predominante em ascorbato ($AscH^-$), sendo um excelente agente antioxidante na eliminação de radicais livres, e que de forma sinérgica regenera a vitamina E (Fig. 3) (Bianchi e Antunes, 1999; Li e Schellhorn, 2007). A vitamina E doa hidrogênio, para os radicais peroxilo (LOO^\bullet) e alcoxilo (LO^\bullet), principal agente contra a peroxidação lipídica, impedindo a propagação da reação em cadeia (Traber e Packer, 1995; Davey et al, 2000). Portanto, a vitamina C e E destacam se por serem antioxidantes naturais, que são essenciais na proteção das membranas biológicas (Chew, 1995; Sies, 1997; Nagaoka et al, 2007).

6. *Respostas de estresse*

A intensidade de produção de ERO e a severidade do estresse oxidativo estão relacionadas principalmente com a atividade mitocondrial. Quanto maior o consumo de oxigênio na respiração celular, maior é a produção de ERO (Bianchi e Antunes, 1999). Portanto, quando os peixes são expostos a fatores estressores, como ocorre durante os manejos de classificação, onde os peixes são capturados, contidos em altas densidades e expostos ao ar, ocorre a liberação de hormônios que preparam os animais para enfrentar estas situações. Quando a duração da exposição ao fator estressor é curta, os animais exibem alterações fisiológicas que aumentam a probabilidade de sobrevivência, porém, estas respostas adaptativas também causam distúrbios na homeostase, com redução das reservas energéticas e inibição dos processos digestivos (Carneiro e Urbinati, 2001; Sampaio e Freire, 2016). Quando o animal permanece exposto ao fator estressor por mais tempo, o estresse se torna crônico, com prejuízos para a saúde e o desempenho produtivo, como ocorre quando os peixes são manejados com alta frequência ou mantidos em condições subótimas de qualidade de água, densidade de estocagem e alimentação (Pickering, 1993; Costa et al., 2004; Urbinati et al., 2004).

O sinal estressor, além de ser processado nas áreas sensoriais (visual, olfativa, linha lateral), que permite que o animal tome consciência da situação adversa, também ativa centros no hipotálamo, que desencadeiam ajustes fisiológicos que permitem ao animal enfrentar ou escapar dessa situação. As repostas desencadeadas pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático são mais rápidas, com liberação do neurotransmissor noradrenalina junto a diversos órgãos como o coração, vasos sanguíneos, sistema digestório, respiratório e mobilização das reservas energéticas, com elevação da glicose sanguínea e redução do glicogênio hepático

(Mazeaud e Mazeaud, 1981; Carneiro e Urbinati, 2001). O sistema nervoso autônomo simpático também estimula o tecido cromafim (equivalente a medula das glândulas adrenais dos mamíferos) e causa liberação de adrenalina no sangue, que reforça os efeitos causados pela noradrenalina. Simultaneamente, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a glândula hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez, estimula o tecido adrenocortical (equivalente ao córtex das glândulas adrenais dos mamíferos) a liberar cortisol na corrente sanguínea. Como esse controle é inteiramente endócrino, as repostas de estresse demoram mais a começar do que as repostas desencadeadas pelo sistema nervoso autônomo. O cortisol também apresenta efeito hiperglicemiante por estimular a gliconeogênese no fígado, diminuir a captação de glicose pelos músculos e tecido adiposo, aumentar a proteólise e inibir a síntese proteica nos músculos e tecido conjuntivo.

As repostas de estresse em peixes são denominadas como Síndrome Geral de Adaptação, a qual apresenta três estágios (Selye 1950; Oba et al., 2009). A resposta primária (reação de alarme) é caracterizada pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático, bem como pela elevação dos níveis plasmáticos de hormônios como as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides (cortisol e cortisona) (Oba et al, 2009). A ativação das células alvo por estes hormônios desencadeia as repostas secundárias, que envolvem principalmente a mobilização de reservas energéticas, que permite que o animal enfrente ou escape da situação adversa. A ativação dos sistemas circulatório e respiratório contribui para o atendimento das necessidades imediatas dos músculos, mas também causa distúrbios na homeostase como alterações hidroeletrólíticas, hematológicas e no comportamento alimentar (McDonald e Milligan, 1997; Carneiro e Urbinati, 2001; Pickering, 1993; Barton et al., 2002). Quando o fator estresse permanece por dias ou semanas, são desencadeadas as repostas terciárias, conhecida como fase de exaustão, caracterizando o estresse crônico. Nestas condições, o cortisol plasmático permanece alto e ocorre atrofia do tecido muscular, enfraquecimento do tecido conjuntivo e ossos, distúrbios alimentares, diminuição da atividade do sistema imune e hematopoiético, supressão da atividade reprodutiva e aumento na taxa de mortalidade (Laurent e Perry, 1989; Selye, 1950; Jobling 1995; Schreck, 2000; Lima et al., 2006).

Dessa forma, são necessários estudos para avaliar o potencial de hidrolisados proteicos como aditivos em rações para peixes, para atuarem como palatabilizantes e promotores de crescimento, bem como melhorar a capacidade dos peixes para enfrentar os desafios relacionados a qualidade da dieta e ao estresse do manejo na criação.

REFERÊNCIAS

- Adler- Nissen, J., 1984. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 34(3), 215-222.
- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B.T., Albrektsen, S., 2006. Size-fractionated 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
- Aksnes, A., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Influence of fish meal quality and feed pellet on growth, feed efficiency and muscle composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 153(3-4), 251-261.
- Amarowicz, R., Shahidi, F., 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 58(4), 355-359.
- Andriamihaja, M., Guillot, A., Svendsen, A., Hagedorn, J., Rakotondratinaina, S., Tomé, D. e Blachier, F., 2013. Eficiência comparativa de preparações de enzimas microbianas versus pancreatina para digestão protéica alimentar in vitro. *Aminoácidos*. 44 (2), 563-572.
- Archer, S., 1993. Measurement of nitric oxide in biological models. *The FASEB journal*. 7(2), 349-360.
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1569(1-3), 1-9.
- Bah, C.S., Carne, A., McConnell, M.A., Mros, S., Bekhit, A.E.D.A., 2016. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food chemistry*. 202, 458-466.
- Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M.M., 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. 111-148.
- Bellaver, C., Snizek Junior, P.N., 1999. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In *Congresso Brasileiro da Soja*. Londrina, Paraná. 320, 183-199.
- Beneš, L., Ďuračková, Z., Ferenčík, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*. 65(18-19), 1865-1874.
- Benhabiles, M.S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M.F.A., Mameri, N., 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering: C*. 32(4), 922-928.
- Benzie, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement, and dietary influences. *International journal of food sciences and nutrition*. 47(3), 233-261.

- Bhaskar, N., Modi, V.K., Govindaraju, K., Radha, C., Lalitha, R.G., 2007a Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresour Technol.* 98:388–394
- Bianchi, M.D.L.P., Antunes, L.M.G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição.* 12(2), 123-130.
- Bolivar, R. B., Cruz, E. V., Jimenez, E. B. T., Sayco, R. M. V., Argueza, R. L. B., Ferket, P. R., Stark, C.R., Malheiros, R., Ayoola, A.A., Johnstone III, W.M., Picha, M. E., Holler, B.L., Won, E.T., Borski, R.J., 2010. Feeding reduction strategies and alternative feeds to reduce production costs of tilapia culture (Vol. 1, pp. 50-78). Technical Reports: Investigations 2007-2009. AquaFish Collaborative Research Support Program. Oregon State University.
- Bórquez, A., Cerqueira, V.R., 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*: I. Individual effect of some chemical substances. *Aquaculture.* 169(1-2), 25-35.
- Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Peron, M., Le, G.Y., Ravallec-Ple, R., Bergé, J. P., Picot, L., Piot, J.M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., 200. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination.* 244(1-3), 303-320.
- Bucci, L., Unlu, L., 2000. Proteins and amino acid supplements in exercise and sport. Driskell L, Wolinsky I (eds). *Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition.*
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K.J., 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture.* 418, 11-16.
- Butolo, J.E., 2002. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. JE Butolo.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E. C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research.* 32(4), 297-304.
- Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B., 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 20(7), 1716-1723.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Teles, A.O., Bergot, P., 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International.* 5(4), 361-367.
- Celus, I., Brijs, K., Delcour, J.A., 2007. Hidrólise enzimática das proteínas de grãos gastos dos fabricantes de cerveja e propriedades tecnofuncionais dos hidrolisados resultantes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55 (21), 8703-8710.

- Centenaro, G.S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M.L., Prentice, C., 2014. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. *Applied biochemistry and biotechnology*. 172(6), 2877-2893.
- Chen, B.P., 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *The Journal of nutrition*. 125(suppl_6), 1804S-1808S.
- Chi, C.F., Wang, B., Hu, F.Y., Wang, Y. M., Zhang, B., Deng, S. G., Wu, C. W., 2015. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*. 73, 124-129.
- Chiueh, C.C., 1999. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 890(1), 301-311.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T., Kumarnsit, E., 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*. 19(5), 773-784.
- Clemente, A., 2000. Hidrolisados de proteínas enzimáticas na nutrição humana. *Trends in Food Science & Technology*. 11 (7), 254-262.
- Da Costa, O.T.F., dos Santos Ferreira, D.J., Mendonça, F.L.P., Fernandes, M.N., 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232(1-4), 627-636.
- Davey, M.W, Montagu, M.V, Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, J.J.I., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., 2000. Plant L - ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (7), 825-860.
- Dos Santos, S.D.A., Martins, V.G., Salas-Mellado, M., Prentice, C., 2011. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*. 4(8), 1399-1406.
- Fabregat, T.E.H.P., Fernandes, J.B.K., Rodrigues, L.A., de Azevedo R.F., Sakomura, N.K., 2006. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de apaiari (*Astronotus ocellatus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 28, 477-482.
- Fabregat, T.E.H.P., Pereira, T.S., Boscolo, C.N., Alvarado, J.D., Fernandes, J.B.K., 2018. Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. *Boletim do Instituto de Pesca*. 37, 289-294.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10), 872-879.
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

- Fernandes, V.G., 1998. Co-produtos da industrialização do ilho. In: Simpósio De Nutrição Animal – Bovinos leiteiros. 1, 1998, Pinhal. Anais. Pinhal: Fundação Pinhalense de Ensino, 1998. p.117-130.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L. S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da associação médica brasileira. 43(1), 61-68.
- Ferreira, I. C., Barros, L., Abreu, R., 2009. Antioxidants in wild mushrooms. Current Medicinal Chemistry. 16(12), 1543-1560.
- Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M.A, Coimbra, J., 1999. Substituição de farelo de peixe por proteínas vegetais na dieta da tilápia do Nilo: digestibilidade e desempenho de crescimento. Aquaculture International. 7, p. 57-67.
- Francis, G., Makkar, H.P; Becker, K., 2001. Fatores antinutricionais presentes em peixes alternativos derivados de plantas alimentam ingredientes e seus efeitos nos peixes. Aquaculture. 199, 197-227.
- Fridovich, I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what is the matter with oxygen? Annals of the New York Academy of Sciences, 893(1), 13-18.
- Fries, E.M., Luchesi, J.D., Costa, J.M., Ressel, C., Signor, A.A., Boscolo, W.R., Feiden, A., 2018. Hidrolisados cárneos proteicos em rações para alevinos de Kinguio (*Carassius auratus*). Boletim do Instituto de Pesca. 37(4), 401-407.
- Furlaneto, F.P.B., Ayroza, D., Ayroza, L., 2010. Análise econômica da produção de tilápia em tanques-rede, ciclo de verão, região do médio Paranapanema, Estado de São Paulo, 2009. Informações Econômicas. 40(4), 5-11.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B.T., Mamauag, R. E., 2013. Effect of dietary oxidized fish oil and vitamin C supplementation on growth performance and reduction of oxidative stress in Red Sea Bream *Pagrus major*. Aquaculture Nutrition. 19(1), 35-44.
- Gardès-Albert, M., Jore, D., Ferradini, C., 1991. Membrane lipid peroxidation: pulse and γ -radiolysis in oxyradical research. Membrane lipid oxidation. 2, 1-30.
- Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C., 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food research international. 37(2), 123-131.
- Gonzales, E.; Mascarenhas, A.G. Regulamento do Uso de Aditivos na Alimentação Animal. In: Sakomura, N.K.; Silva, J.H.V.; Costa, F.G.P.; Batista, J K., Fernandes, J.B.K.; Hauschild, L. (Org.). Nutrição de Não Ruminantes. 1ed. Jaboticabal: FUNEP, 2014, v. 1, p. 459-465, 2014.
- 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.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*. 246(2), 501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 1-85). Academic Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology & medicine*. 18(1), 125.
- Hermes- Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and Adaptation*, 319-368.
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L., Recio, I., 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*. 17(1), 42-49.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R.B.S.B., Mehiri, M., Hajji, M., Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*. 49(6), 963-972
- Jobling, M., 1995. Fish bioenergetics. *Oceanographic Literature Review*, 9(42), 785.
- Kasumyan, A.O., Doving, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish and fisheries*. 4(4), 289-347.
- Kim, S.K., Wijesekara, I., 2010. Desenvolvimento e atividades biológicas de peptídeos bioativos derivados do mar: uma revisão. *Journal of Functional foods*. 2 (1), 1-9.
- Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M.M., Anderson, J.L. 2015. Fish to 2030: the role and opportunity for aquaculture. *Aquaculture economics & management*. 19(3), 282-300.
- 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*. 31(1), 81-88.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*. 16(9), 945-960.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, 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.
- Koury, J. C., Donangelo, C. M., 2003. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*. 16(4), 433-441.
- Kousoulaki, K., Rønnestad, I., Olsen, H.J., Rathore, R., Campbell, P., Nordrum, S., Berge, R.K., Mjøs, S.A., Kalanathan, T., Albrektsen, S., 2013. Krill hydrolysate free amino acids responsible for feed intake stimulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*. 19, 47-61.

- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(3-4), 463-471.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000a. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*. 40(1), 43-81.
- Kubitza, F. *Nutrição e alimentação dos peixes cultivados*. 3ª ed. Piracicaba: Degaspari Ltda. 1999, p.53- 65.
- Kumar, N.S., Nazeer, R.A., Jaiganesh, R., 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*. 42(5), 1641-1649.
- Lahl, W.J., Braun, S.D., 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food technology (Chicago)*. 48(10), 68-71.
- Laurent, P., Perry, S.F., 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research*. 259(3), 429-442.
- 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.
- Lee, K.J., Dabrowski, K., Blom, J.H., Bai, S.C., Stromberg, P. C., 2002. A mixture of cottonseed meal, soybean meal and animal byproduct mixture as a fish meal substitute: growth and tissue gossypol enantiomer in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 86(7- 8), 201-213.
- Li, Y., Schellhorn, H.E., 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of nutrition*. 137(10), 2171-2184.
- Lin, S., Luo, L., 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes, and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*. 168, 80-87.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 16(10), 577-586.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., 1981. Adrenergic responses to stress in fish. Pages 49-75 in Pickering, A.D., *Stress and fish*. Academic Press. London.
- McCord, J. M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 108(8), 652-659.
- McDonald, G., Milligan, L., 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. Pages 119-144 in Iwama, G.W., A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck, editors. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press.

- Meeker, D.L., 2009. North American Rendering: processing high quality protein and fats for feed. *Revista Brasileira de Zootecnia*.38(SPE), 432-440.
- Molla, A.E., Hovannisyanyan, H.G., 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga *Huso huso* using Protamex. *International Aquatic Research (Islamic Azad University, Tonekabon Branch)*. 3(2).
- Nagaoka, S.I., Kakiuchi, T., Ohara, K., Mukai, K., 2007. Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chemistry and physics of lipids*. 146(1), 26-32.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 405(6790), 1017-1024.
- Oba, E.T., Mariano, W.D.S., Santos, L.D., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, 226-247.
- Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L., Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*. 179(1-4), 195-201.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clínica chimica acta*. 333(1), 19-39.
- Pasupuleti, V.K., Braun, S., 2008. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 11-32). Springer, Dordrecht.
- Peixe, BR., 2020. Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 20 2020. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura.
- Pereira- da- Silva, E.M., de Oliveira, R.H.F., Nero, B.D., 2016. Menthol as anaesthetic for lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000): attenuation of stress responses. *Aquaculture Research*. 47(5), 1413-1420.
- Pereira-da-Silva, E.M., Pezzato, L.E., 2000. Respostas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29(5), 1273-1280.
- Pezzato, L.E., Barros, M.M., Furuya, W. M., 2009. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38(SPE), 43-51.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C.D., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M., Pezzato, A. C., 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31(4), 1595-1604.
- Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. In *Genetics in aquaculture*. (pp. 51-63). Elsevier.

- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau- Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Bergé, J. P., Piot, J.M., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I. Bourseau, P., 2010. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1819-1826.
- Rao, M.B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), 597-635.
- Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*. 239(1-4), 331-349.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., Xue, S. J., 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 108(2), 727-736.
- Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., Wink, D.A., 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological chemistry*. 385(1), 1-10.
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Henry, J., 2015. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*. 50(3), 487-492
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., 2004. Free amino acids in muscle of Norway lobster (*Nephrops norvegicus* (L.)) in controlled and modified atmospheres during chilled storage. *Food Chemistry*. 86(1), 85-91.
- Russ, W., Meyer-Pittroff, R., 2004. Utilizing waste products from the food production and processing industries. *Critical reviews in food science and nutrition*. 44(1), 57-62.
- Saiga, A.I., Tanabe, S., Nishimura, T., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(12), 3661-3667.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. R., 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food chemistry*. 86(1), 99-103.
- Samaranayaka, A.G., Li-Chan, C.E., 2011. Antioxidantes peptídicos derivados de alimentos: uma revisão de sua produção, avaliação e possíveis aplicações. *Jornal de alimentos funcionais*. 3 (4), 229-254.
- Sampaio, F.D., Freire, C. A., 2016. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries*. 17(4), 1055-1072.

- Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31(10), 1949-1956.
- 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), 1-6.
- 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.
- Schneider, C.D., Oliveira, A.R.D., 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10(4), 308-313.
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and comparative endocrinology*. 165(3), 549-556.
- Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British medical journal*. 1(4667), 1383.
- Shahidi, F., Han, X.Q., Synowiecki, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*. 53(3), 285-293
- 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.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*. 82(2), 291-295.
- Silva, T.C.D., Rocha, J.D., Moreira, P., Signor, A., Boscolo, W.R., 2017. Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 52(7), 485-492.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Chotikachinda, R., 2014. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. *Aquaculture*. 428, 195-202.
- Sun, Y., Pan, D., Guo, Y., Li, J. 2012. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*. 50(10), 3397-3404.
- 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.
- Teixeira, E.D.A., Crepaldi, D.V., Faria, P.M.C., Ribeiro, L.P., Melo, D.C., Euler, A.C. C., Saliba, E.D.O., 2006. Substituição de farinha de peixes em rações para peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 30(3/4), 118-125.
- Traber, M.G., Packer, L., 1995. Vitamin E: beyond antioxidant function. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1501S-1509S.

- Trushenski, J.T., Kohler, C.C., 2011. Replacement of marine feedstuffs with stabilized poultry protein meal and fat in practical diets for Sunshine Bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. *Journal of Applied Aquaculture*. 23(4), 329-350.
- Tungkawachara, S., 2003. Characterization of biochemical, functional properties, and market potential of Pacific whiting fish sauce.
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2012. Food protein- derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*. 77(1), R11-R24.
- Urbinati, E.C., de Abreu, J.S., da Silva Camargo, A.C., Parra, M.A.L., 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229(1-4), 389-400.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39(1), 44-84.
- Vergara, J.M., Lopez-Calero, G., Robaina, L., Caballero, M. J., Montero, D., Izquierdo, M. S., Aksnes, A., 1999. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture*. 179, 35-44.
- Wang, L.L., Xiong, Y.L., 2005. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(23), 9186-9192.
- Wang, W., Li, Z., Liu, J., Wang, Y., Liu, S., Sun, M., 2013. Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. *Czech Journal Food Science*, 31(1), 1-4
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*. 244(1-4), 349-357.
- Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., Chamcheun, C., 2015. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *J. Medical Bioeng*. 4.
- Xu, H., Mu, Y., Zhang, Y., Li, J., Liang, M., Zheng, K., Wei, Y., 2016. Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. *Aquaculture*. 454, 140-147
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., Ren, J., 201). In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Food Chemistry*. 124(1), 188-194.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., Prentice, C., 2018. Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Marine Biotechnology*, 20, 118-130.
- Zani, A., 2015-2017. Boletins informativos do Setor de Alimentação Animal. Sindirações.

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

Zhou, C.D., Li, H.Y., He, J. X., 2010. Effects of Replacing Fish Meal with Corn Gluten Meal on The Palatability and Growth of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*. 4.

Zhou, X., 2017. An overview of recently published global aquaculture statistics. *FAO Aquaculture Newsletter*. (56), 6.

CAPÍTULO 2
HIDROLISADO PROTEICO DE FÍGADO DE AVES COMO ADITIVO EM DIETAS
PARA TILÁPIA DO NILO

Artigo redigido com base nas normas do periódico *Animal Feed Science and Technology*.

INTRODUÇÃO

A alimentação de peixes pode representar até 70% dos custos totais de produção (Bolivar et al., 2010; Furlaneto et al., 2010) em função da elevada exigência por proteína e do elevado custo dos ingredientes proteicos (Bolivar et al., 2010). Portanto, substituir os ingredientes proteicos tradicionalmente utilizados por outros menos onerosos, como os de origem vegetal, pode ser uma boa maneira de reduzir os custos com as dietas.

Apesar de diversos estudos apontarem a possibilidade de substituição integral da farinha peixe em dietas para tilápias sem comprometer o crescimento (El-Saidy e Gaber, 2002; Lin e Luo, 2011; Hassaan et al., 2019a), em condições de desafio, os peixes frequentemente apresentam maior exigência por alguns nutrientes que podem não estar presentes no ingrediente escolhido como alternativa (Booman et al., 2018; Wang et al., 2019; Zheng et al., 2016;). Nos sistemas intensivos, os peixes são expostos a manejos mais frequentes, como classificações, captura, contenção, adensamento e exposição ao ar. Estes fatores podem causar estresse e, conseqüentemente, redução no consumo de alimento, o que leva a prejuízos no desempenho, redução da atividade do sistema imune e aumento da susceptibilidade a doenças (Wilhelm et al, 2005; Gao et al., 2013).

Dessa forma, a inclusão de aditivos nas dietas podem ser estratégias para minimizar os efeitos do estresse gerado pelo manejo. Os mais frequentemente utilizados pelas indústrias são os probióticos e prebióticos, além das enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais. Os hidrolisados proteicos são comumente utilizados como ingredientes proteicos em substituição à farinha de peixe, porém, também têm sido avaliados como aditivos em dietas para organismos aquáticos (Sary et al, 2017; Silva et al, 2017.) em função da capacidade de modular processos fisiológicos (Shahidi e Zhong, 2008).

Hidrolisados proteicos são produtos da quebra de proteínas provenientes de subprodutos industriais, de origem animal ou vegetal, caracterizados por possuir fragmentos de peptídeos com 2 a 20 aminoácidos, bem como aminoácidos livres (Halim et al., 2016). Podem ser considerados aditivos sensoriais, por melhorarem a palatabilidade das rações (Chotikachinda et al., 2013), nutricionais, por fornecerem aminoácidos essenciais para síntese proteica (Kousoulaki et al, 2013) e zootécnicos por melhorarem o desempenho produtivo dos animais (Aksness et al., 2006), em função das ações imunomoduladora (Shahidi e Zhong, 2008) e antibacteriana (Jemil et al., 2014), que favorece o equilíbrio da microbiota intestinal e, conseqüentemente da eficiência de utilização dos nutrientes. Tais efeitos são mediados pela presença de peptídeos bioativos (Halim et al., 2016), que também podem regular a secreção de

hormônios gastrointestinais (Cudennec et al., 2008) e interferir no status oxidativo dos tecidos (Jemil et al., 2014; Wang et al., 2018).

Portanto, com o presente estudo, objetivamos avaliar o potencial do hidrolisado proteico do fígado de aves, como aditivo sensorial, nutricional e zootécnico, em dietas para juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. O experimento foi realizado em duas fases sequenciais, sendo a primeira para avaliar o crescimento e a eficiência de utilização dos nutrientes e a segunda para avaliar o status oxidativo e as repostas de estresse após exposição ao ar em juvenis de tilápia do Nilo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), protocolo nº 94/2019 (Anexo 1), de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a legislação vigente.

Animais e Condições Experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado delineamento em blocos casualizado com cinco tratamentos e três repetições por bloco. Foram avaliadas quatro dietas formuladas a base de ingredientes de origem vegetal, suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado proteico (0; 1, 2 e 4%) e uma dieta premium, formulada a base de ingredientes de origem animal, considerada o controle positivo. Os blocos foram constituídos por duas classes de peso inicial ($1,70 \pm 0,10$ g no bloco 1 e $1,38 \pm 0,13$ g no bloco 2). Na primeira fase experimental cada aquário foi considerado uma unidade experimental, enquanto na segunda fase, cada peixe foi considerado uma unidade experimental.

As dietas foram formuladas com base nas exigências nutricionais da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, segundo Furuya (2010) e NRC (2011) (Tabela 1). Foi utilizado hidrolisado proteico de fígado de aves (Falbom Agroindustrial Ltda - Faltech F1[®]; Tabela 2).

Na preparação das dietas, o hidrolisado proteico foi adicionado juntamente com os macronutrientes e posteriormente misturados aos demais ingredientes. A mistura foi homogeneizada, peletizada, seca em estufa de ventilação forçada (55°C por 24h), triturada, peneirada até a obtenção de péletes de tamanho adequado à boca dos peixes nas diferentes fases de desenvolvimento, e estocada em freezer a - 20°C. A análise da composição química das dietas experimentais foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de

Zootecnia da UFV. Os teores de energia bruta, matéria seca e proteína bruta foram analisados segundo Detmann et al. (2012).

Juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foram mantidos em 30 aquários contendo 60L de água, em sistema de recirculação, dotados de aeração, filtros mecânico, biológico e ultravioleta, temperatura controlada por aquecedores e termostatos (27°C), em densidade de estocagem de 18 peixes/aquário (0,33 peixes/L de água). O laboratório foi mantido em fotoperíodo de 12 h luz.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, quatro vezes ao dia, durante 45 dias. Semanalmente foram avaliadas as seguintes variáveis de qualidade da água: pH por meio peagâmetro digital (Digimed) e amônia total por meio de kit colorimétrico (labconTest). A amônia tóxica foi calculada com base na expressão: amônia tóxica = amônia total / $(1 + 10^{(0,0902 - \text{pH}) + (2730 / (273,2 + \text{temperatura}))})$). Estas variáveis mantiveram-se ao longo de todo o período experimental dentro dos limites adequados para o cultivo de tilápia do Nilo segundo Popma e Masser, (1999), com valores médios (\pm desvio padrão) pH de $6,514 \pm 0,53$, temperatura $26,6 \pm 0,22$ C e amônia tóxica de $0,0019 \pm 0,0025$ mg L⁻¹. Ao final do período experimental, os peixes foram eutanasiados por excesso de anestésico (400 mg/L de óleo de cravo) para a coleta de amostras para análises laboratoriais.

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas vegetais com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves e a dieta *premium* com farinha de peixe.

Ingredientes	Hidrolisado proteico (g/kg)				Premium
	0	1	2	4	
Farelo soja	153,00	140,00	130,00	107,00	77,00
Glúten de milho	270,00	270,00	270,00	270,00	0,00
Farinha peixe	0,00	0,00	0,00	0,00	250,00
Farinha de vísceras	0,00	0,00	0,00	0,00	120,00
Fubá milho	343,80	346,60	349,10	356,50	320,00
Hidrolisado	0,00	10,00	20,00	40,00	0,00
Farelo trigo	120,00	120,00	120,00	120,00	200,00
Celulose	17,50	19,00	19,00	21,00	17,00
L – Lisina	10,30	10,20	9,70	9,80	0,00
DL – Metionina	0,20	0,00	0,00	0,00	0,80
Óleo soja	44,00	44,00	42,00	38,00	10,00
Fosfato bicálcico	29,00	27,00	25,00	20,00	0,00
Calcário	7,00	8,00	10,00	12,5	0,00
Premix vitamínico e mineral ¹	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
BHT ²	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Composição química das rações					
Matéria seca (g kg ⁻¹)	897,89	895,50	901,46	898,24	900,00
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4.370,00	4.402,00	4.466,00	4.418,00	4357,00
Proteína bruta (g kg ⁻¹ da MS)	318,57	313,56	317,61	311,14	339,93
Extrato etéreo (g kg ⁻¹ da MS)	7,15	7,14	6,94	6,55	8,05
Fibra bruta ³ (g kg ⁻¹)	4,02	4,06	4,01	4,03	3,99
Cálcio total ³ (g kg ⁻¹)	1,06	1,05	1,07	1,04	3,29
Fósforo disponível ⁴ (g kg ⁻¹)	0,66	0,66	0,67	0,66	0,93

¹Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000 UI ; Vit. D3 ; 200.000 UI ; Vit. E, 12.000 mg ; Vit. K3, 2.400 mg ; Vit. B1, 4.800 mg ; Vit. B2, 4.800 mg ; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Ac. Fólico, 1.200 mg; Pantotenato Ca, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ferro, 10.000 mg; Cobre, 6.000 mg; Manganês, 4.000 mg; Zinco, 6.000 mg; Iodo, 20 mg; Cobalto, 2 mg; Selênio, 20 mg;

² Butil hidroxi tolueno (antioxidante);

³ Valores calculados de acordo com a composição química dos alimentos apresentada por Rostagno et al. (2011);

⁴ Valores calculados para tilápia do Nilo conforme Miranda et al. (2000).

Tabela 2 - Composição química e aminoácídica do hidrolisado proteico de fígado de aves (Falbom Agroindustrial Ltda - Faltech F1[®]).

Composição química do hidrolisado	
Matéria seca (g kg ⁻¹)	85,91
Proteína Bruta (g kg ⁻¹ da MS)	51,15
Extrato etéreo (g kg ⁻¹ da MS)	3,97
Cálcio total (g kg ⁻¹ da MS)	0,07
Fósforo disponível (g kg ⁻¹ da MS)	3,76
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4417,00
Composição aminoácídica	Totais (g/100g)
Ácido aspártico	5,37
Ácido glutâmico	7,66
Serina	2,86
Glicina	2,89
Histidina	1,45
Arginina	4,07
Treonina	3,04
Alanina	3,38
Prolina	2,63
Tirosina	2,15
Valina	3,25
Metionina	1,48
Cistina	0,47
Isoleucina	2,46
Leucina	4,67
Fenilalanina	2,54
Lisina	3,84
Triptofano	0,96

Desempenho produtivo

Ao final do período experimental os peixes foram contados e individualmente pesados para os seguintes cálculos de desempenho produtivo:

$$\text{Taxa de sobrevivência (TS)} = \frac{\text{Número final de peixes}}{\text{Número inicial de peixes}} \times 100;$$

$$\text{Ganho de peso (GP)} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial};$$

$$\text{Consumo de ração aparente (CRap)} = \text{Peso da ração inicial} - \text{Peso da ração final};$$

$$\text{Eficiência alimentar aparente (EAap)} = \frac{GP}{CRap};$$

Taxa de crescimento específico (TCE), utilizando a equação proposta por Ricker (1979):

$$TCE = \frac{\ln PF(g) - \ln PI(g)}{\text{Tempo (dias)}} \times 100,$$

em que PI = peso inicial médio dos peixes e PF = peso final médio dos peixes;

Eficiência de retenção proteica (ERP) utilizando as equações propostas por Jauncey & Ross (1982), apresentadas a seguir

$$ERP = \frac{(PBf \times PF) - (PBi \times PI)}{CP} \times 100$$

em que: PBf = proteína bruta da carcaça ao final do experimento (%); PBi = proteína bruta da carcaça no início do experimento (%); e CP = consumo de proteína (g);

$$\text{Rendimento de carcaça (RC)} = \frac{\text{Peso da carcaça}}{\text{Peso vivo}} \times 100;$$

$$\text{Índice hepatossomático (IHS)} = \frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso vivo}} \times 100;$$

$$\text{Biomassa final (BF)} = \Sigma \text{ peso final dos peixes.}$$

Variáveis metabólicas

Os teores de glicose, triglicerídeos e colesterol sanguíneos foram avaliados por meio de tiras reagentes em aparelho monitor digital Accutrend[®] Plus e Accu-Chek Active[®] (Roche, Brasil). Para a coleta do sangue, foi cortado, com bisturi o pedúnculo da nadadeira caudal de cinco peixes de cada unidade experimental (30 peixes/tratamento). O sangue foi depositado diretamente nas tiras reagentes.

Teor proteico da carcaça e composição química das rações

Para avaliar a composição química da carcaça dos peixes foi coletada uma amostra inicial de 30 peixes de cada bloco e ao final do experimento de todos os peixes de cada unidade experimental. Foi avaliado o teor da proteína bruta pelo método Detmann et al. (2012).

Teste de exposição ao Ar

Ao final do período de alimentação com as rações experimentais, cinco peixes, todos de uma repetição de cada tratamento foram submetidos ao teste de exposição ao ar segundo a metodologia de Pereira-da-Silva e Oliveira (2016), para avaliar o efeito do hidrolisado proteico sobre o status oxidativo nas brânquias e as respostas de estresse.

Os peixes foram expostos ao ar individualmente por cinco minutos sobre papel secante e então retornaram aos aquários por 30 minutos. Os peixes foram eutanasiados por excesso de anestésico (400mg/l) para a coleta de brânquias para a avaliação do status oxidativo e coleta de sangue para a avaliação das respostas de estresse.

Status Oxidativo

As análises de status oxidativo foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV. As análises foram realizadas nas brânquias dos peixes submetidos ao desafio por exposição ao ar. Para isso, utilizamos 200mg de brânquias de cinco peixes de uma unidade experimental (cinco/tratamento). Os tecidos foram mantidos em nitrogênio líquido no momento da coleta e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C.

Amostras de brânquias foram homogeneizadas com auxílio de um homogeneizador de tecidos em 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ e 1mmol L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 7,4, e centrifugados a 15000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Com o sobrenadante realizamos as análises da proteína total, das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST) e do produto da peroxidação lipídica, o

malondialdeído (MDA). Os péletes resultantes do homogenato foram utilizados para análise da proteína carbonilada. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 7,4) e a suspensão foi centrifugada (2000 g à 4 °C por 10 minutos).

A concentração das proteínas totais foi determinada conforme metodologia proposta por Bradford (1976), em leitor de ELISA à 595 nm, com a albumina soro bovina (BSA) como proteína padrão.

Para avaliar o teor de óxido nítrico, o nitrito foi usado como indicador da síntese de óxido nítrico. O nitrito é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1 % de sulfanilamida e 0,1 % naftil-etileno-diamina em 2.5 % H₃PO₄. O sobrenadante (50 µL) foi adicionado em microplacas com 100 µL do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida foi feita a leitura a $\lambda = 570\text{nm}$ (Griess, 1879) em ELISA. A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em µM.

O MDA, principal produto da peroxidação lipídica, foi mensurado de acordo com Buege e Aust (1978). A mistura da reação continha 0,2 mL de amostra e 0,4 mL de solução de TBARS composta por ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,375%), ácido clorídrico (0,6%) e HCL (0,25 N). A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em banho maria a 90°C por 40 minutos. Após cinco minutos no gelo foi adicionado 0,6 mL de álcool butílico à solução, homogeneizado em vórtex por dois minutos e centrifugado por 10 min, a 9.000 g, a 25 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de MDA, em leitor de ELISA, a 535 nm. A concentração de MDA foi determinada pela curva padrão de concentrações de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em µM/ mg de proteína - 1.

O conteúdo de proteína carbonilada foi medido utilizando o reagente 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), baseado nos grupos carbonil que reagem com DNPH (Levine et al., 1994). Os péletes foram precipitados em solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e a solução centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao precipitado 0,5mL de solução DNPH 10 mmol L⁻¹ diluído em ácido clorídrico (7%). A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante descartado e acrescentado 0,5 mL de TCA 10%. A solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 ml de acetato de etila e etanol (1:1 v/v). A cada lavagem, a solução foi homogeneizada, centrifugada e descartado o sobrenadante. Finalmente, foi adicionado 1mL de lauril sulfato de

sódio (SDS) 6%, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, à 15°C. Foi realizado um branco para cada amostra, em que foi adicionado 0,5 mL solução de ácido clorídrico 7% ao precipitado em substituição à solução de DNPH. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração da proteína carbonilada em leitor de ELISA à 370nm. Os resultados foram expressos em nmol mL⁻¹.

A atividade da SOD foi determinada baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do radical superóxido (O₂⁻) e assim diminuir a auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000) modificado. A mistura da reação continha 99 µL de tampão fosfato (5 mmol L⁻¹, pH 7,0), 6 µL de solução MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H] -2,5-difeniltetrazolium) (PM = 414,3) 1,25mM e 30 µL da amostra. Para iniciar a reação, foi adicionado 15 µL de pirogalol (100 µmol L⁻¹) e mantido incubado à 37 °C por cinco minutos. Após esse período foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (PM= 78,13). A auto-oxidação do pirogalol foi determinada em leitor de ELISA à 570 nm. A atividade da SOD foi expressa como unidade (U) por miligrama de proteína, em que uma U de SOD foi definida como a quantidade que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%. A atividade da SOD foi expressa em U SOD/ mg de proteína.

A atividade da CAT foi medida de acordo com Hadwan e Abed (2016) com modificações. Uma alíquota de amostra (5 µl) foi adicionada a 100 µl de substrato (65 mmol / ml de H₂O₂ em 60 mmol / l de tampão de fosfato de potássio e sódio, pH 7,4) ou em 100 µl de tampão (branco) e incubada a 37 °C. Depois de três minutos, a reação foi parada com a adição de 150 µl de molibdato e a leitura da absorbância foi realizada a 374 nm. Alterações na absorbância, em relação ao branco, foram registradas. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de H₂O₂ foi calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H₂O₂. A atividade da catalase foi expressa em U CAT/ mg de proteína.

Para GST, a atividade enzimática foi mensurada através da formação do conjugado glutationa- 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al. 1974). A mistura da reação continha 970 µL de tampão fosfato (5 mmol L⁻¹, pH 7,0), 10 µL de 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) 1mmol L⁻¹, 10 µL de glutationa reduzida (GSH) 1 mmol L⁻¹ e 10 µL da amostra. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto a amostra. A atividade da GST foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm, durante 90 s, com intervalo de 30 s. A atividade da GST foi definida pelo conjugado glutationa-2,4- dinitrobenzeno e expressa em µmol min⁻¹g.

Para mensurar os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foi mensurado de acordo com Jerusa et al (2018) com modificações. Nos poços destinados a curva foi feita uma diluição

seriada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e tampão fosfato (100 μ L), seguido de 150 μ L molibdato de amônia. Para o branco teste, 20 μ L de amostra foi pipetada na placa e adicionado tampão fosfato para completar 250 μ L de volume. Para realizar o teste 20 μ L do sobrenadante foi pipetado na placa, adicionando 150 μ L do molibdato e tampão fosfato para completar volume para 250 μ L. A leitura foi determinada em leitor ELISA a 374 nm. Para cálculos foi gerado uma regressão linear com as concentrações dos padrões, a partir dessa equação, foi calculado a concentração de H_2O_2 nas amostras testadas e o resultado foi expresso em mmol/L.

Respostas de estresse

Após 30 minutos da exposição ao ar, foram realizadas as análises de glicose e lactato sanguíneos foram realizadas por meio de tiras reagentes em aparelho monitor digital Accu-Chek Active[®] (Roche, Brasil). Para a coleta do sangue, foi realizado corte com bisturi junto ao pedúnculo da nadadeira caudal de cinco peixes de uma unidade experimental (cinco peixes/tratamento), para cada análise. O sangue foi depositado diretamente nas tiras reagentes.

Análise Estatística

A avaliação do efeito da suplementação de hidrolisado proteico de fígado de aves sobre as variáveis de desempenho produtivo, metabólicas, estresse oxidativo e respostas de estresse foi realizada por meio da análise de variância e em caso significativo, foi realizado análise de regressão polinomial. Para escolha do modelo de regressão foi considerado a significância dos coeficientes da regressão, a magnitude dos coeficientes de determinação e o comportamento da variável em estudo. O melhor nível de hidrolisado proteico obtido pela regressão polinomial foi comparado com uma dieta referência através do teste t de *Student*. Para todas as análises foi considerado nível de significância de 5% e realizadas por meio do pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2018) no software livre R (R Core Team, 2020).

RESULTADOS

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do hidrolisado proteico para as variáveis de desempenho produtivo, índices corporais (Tabela 3), variáveis metabólicas antes e depois do desafio (Tabela 4) e respostas de estresse após exposição ao ar (Tabela 5).

Após o desafio por exposição ao ar, o aumento da glicose sanguínea ($p > 0,05$) nos peixes alimentados com a ração basal, quando comparado com os peixes não submetidos ao desafio, mostrou que o método foi eficiente para provocar respostas de estresse nos peixes. Entretanto, não houve efeito do hidrolisado proteico nas respostas de estresse (glicose e lactato sanguíneos) (Tabela 4).

Para as variáveis de estresse oxidativo nas brânquias após exposição ao ar, houve efeito linear decrescente ($p < 0,05$) do hidrolisado proteico para proteína carbonilada (Tabela 5; Fig. 1), e quadrático ($p < 0,05$) para catalase (Tabela 5; Fig. 2) e superóxido dismutase (Tabela 5; Fig. 3). Com base nestes resultados, o nível de 4% de hidrolisado foi considerado o melhor e, portanto, este tratamento foi selecionado para ser comparado com os peixes que receberam a ração *premium*. Apesar da dieta 4% ter proporcionado maior taxa de sobrevivência, resultou em menor consumo de ração, crescimento (GP, TCE e BM), eficiência de utilização dos nutrientes (ERP), rendimento de carcaça e índice hepatossomático quando comparada com a ração *premium* (Tabela 6). Para as variáveis metabólicas (Tabela 7), respostas de estresse (Tabela 4) e variáveis do status oxidativo nas brânquias (Tabela 8) não observamos diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a ração 4 % de hidrolisado e a *premium*.

Tabela 3 - Desempenho produtivo e índices corporais de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves.

	Hidrolisado (%)				P-valor	CV (%)
	0	1	2	4		
Taxa de sobrevivência (%)	84,25	77,77	76,85	88,88	0,24	13,75
Peso final (g)	4,81	4,73	4,47	4,70	0,89	17,13
Ganho de peso (g)	3,27	3,20	2,87	3,16	0,84	25,97
Biomassa final (g)	74,58	66,99	61,38	75,77	0,45	24,89
Taxa de crescimento específico (%/dia)	2,80	2,78	2,65	2,78	0,91	14,73
Consumo de ração aparente (g)	4,05	4,12	3,37	4,01	0,40	21,67
Eficiência alimentar	0,80	0,78	0,85	0,79	0,73	13,94
Eficiência de retenção proteica	2,48	2,51	1,97	2,20	0,46	26,24
Rendimento de carcaça (%)	44,29	45,07	43,34	45,12	0,24	3,75
Índice hepatossomático (%)	1,23	1,34	1,31	1,35	0,64	12,57

CV - Coeficiente de variação experimental

Tabela 4 - Variáveis metabólicas sanguíneas de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves. Valores antes e depois do desafio.

	Hidrolisado (%)				P- valor	CV (%)
	0	1	2	4		
Após 45 dias de alimentação						
Glicose sanguínea (mg dL ⁻¹)	26,59	31,60	36,60	32,46	0,27	24,23
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	158,00	177,83	182,40	132,66	0,24	24,78
Colesterol (mg dL ⁻¹)	196,33	187,83	191,83	190,60	0,89	9,26
Após desafio de exposição ao ar						
Glicose sanguínea (mg dL ⁻¹)	62,40	55,40	79,00	59,00	0,11	24,20
Lactato sanguíneo (mg dL ⁻¹)	40,8	43,2	40,60	42,4	0,98	33,34

CV - Coeficiente de variação experimental

Tabela 5 - Valores médios das variáveis para status oxidativo nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de fígado de aves, após serem submetidos a exposição ao ar.

	Hidrolisado (%)				P-valor	CV (%)
	0	1	2	4		
H ₂ O ₂ (mmol/L)	430,00	326,59	446,47	513,63	0,240	29,78
NO (μM)	47,32	43,11	81,57	67,25	0,124	39,09
MDA (μM MDA mg ⁻¹ de tecido)	0,88	0,95	1,23	1,04	0,097	19,5
¹ PC (nmol mL ⁻¹)	5,14	3,84	3,87	1,93	0,004	30,73
² SOD (U SOD mg ⁻¹ de tecido)	1,93	1,92	2,74	2,37	0,006	31,23
³ CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	408,89	425,53	762,35	461,56	0,005	28,85
GST(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	1,31	1,42	1,95	1,20	0,096	32,2

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio; NO – Óxido nítrico; MDA – Malondealdeído; PC – Proteína carbonilada; SOD – Superóxido dismutase; CAT – Catalase; GST – Glutathione S-transferase;

CV - Coeficiente de variação experimental

$$^1 Y = -0,8411x + 5,2252, R^2 = 0,82$$

$$^2 Y = -0,3053x^2 + 1,5009x + 1,3375, R^2 = 0,68$$

$$^3 Y = -59,7930x^2 + 269,9288x + 356,1241, R^2 = 0,59$$

Figura 1 - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre o teor de proteína carbonilada (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar.

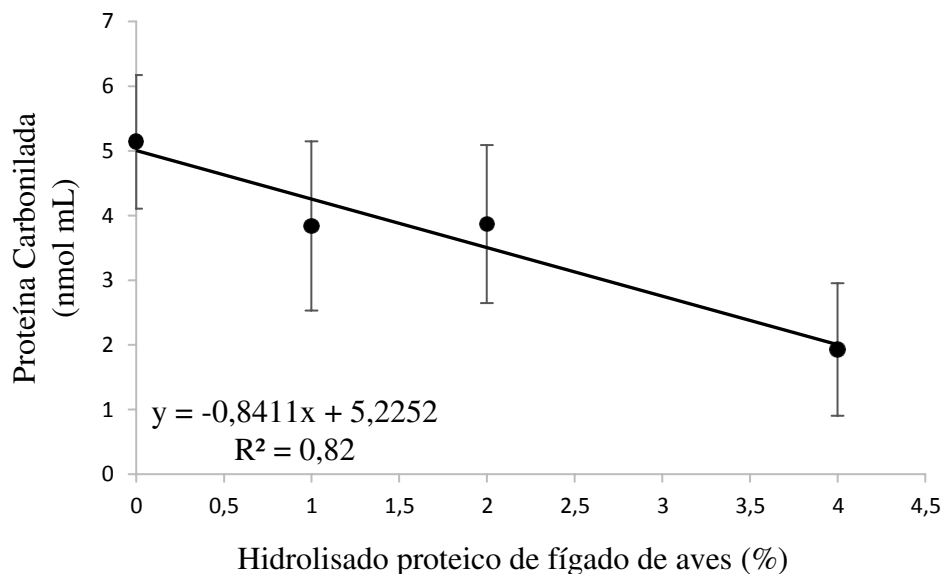


Figura 2 - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar.

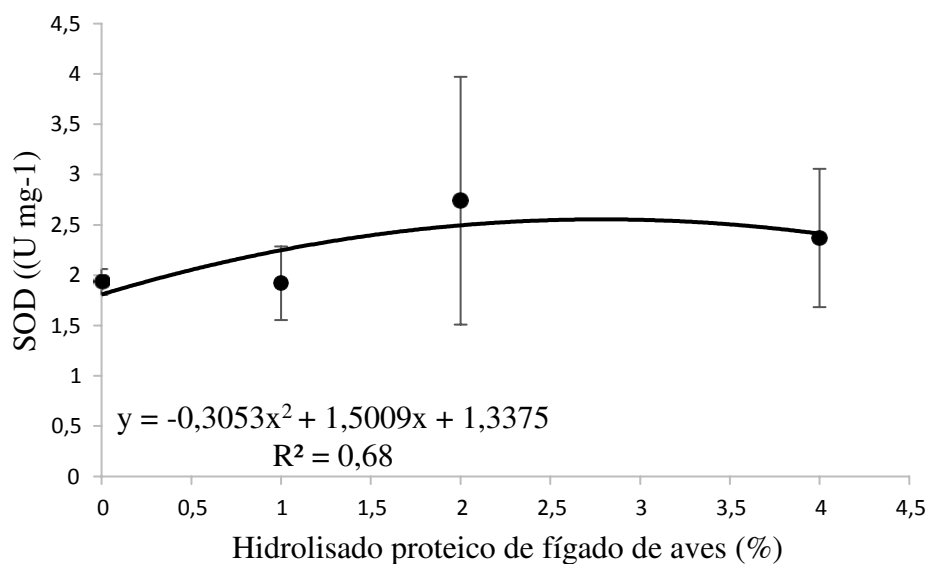


Figura 3 - Efeito do hidrolisado de fígado de aves sobre a atividade da enzima catalase (CAT) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Oreochromis niloticus*, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de hidrolisado, submetidos ao desafio de exposição ao ar.

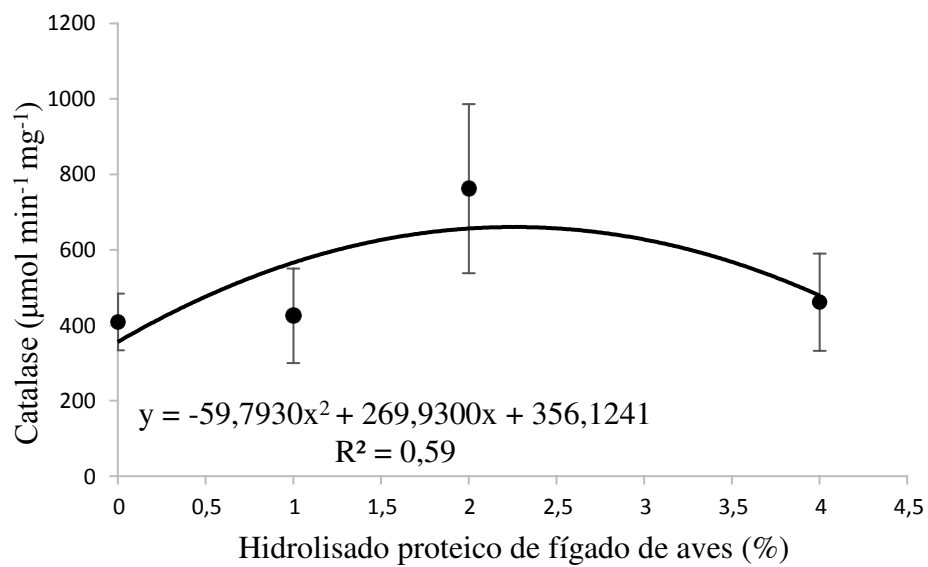


Tabela 6 - Desempenho produtivo e índices corporais de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves comparado a ração *premium*.

	<i>Premium</i>	Hidrolisado 4%	P-valor	CV (%)
Taxa de sobrevivência (%)	78,70	88,88	0,013	9,14
Peso final (g)	6,93	4,70	0,001	24,35
Ganho de peso (g)	5,39	3,16	0,001	33,09
Biomassa final (g)	98,17	75,77	0,030	21,61
Taxa de crescimento específico (%/dia)	3,75	2,78	0,005	20,60
Consumo de ração aparente (g)	6,77	4,01	0,000	31,47
Eficiência alimentar	0,79	0,79	0,894	11,15
Eficiência de retenção de proteína	4,25	2,20	0,000	37,05
Rendimento de carcaça (%)	47,80	45,12	0,005	3,96
Índice hepatossomático (%)	1,74	1,35	0,012	17,30

CV - coeficiente de variação experimental

Tabela 7 - Variáveis metabólicas sanguíneas de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves ou ração *premium*.

	<i>Premium</i>	Hidrolisado 4%	P- valor	CV (%)
Glicose (mg dL ⁻¹)	45,66	32,46	0,23	41,08
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	181,83	132,66	0,19	36,49
Colesterol (mg dL ⁻¹)	197,8	190,6	0,60	10,56

CV - coeficiente de variação experimental

Tabela 8- Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de juvenis de *Oreochromis niloticus* alimentados com dieta suplementada ao nível de 4% de hidrolisado proteico de fígado de aves, comparado a ração *premium*.

	<i>Premium</i>	Hidrolisado 4%	P valor	CV (%)
H ₂ O ₂ (mmol/L)	431,36	513,63	0,34	27,02
NO (μM)	68,75	67,25	0,54	36,54
MDA (μM MDA mg ⁻¹ de tecido)	1,04	1,04	0,98	17,35
PC (nmol mL ⁻¹)	3,34	1,93	0,08	52,26
SOD (U SOD mg ⁻¹ de tecido)	3,17	2,37	0,25	37,65
CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	595,56	461,56	0,33	38,21
GST (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	1,62	1,20	0,21	36,40

CV - coeficiente de variação experimental

DISCUSSÃO

Os resultados de consumo de ração mostraram que o hidrolisado de fígado de aves não apresentou efeito palatilizante para juvenis de tilápia. A maioria dos aditivos só apresenta efeitos positivos quando os peixes são submetidos a alguma condição subótima ou desafio ambiental (Nayak, 2010). Neste sentido, para expor os peixes a uma condição subótima, formulamos as dietas com ingredientes de origem vegetal com 27 % de glúten de milho, um ingrediente frequentemente utilizado em rações comerciais para peixes, de alto teor proteico, porém, deficiente no aminoácido lisina e com baixa palatabilidade para a tilápia, como demonstrado por Pereira e Pezzato (2000) e Hisano et al. (2003). Como os peixes são altamente sensíveis aos aminoácidos livres, via sistema olfativo e sistemas gustativo oral e extraoral (Kasumyan e Dovin, 2003; Shamushaki et al., 2008), era esperado que o hidrolisado proteico estimulasse o consumo de ração, como observado para *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Perca flavescens* e *Coregonus clupeaformis* (Aksness et al., 2006; Refstie et al., 2004; Kolkovski et al., 2000). Portanto, a ausência de efeito positivo no consumo de ração deve estar relacionada à composição de aminoácidos do hidrolisado utilizado, uma vez que as respostas aos aditivos palatilizantes são espécie-específicas (Fries et al, 201; Xu et al., 2016). Pelo fato do glúten de milho ser deficiente em lisina, foi necessária a suplementação de L-lisina sintética (>1,5%) para que as dietas fossem isoaminoacídicas. Como a lisina é um aminoácido com efeito adverso no consumo de ração para várias espécies de peixes (Kasumyan e Dovin, 2003), é possível que isto tenha neutralizado o efeito estimulatório do hidrolisado proteico.

O esperado efeito nutricional do hidrolisado, em função do alto teor de aminoácidos, não se confirmou para juvenis de tilápia, provavelmente pelo fato de todas as rações serem isoaminoacídicas para lisina e metionina, os dois aminoácidos mais limitantes do crescimento em peixes (Furuya, 2010). Por ser rico em sais biliares, o hidrolisado proteico de fígado de aves (Yang et al., 2014) poderia melhorar o desempenho produtivo dos peixes por aumentar a eficiência de utilização da gordura e da energia da ração. Em ratos alimentados com hidrolisado proteico de peixes foi observada redução no colesterol e triglicérides sanguíneos e da gordura visceral e hepática devido ao alto teor dos aminoácidos glicina e taurina (Liaset et al., 2009), que são essenciais para a conjugação dos sais biliares e, conseqüentemente para a emulsificação das gorduras do alimento (Randall et al., 2000). Entretanto, para tilápia não observamos efeitos do

hidrolisado no crescimento, na eficiência de utilização dos nutrientes, nos índices corporais e nas variáveis metabólicas glicose, triglicérides e colesterol sanguíneos, provavelmente devido à grande capacidade adaptativa da tilápia a diferentes tipos de alimentos, relacionadas ao hábito alimentar onívoro e à capacidade de modulação da morfologia intestinal, dos transportadores de aminoácidos e peptídeos na mucosa intestinal e da secreção de enzimas digestivas (German et al., 2004).

A exposição dos peixes ao ar desencadeou respostas de estresse, evidenciadas pelo aumento da glicose sanguínea. Entretanto, a suplementação com o hidrolisado não atenuou tais alterações, bem como o nível de lactato sanguíneo. Além das respostas de estresse, a exposição ao ar durante os manejos de classificação também pode causar desequilíbrio no status oxidativo, principalmente nas brânquias dos peixes, com danos em lipídeos de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (Welker et al., 2013; Lim e Hur, 2018). No presente estudo, a suplementação com hidrolisado proteico de fígado de aves influenciou a atividade da enzima antioxidante catalase, bem como promoveu a redução dos danos às proteínas celulares, marcado pelo menor teor de proteínas carboniladas. Dessa forma, apesar do hidrolisado proteico de fígado de aves não ter melhorado o desempenho produtivo, o mesmo prepara melhor os peixes para enfrentar situações de exposição ao ar. Com base nestes resultados, a ração com inclusão de 4% de hidrolisado foi considerada a melhor dieta formulada com ingredientes vegetais para ser comparada com a dieta *premium*, considerada como dieta referência, formulada com ingredientes proteicos de origem animal de alta qualidade.

Como a qualidade da proteína das dietas formuladas apenas com ingredientes de origem vegetal é pior que a da dieta *premium*, formulada com ingredientes proteicos de origem animal, já era esperado um pior desempenho produtivo dos peixes. Entretanto, a utilização do hidrolisado proteico como aditivo não reduziu essa diferença para a maior parte das variáveis de desempenho produtivo. Apesar da ração com 4% de hidrolisado ter proporcionado maior taxa de sobrevivência que a *premium*, o crescimento foi pior, e conseqüentemente a biomassa final e o rendimento de carcaça. Além disso, a eficiência de retenção de proteína também foi pior, apesar da eficiência alimentar ser igual. Devido à presença de peptídeos bioativos nos hidrolisados, era esperado que a utilização deste aditivo pudesse melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes, uma vez que apresentam atividade antimicrobiana e propriedade imunomoduladora (Kotzamanis et al., 2007; Tang et al., 2008; Bui et al., 2014; Robert et al., 2015).

Com relação à proteção contra os danos decorrentes da exposição ao ar, a ração com 4% de hidrolisado proporcionou menor glicemia e menor teor de proteínas carboniladas, porém ao nível significância de 9 e 8%, respectivamente, o que representa menor confiabilidade nestes resultados. Para as demais variáveis de respostas de estresse e estresse oxidativo não houve diferença significativa, o que mostra que a ração com 4% de hidrolisado é, no mínimo, equivalente a ração *premium*. Os hidrolisados de proteínas possuem propriedade antioxidante devido a atividade dos peptídeos (dependente da sequência de aminoácidos, do tamanho e da concentração de peptídeos bioativos), bem como os aminoácidos livres (Sarmadi e Ismail 2010). Peptídeos bioativos e aminoácidos livres como ácido aspártico, ácido glutâmico e da histidina (devido os grupos carboxilae amino nas cadeias laterais) e os aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) são capazes de neutralizar radicais livres, íons metálicos quelantes e inibir a peroxidação lipídica. (Saiga et al., 2003; Maikhunthod e Intarapichet, 2005). Além disso, o fígado de aves é rico em manganês e selênio, que são cofatores essenciais das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

Apesar do hidrolisado proteico de fígado de aves não ter apresentado efeito palatabilizante e promotor de crescimento para juvenis de tilápia do Nilo, em condições de desafio, o nível de inclusão de 4% protegeu os peixes contra danos oxidativos.

REFERÊNCIAS

- Abidi, S.F., Khan, M.A., 2007. Dietary leucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*. 38(5), 478-486.
- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B.T., Albrektsen, S., 2006. Size-fractionated 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.
- Bianchi, M.D.L.P., Antunes, L.M.G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*. 12(2), 123-130.
- Bolivar, R.B., Cruz, E.V., Jimenez, E.B.T., Sayco, R.M.V., Argueza, R.L.B., Ferket, P.R., Stark, C.R., Malheiros, R., Ayoola, A.A., Johnstone III, W.M., Picha, M. E., Holler, B.L., Won, E.T., Borski, R.J., 2010. Feeding reduction strategies and alternative feeds to reduce production costs of tilapia culture (Vol. 1, pp. 50-78). *Technical Reports: Investigations 2007-2009*. AquaFish Collaborative Research Support Program. Oregon State University.
- Booman, M., Forster, I., Vederas, J.C., Groman, D.B., Jones, S.R., 2018. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) but not in pink salmon (*O. gorbuscha*). *Aquaculture*. 483, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.025>.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(12), 248-254.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52, 302-310.
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K.J., 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*. 418, 11-16.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T., Kumarnsit, E., 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*. 19(5), 773-784.
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M., 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*. 111(4), 970-975.
- Deng, Y. P., Jiang, W. D., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S. Y., Tang, L., Zhou, X. Q., 2014. Differential growth performance, intestinal antioxidant status and relative expression of Nrf2 and its target genes in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with graded levels of leucine. *Aquaculture*, 434, 66-73.

- Detmann, E., Souza, M.D., Valadares Filho, S.D.C., De Queiroz, A.C., Berchielli, T.T., Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M., Azevedo, J. A.G. (2012). *Métodos para Análise de Alimentos*, Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214.
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J., 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. 101(1), 33-39.
- El- Saïdy, D.M., Gaber, M.M., 2002. Complete replacement of fish meal by soybean meal with dietary L- lysine supplementation for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(3), 297-306. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00506>.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A., 2018. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>
- Furlaneto, F.P.B., Ayroza, D., Ayroza, L., 2010. Análise econômica da produção de tilápia em tanques-rede, ciclo de verão, região do médio Paranapanema, Estado de São Paulo, 2009. *Informações Econômicas*. 40(4), 5-11.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B. T., Mamauag, R. E., 2013. Effect of dietary oxidized fish oil and vitamin C supplementation on growth performance and reduction of oxidative stress in Red Sea Bream *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*. 19(1), 35-44.
- Griess, P., 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt ueber eine Azoverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 12, 426-428.
- Habig, W.H., Pabst, M. J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 249, 7130-7139
- Hadwan, M.H., Abed, H.N., 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in brief*, 6, 194-199.
- 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.
- Hassaan, M.S., El-Sayed, A.I.M., Soltan, M.A., Iraqi, M.M., Goda, A.M., Davies, S.J., El Haroun, E.R., Ramadan, H.A., 2019. Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 503, 282-292. <https://doi.org/10.1016/j.-aquaculture.2019.01.009>
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S. B., Mehiri, M., Hajji, M., Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963-972.

- Kasumyan, A.O., Doving, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish and fisheries*. 4(4), 289-347
- Khan, M. A., 2014. Response of fingerling stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) to varying levels of dietary l- leucine in relation to growth, feed conversion, protein utilization, leucine retention and blood parameters. *Aquaculture Nutrition*. 20(3), 291-302.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2009a. Characteristics and use of yellow stripe trevally hydrolysate as culture media. *Journal of food science*. 74(6), S219-S225.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K.D., 2009b. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of food science*. 74(2), C126-C133.
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., Kentouri, M., 2015. Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 115-128
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, 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.
- Kousoulaki, K., Rønnestad, I., Olsen, H.J., Rathore, R., Campbell, P., Nordrum, S., Berge, R.K., Mjøs, S.A., Kalanathan, T., Albrektsen, S., 2013. Krill hydrolysate free amino acids responsible for feed intake stimulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*. 19, 47-61.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E. P., Shacter, E., 1994. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic Press.
- Lin, S., Luo, L., 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Animal Feed Science and Technology*. 168(1-2), 80-87.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.012>.
- Maikhunthod, B., Intarapichet, K.O. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat science*. 71(2), 364-374.
- Miranda, E.C., Pezzato, A.C., Pezzato, L.E., Furuya, W.M., 2000. Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, 22(3), 669-675.

- Oliveira, J.M., Losano, N.F., Condessa, S.S., de Freitas, R.M.P., Cardoso, S.A., Freitas, M.B., de Oliveira, L.L., 2018. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 148, 684-692.
- Paital, B., 2013. Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95, 69-77.
- Pereira- da- Silva, E.M., Oliveira, R.H.F. 2016. Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000) to air exposure. *Aquaculture Research*. 48(6), 3268-3271
- Popma, T., Masser, M., 1999. Tilapia, life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication. United States Department of Agriculture. n.283. 4p.
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Henry, J., 2015. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*. 50(3), 487-492
- Saiga, A.I., Tanabe, S., Nishimura, T., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(12), 3661-3667.
- Samaranayaka, A.G., Li-Chan, E.C., 201). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*. 3(4), 229-254.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31(10), 1949-1956.
- 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), 1-6.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Peptídeos bioativos. *Jornal de AOAC internacional*. 91 (4), 914-931.
- 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, T.C.D., Rocha, J.D., Moreira, P., Signor, A., Boscolo, W.R., 2017. Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 52(7), 485-492.

- 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.
- Wang, P., Zhu, J., Feng, J., He, J., Lou, Y. Zhou, Q., 2017. Effects of dietary soy protein concentrate meal on growth, immunity, enzyme activity and protein metabolism in relation Journal Pre-proof Journal Pre-proof to gene expression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture*. 477, 15-22.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.030>
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Chen, X., Liu, S., Li, P., 2018. Optimization of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) viscera. *PeerJ*, 6, e4373.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*. 244(1-4), 349-357.
- Zheng, Y., Qiu, L. P., Meng, S. L., Fan, L. M., Song, C., Li, D. D., Zheng, C., Chen, J. Z., 2016. Effect of polychlorinated biphenyls on oxidation stress in the liver of juvenile GIFT, (*Oreochromis niloticus*). *Genetics and Molecular Research*. 15(3), 106-120.<http://doi.org/10.4238/gmr.15038613>.

ANEXO

ANEXO 1: Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção (CEUAP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
 CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 07 de Out. de 2019

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Hidrolisado proteico como aditivo em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.**", protocolo nº 094/2019, sob a responsabilidade de **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi apreciado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **26 de Agosto de 2019**.

Finalidade: Pesquisa () Ensino

Vigência do Projeto: de **07 de Out. de 2019** a **28 de Fev. de 2020**

Espécie/linhagem: **Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)** Nº de animais: **600**

Peso: **1gr** Idade: **01 mês** Sexo: **Macho** Origem: **Piscicultura SOL NASCENTE Cnpj: 07.755.177/0001-47** Endereço: **Fazenda Vargem / Alegre, Zona Rural, s/n, Laje do Muriaé, RJ, CEP 28350-000. Responsável : Adilson Nogueira de Novaes**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Protein hydrolyzate as an additive in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus***", protocol nº 094/2019, under the responsibility of **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Aug, 26th, 2019**.

Finality: Research () Education

Duration of the Project: from **Oct. 07th, 2019** to **Feb, 28th, 2020**.

Species / strain: **Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)** Nº of animals: **600**

Weight: **1gr** Age: **01 month** Sex: **Male** Source: **Piscicultura SOL NASCENTE Cnpj: 07.755.177/0001-47** Endereço: **Fazenda Vargem / Alegre, Zona Rural, s/n, Laje do Muriaé, RJ, CEP 28350-000. Responsável : Adilson Nogueira de Novaes**

Luciana Navajas Rennó

Luciana Navajas Rennó

Coordenadora da CEUAP/UFV