

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeitos do uso de hidrolisado proteico de
resíduo de incubatório em dietas de tilápia-
do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o
desempenho zootécnico e imunológico**

Thayse Michielin

Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeitos do uso de hidrolisado proteico de resíduo de
incubatório em dietas de tilápia-do-Nilo
(*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho
zootécnico e imunológico não inato**

Thayse Michielin

Orientador: Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo
2022

M624e

Michielin, Thayse

Efeitos do uso de hidrolisado proteico de resíduo de incubatório em dietas de tilápia- do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho zootécnico e imunológico / Thayse Michielin. -- Jaboticabal, 2022

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

1. Hidrólise enzimática. 2. Incubatório de aves. 3. Sustentabilidade.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos do uso de hidrolisado proteico de resíduo de incubatório em dietas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

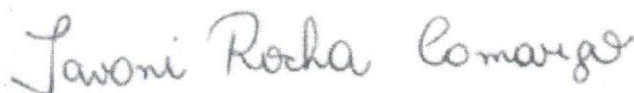
AUTORA: THAYSE MICHIELIN

ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Assoc. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP, Dracena-SP



Profa. Dra. TAVANI ROCHA CAMARGO (Participação Virtual)
Lab. de Bioeconomia e Inovação da Unesp / Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp



Prof. Dr. DIOGO LUIZ DE ALCANTARA LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Chapecó-SC

Jaboticabal, 07 de novembro de 2022

Dedicatória

A deus
pelo apoio em momentos difíceis

A Alain
Pelo companheirismo, paciência e amor incondicional

A Fátima
Minha mãe muito obrigada pelo apoio e amor, você é dos motivos para que eu
continuasse esta jornada

Dedico

Agradecimentos

A UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Centro de Aquicultura da Unesp, campus de Jaboticabal, pela estrutura para realização do experimento e execução de análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura por disponibilizar um corpo docente de alto nível, que esteve sempre à disposição para esclarecer dúvidas e colaborar com o experimento.

Ao meu orientador Leonardo Susumu Takahashi, por sua orientação e ensinamentos que levarei para vida, muito obrigado pela oportunidade.

A Tavani Rocha Camargo pela orientação e apoio em todo o processo de fabricação do hidrolisado, obrigada pela amizade e pelos conselhos durante essa jornada.

As minhas colegas de pós-graduação Thaise Mota Satiro, Gabriela Carli e Manuel considero vocês grandes amigos. Obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e por estarem ao meu lado em momentos importantes.

Aos técnicos Luiz, Valdecir, Marcio e Roberto por colaborarem em fases importantes de meu trabalho.

Ao incubatório de Nuporanga/SP em especial a Mariana Thimoteo, pelas informações e por colaborar na retirada do resíduo.

Ao André Gonçalves pela colaboração na elaboração deste trabalho e do hidrolisado.

Ao professor Wagner Cotroni Valenti e o laboratório de carcinicultura por terem disponibilizado os equipamentos necessários para a hidrolise.

A professora Fabiana Pilarski, Inacio, Elielma e o laboratório de patologia pelo fornecimento da bactéria inativa de *Streptococcus agalactiae*.

Aos colegas que participaram de coletas, biometrias e análises: Bruno, Marcio, Aurea, Karen, Eduardo, Raissa, Thais, Adriane, Afonso, Hugo, Hélio e Debora.

Ao grupo GAUD pela colaboração.

A CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento da bolsa de estudos.

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

Ao SEBRAE Catalisa ICT pela oportunidade de conhecer melhor meu trabalho, e desenvolver formas de inovação.

Apresentação do trabalho

Com o presente trabalho tivemos o objetivo de abordar o tema da reutilização de resíduo de incubatório de frango de corte. Ele é composto por ovos quebrados, pintainhos natimortos, cascas de ovos e pintainhos fora do padrão. Muitas vezes este subproduto é destinado para aterros sanitários, o descarte inadequado pode causar riscos como: contaminação de rios e nascentes, e consequentemente para a saúde humana.

Alguns meios já são utilizados para reutilizá-lo de forma segura como utilização para produção de biogás ou realização de compostagem. No entanto, pelo seu alto teor de proteína, ele também é considerado um potencial produto para alimentação animal que demanda de mais estudos para sua utilização.

Diante desta problemática, estudamos uma maneira de aproveitar os componentes proteicos deste resíduo por meio da hidrólise enzimática e observamos que a proteína contida no resíduo aumentava, o que poderia ser uma boa oportunidade de melhorar este produto, e utilizá-lo na nutrição de tilápia-do-Nilo. O resíduo de incubatório utilizado neste trabalho foi fornecido por um incubatório de frango de corte do interior de São Paulo que produzia cerca de 300 toneladas de resíduo por semana.

Quando iniciamos o trabalho sabíamos da sua importância para indústria e para o meio ambiente, porém não tínhamos certeza de que teria aderência no mercado. Entretanto, quando ele foi um dos contemplados pelo programa de aceleração a pesquisa de cunho empreendedor SEBRAE CATALISA ICT, começamos a acreditar em seu potencial comercial. Esperamos que este trabalho seja o início de um grande avanço na economia circular da produção de proteína animal e da sustentabilidade, pois este resíduo possui grande potencial.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THAYSE MICHIELIN – Nasceu em Caçador, Santa Catarina, no dia 01 de março de 1995. Filha de Fatima Aparecida de Castro e José Vitor Michielin. Estudou Zootecnia com ênfase em Produção sustentável na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) no Centro de Ensino Superior Oeste (CEO) em Chapecó, Santa Catarina. Durante a graduação realizou trabalhos em grupos de estudo, empresa júnior e no laboratório de aquicultura da UDESC Oeste. Em 01 de março de 2020, ingressou no curso de mestrado acadêmico em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, com bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Participou do programa CATALISA ICTS do SEBRAE no período de abril a junho de 2021.

“O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



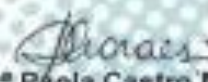
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Uso de proteína hidrolisada de resíduo de incubatório nas dietas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**", protocolo nº 0565/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, 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 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de maio de 2022.

Vigência do Projeto	18/03/2021 a 18/05/2022
Espécie / Linhagem	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	336
Peso / Idade	20g/ 60 dias
Sexo	Macho
Origem	Laboratório de Tilápicultura do Centro de Aquicultura da Unesp

Jaboticabal, 18 de maio de 2022.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora – CEUA

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
1. Considerações Gerais	12
1.1 Hidrolisado de proteína enzimática	15
1.2 Enzimas.....	16
1.2.1 Enzimas comerciais	17
1.2.2 Interação enzima e substrato	18
1.3 Grau de hidrolise	20
1.4 Resíduo de incubatório de aves	21
1.5 Sistema imune	23
1.5.1 Sistema imune inato.....	24
1.5.2 Sistema imune adaptativo	26
1.6 tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) x hidrolisado.....	27
2. Objetivos	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. Referências	31
RESUMO	47
4. Introdução	49
5. Materiais e métodos.....	50
5.1.0 Peixes e instalações experimentais.....	50
5.1.1 Produção do hidrolisado proteico de resíduo de incubatório.....	51
5.1.2 Dietas experimentais.....	53
5.1.3 Bactéria inativada (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	55
5.1.4 Amostragem	55
5.2 Análises	56
5.2.1 Desempenho Zootécnico.....	56
5.2.2 Indicadores de imunidade inata	57
5.3 Análises Estatísticas	58
6. Resultados	59
6.1 Desempenho de zootécnico.....	59
6.2 Indicadores de imunidade inata e volume corpuscular médio (VCM).....	59
6.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (Burst)	60
6.2.2 Ativação do Sistema Complemento.....	61
6.2.3 Atividade de lisozima.....	61
6.3 Volume corpuscular médio (VCM).....	62

7. Discussão.....	63
8. Conclusão	65
9. Referências	65
10. FIGURAS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da proteína hidrolisada de resíduo de incubatório	53
Tabela 2. Dietas experimentais e composição bromatológica.....	54
Tabela 3. Desempenho produtivo de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório	59
Tabela 4 Indicadores de imunidade inata e volume corpuscular médio (VCM) de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório	60
Tabela 5 Atividade respiratória de leucócitos (Burst) de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e inoculados com <i>Streptococcus agalactiae</i>	60
Tabela 6 Ativação do sistema complemento de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	61
Tabela 7 Atividade de de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e desafio com <i>Streptococcus agalactiae</i>	62
Tabela 8 Volume Corpuscular Médio (VCM) de diferentes níveis de inclusão de hidrolisado com interação antes e após o desafio.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Residuo de incubatório em natura, composto por cascas de ovos, ovos quebravos, pintinhos de descarte, e líquido viscoso de ovos. (MICHIELIN, 2021)

..... 72

Figura 2 Moagem do residuode incubatório, a moagem transformava o residuo em particulas menores, além de homogeniza-lo (MICHIELIN, 2021) 73

Figura 3 Sedimento de ovos do hidrolisado, o sedimento era cmposto por cascas de ovos penugem e bico, materiais que não sofreram hidrolise (MICHIELIN, 2021) 73

INTRODUÇÃO GERAL

1. Considerações Gerais

Ao final da década de 90, a diminuição considerável do estoque de peixes na natureza resultou na estagnação da pesca extrativista, tornando a aquicultura promissora (ERTÖR, 2015). Além disso, a urbanização e o aumento da renda da população mundial, impulsionaram o setor. As principais espécies que representaram 75% da aquicultura mundial em 2017 incluem algas marinhas, carpas, bivalves, tilápias e bagres. A tilápia representa 4% deste índice de produção (NAYLOR et al., 2021).

O cultivo da tilápia ocorre em 87 países, sendo os principais produtores, China, Indonésia, Egito e Brasil (FAO, 2020). No Brasil, a tilápia é o peixe mais produzido representando 63,5% da produção pesqueira em 2021, equivalente a mais de 534.005 toneladas de um total de 841.005 toneladas da produção pesqueira nacional (PEIXE BR, 2022). Desta forma, a produção de tilápia no Brasil se destaca, pois em 2021 a tilápia obteve 4,7% de crescimento (PEIXE BR, 2022), enquanto o crescimento na produção de aves foi de 3,5% e de suínos de 2,8% (ABPA, 2022).

Entretanto, a expansão da produção de tilápia está sendo prejudicada por várias doenças que causam alta mortalidade (ELLISON et al., 2018). O uso de antibióticos, desinfetantes e medicamentos quimioterápicos, aumentou nos últimos anos para proteger os animais de criação (ANJUR et al., 2021). A utilização de antibióticos na produção animal tem sido questionada, pois este medicamento pode acarretar riscos como: resistência bacteriana a antibióticos; impactos no ecossistema produtivo; desenvolvimento de superbactérias, além dos riscos à saúde do consumidor (BARNES et al., 2022).

Consequentemente, para reduzir a utilização de antibióticos foram desenvolvidas estratégias de prevenção as doenças (REVERTER et al., 2021). Os métodos de prevenção mais utilizados são: vacinas; imunoestimulantes e probióticos (YADAVA et al., 2021). As vacinas estão demonstrando eficácia a diversas doenças perigosas como: *Streptococcus agalactiae*, furunculose e columnariose (HAJAM et al., 2022). Todavia o método do uso de vacinas não é consagrado no Brasil, principalmente para columnariose, furunculose,

Streptococcus dysgalactiae subsp, e *Aeromonas* (BARONY et al.,2012). Além do mais, existem poucas vacinas no mercado mundial que previnem doenças de grande importância para aquicultura (ERKINHARJU et al., 2021). Deste modo a utilização de imunoestimulantes se tornou uma estratégia, pois eles ativam a imunidade inata do animal, fazendo com que o peixe se torne mais resistente a doenças, estresse e patógenos (JEYAVANI et al., 2022).

A principal dificuldade da utilização de imunoestimulantes em dietas está em encontrar suplementos acessíveis, economicamente viáveis, nutricionalmente equilibrados e prontos para uso (RASHIDIAN et al., 2021). Para suprir esta demanda, se tornou imprescindível explorar novos recursos, como resíduos e subprodutos (DAWOOD et al., 2022). Embora estes recursos possuam alguns empecilhos como fatores antinutricionais e baixa digestibilidade, várias metodologias estão sendo analisadas para utilização e melhoria nutricional dos resíduos e subprodutos (BEHERA, 2021).

Um dos métodos que pode atender esta questão, é a hidrólise porque diminui os fatores antinutricionais e libera peptídeos, fazendo com que o alimento se torne prontamente disponível para o animal (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2021). Os hidrolisados de proteínas possuem peptídeos que melhoram o sistema imunológico dos peixes e por este motivo podem ser usados como imunoestimulantes (RASHIDIAN et al., 2021). A técnica de hidrolisar produtos consiste em clivar as proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos livres (WARREN, 2021).

As principais vias utilizadas para a obtenção de hidrolisados são: química alcalina ou ácida; microbiana; e enzimática (ADLER-NISSEN, 1979). A hidrólise química compreende em quebrar as proteínas em meio alcalino ou ácido. Este procedimento é geralmente adotado em industriais para inativar componentes tóxicos dos alimentos ou acentuar sabores. Além disso esta hidrólise diminui consideravelmente o número de aminoácidos presentes no substrato hidrolisado (KINSELLA, 1977).

A hidrólise microbiana acontece com a utilização de microrganismos que quebram as proteínas por meio de fermentação, esta metodologia gera um número limitado de peptídeos, pois os microrganismos utilizam as proteínas presentes como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento (CASTELLANO et al., 2013). E, quando se trata da hidrólise enzimática,

utilizamos uma enzima proteolítica conhecida em condições controladas de pH, temperatura e tempo de reação enzimática, gerando muitos peptídeos (GUÉRARD et al., 2001). O número de ligações peptídicas formadas neste período é chamado de grau de hidrólise ou GH (HUI YAN et al., 2022).

A hidrólise enzimática tem demonstrado bons resultados quando se trata de resíduos da produção animal, pois este material hidrolisado libera peptídeos que muitas vezes atuam na imunomodulação e desempenho dos animais (NIMALARATNE et al., 2015; XING et al., 2018; RIMOLDI et al., 2020; ZHANG et al., 2021). Por estes motivos vem sendo utilizada na obtenção de alimento e aditivo para os animais na aquicultura e de estimação (PLASCENCIA et al., 2002; MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015; DOS SANTOS CARDOSO et al., 2021). Em peixes, o uso de hidrolisado de resíduos avícolas apresentou bons resultados no desempenho e alguns fatores imunológicos (LORENZ, 2018; CARDOSO, 2021), porém poucos trabalhos discutem o uso do resíduo de incubatório de aves na nutrição de peixes.

O resíduo de incubatório é um descarte da avicultura constituído por ovos quebrados, ovos inférteis, pintinhos natimortos e pintinhos de descarte. Encontra-se trabalhos de resíduo de incubatório na alimentação de aves e suínos (MORAES et al., 2008), frango de corte (SHAHRIAR et al., 2008), bagre africano (AYOOLA, 2011) e codornas (ODUNSI et al., 2013). Estes trabalhos relatam bons resultados em índices como: digestibilidade, palatabilidade e hepatoprotetores. Quando substituem a farinha de peixe (AYOOLA, 2011, ODUNSI et al., 2013) ou são incluídos em dietas (MORAES et al., 2008, SHAHRIAR et al., 2008).

Um incubatório produz cerca de 77.000 toneladas de resíduo por semana (KOBASHIGAWA et al., 2008). Com o crescente avanço da avicultura esse número só tende a crescer. Segundo dados do IBGE (2022), no ano de 2021 foram produzidos 756,975 milhões de dúzias ovos para incubação. Dessa forma, a utilização do resíduo de incubatório na nutrição de peixes se justifica por ser uma fonte abundante de matéria-prima que poderá suprir a demanda do mercado e atender as necessidades de escala da indústria. O uso desse resíduo poderá garantir um destino economicamente viável e sustentável, além de promover a economia circular. Assim o hidrolisado de resíduo de incubatório (HRI) pode ser uma fonte de peptídeos e aminoácidos para tilápias.

1.1 Hidrolisado de proteína enzimática

As proteínas são macromoléculas geralmente compostas por vinte aminoácidos diferentes (AAs) ligados por ligações peptídicas (FERRIER et al., 2018). A proteína é considerada um componente importante para os tecidos animais como: músculo esquelético, fígado, intestino delgado e glândulas mamárias, e para alguns produtos de origem animal, por exemplo: ovos, leite e carne (HOFFMAN et al., 2004). O teor de proteína no músculo esquelético de suínos, aves e peixes em crescimento é de aproximadamente 70% (HOU et al., 2017).

A ingestão adequada de proteína dietética é essencial para bons índices de crescimento, desempenho produtivo e eficiência alimentar de animais de produção (HOU et al., 2017). Quando o conteúdo proteico dos alimentos é consumido ele sofre processo de digestão e as proteínas são hidrolisadas em pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Os quais são absorvidos pelo trato intestinal e distribuídos pelo sangue para todos os órgãos e tecidos (FRACALOSSO, 2016).

É possível sintetizar peptídeos e os oferecer prontamente disponíveis nas dietas, para que isso ocorra as proteínas devem passar por hidrólise *in vitro* (SILVESTRE et al, 2013). O processo de hidrólise consiste na clivagem da proteína liberando os peptídeos e aminoácidos livres, melhorando assim a digestibilidade e absorção dos mesmos (NEKLYUDOV et al., 2000). As quebras por hidrólise liberam 2 a 20 aminoácidos, este processo pode não liberar aminoácidos essenciais, porém causa outras atividades, disponibilizando um alto número de peptídeos de diferentes tamanhos e funcionalidades, podendo constituir um potencial aditivo alimentar (GARCÍA-MORENO et al., 2014; PASUPULETI E BRAUN, 2010).

Desta forma, os hidrolisados proteicos têm sido utilizados com sucesso na indústria farmacêutica e de nutrição animal, pois possuem propriedades funcionais (SILVESTRE, 1997). A hidrólise enzimática é considerada um método eficaz para a obtenção destes peptídeos, porque conserva o valor nutricional e

funcional das proteínas presentes no substrato, e não resulta na formação de compostos tóxicos no hidrolisado (DE HOLANDA et al., 2004; TAVANO, 2013). Na hidrólise enzimática há controle de fatores externos e internos como: pH, temperatura e o tempo e isso faz com que ocorra maior padronização do processo (GUÉRARD et al., 2001). Todavia, a proteólise enzimática leva à produção de variados hidrolisados proteicos, com diferentes perfis peptídicos, sendo resultado da relação enzima/substrato (GUÉRARD et al., 2002).

A hidrolise enzimática a partir de resíduos de proteína animal está se tornando uma fonte promissora de compostos bioativos (SOCACI et al., 2017). Incrementos na taxa de crescimento foram observados em trabalhos que utilizaram proteína de pescado hidrolisada enzimaticamente na nutrição de peixes carnívoros (HO et al., 2014; CHOTIKACHINDA et al., 2013). Resultados em parâmetros imunológicos e hematológicos também se destacaram (TUKMECHI & BANDBONI, 2014; SIDDIK et al., 2018; KHOSRAVI et al., 2015). Portanto, hidrolisados enzimáticos podem ser uma solução economicamente viável e sustentável para o aproveitamento de resíduos de outras agroindústrias.

1.2 Enzimas

As transformações e quebra de proteínas utilizando enzimas proteolíticas específicas é amplamente adotada pela indústria de alimentos e farmacêutica (LUNELLI, 2015). A metodologia de adicionar enzimas para hidrolisar as proteínas dos alimentos é reconhecida por melhorar ou modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais das proteínas do substrato (SCHMIDT, 2009). A utilização de enzimas também não altera valor nutritivo e melhora a digestibilidade da proteína (CAMPESTRINI, 2005). Portanto, as enzimas mais utilizadas são hidrolases, como; carboidrases, proteases e lípases (MENDES, 2011). No entanto estudos comprovam que as proteases produzem hidrolisados estáveis com maiores números de peptídeos e compostos bioativos (VAN DER VEN et al., 2002; UDENIGWE et al., 2012; HOWARD & UDENIGWE, 2013).

As enzimas proteases geralmente utilizadas atuam em meios ácidos ou alcalinos (SHARMA, 2019). Frequentemente são utilizadas enzimas comerciais sendo elas: alcalase, proteases alcalinas, papaína, pepsina, pancreatina e flavorzyme, cada uma com seu pH e temperatura ideais (REN et al., 2008;

WISUTHIPHAET, 2015). Na maioria das vezes é preciso ajustar a condição da matéria prima para a enzima proteolítica. Essencialmente, é necessário acertar o pH com o uso de uma base ou ácido e a temperatura para otimizar a atividade enzimática (MURPHY et al., 2018). Portanto, enzimas que atuam em meios básicos e ácidos possuem vantagens e desvantagens (OGEDA & PETRI, 2010). Em meio básico comumente a solubilidade proteica é maior (CHALAMAIAH et al., 2012). No entanto em alguns casos, pHs alcalinos aumentaram a transformação dos aminoácidos, o que pode ocasionar alteração na propriedade funcional da proteína, prejudicando a absorção da mesma pelo organismo (CHEN et al., 2021). Todavia em pHs ácidos ocorre menor crescimento microbiano, maior rendimento, além do menor custo, porém hidrólises ácidas podem destruir alguns aminoácidos (BATISTA, 2011). Outro ponto crítico é a palatabilidade, pois foram relatados que a utilização de enzimas ácidas aumentaram o amargor do hidrolisado (CAETANO, 2012). Hidrólises ácidas possuem o sabor amargo devido a presença de aminoácidos hidrofóbicos, sendo estes: isoleucina, valina, histidina, fenilalanina, tirosina, arginina, metionina e leucina (BOUGATEF et al., 2008). Deste modo, para uma hidrólise de qualidade precisa-se conhecer a enzima utilizada, pois ela que irá determinar os peptídeos liberados e a qualidade nutricional do produto.

1.2.1 Enzimas comerciais

Alcalase

A produção da enzima alcalase ocorre com a fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis* (WOICIECHOWSKI et al., 2013). A enzima foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes. Sua atividade ótima acontece em pH 8,0 e temperatura de 50 °C (JUNG et al., 2006; SILVA, 2014).

Flavourzyme

A enzima proteolítica Flavourzyme possui origem fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* (SLIZYTE et al., 2005). Sua atuação ocorre em pH 7,0 e temperatura de 50 °C (JUNG et al., 2006; SILVA, 2014).

Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica geralmente utilizada para processar alimentos, um exemplo é como amaciante de carnes. Esta enzima é oriunda da extração do látex do mamão verde (*Carica papaya*) (ISLAM, 2013). Atuação ótima da enzima ocorre em pH de 5 a 7, e temperatura de 58 a 62°C (BEKHIT et al., 2014).

Pepsina

A pepsina é uma das enzimas mais antigas utilizadas para se obter peptídeos. Oriunda do sistema digestivo de animais trabalha em pH baixo (FRUTON, 2002). O pH baixo dessa enzima gera sabor amargo no produto e que pode afetar a palatabilidade. Sua temperatura ideal é de 45 °C e pH de 2,5 a 3,0 (SHEIH et al., 2009).

Protease Neutras

As proteases neutras comerciais utilizadas são Protamex e Alkaline protease, enzimas de preparação bacteriana do *Bacillus* sp. Comumente utilizadas na indústria de alimentos para melhorar as propriedades funcionais, nutricionais e flavorizantes da proteína. Tendo como condição ótima de atividade o pH 8,0 a 8,4 (JE et al., 2007) e a temperatura 40 a 55 °C (JUNG et al., 2006).

1.2.2 Interação enzima e substrato

As enzimas são catalisadores importantes pois se ligam ao substrato no sítio ativo da ligação peptídica, sendo orientada pela proximidade dos grupos catalíticos, com isso desempenham as reações formadoras do complexo enzima substrato, clivando as proteínas e liberando peptídeos e aminoácidos (FRIED & BOXER, 2017).

A enzima e substrato escolhidos bem com a concentração de cada um são fatores significativos, pois influenciam nas reações cinéticas e recuperação do produto (ZHAO et al., 2017). A natureza da enzima é responsável pelas frações peptídicas de diferentes pesos moleculares, de modo que as características funcionais também são influenciadas (KARAMI & AKBARI-ADERGANI, 2019).

Entretanto, as propriedades do substrato, como: desnaturação, conservação, origem e perecibilidade, são fatores determinantes na taxa de conversão enzimática. Desta forma, a proteína utilizada para a hidrólise, assim como a escolha da enzima e o grau de hidrólise obtido, devem ser controlados em função das principais propriedades funcionais que se deseja explorar (ADLER-NISSEN, 1979). A interação enzima/substrato irá determinar as características principais do produto, resultando em hidrolisados proteicos diferenciados que exercem um papel predominante (ALVES et al., 2015). Pode-se observar essa diferenciação em parâmetros positivos, em que a enzima e substrato agirão formando um hidrolisado eficiente em fatores de: alimentação, crescimento, atividade antioxidante, sobrevivência e melhoria no sistema imune.

Resultados de crescimento e palatabilidade foram obtidos no hidrolisado que utilizou a enzima alcalase com uma proporção de enzima e substrato de 5mL de alcalase para um quilograma de vísceras de atum (*Katsuwonus pelamis*), e 16mL para um quilograma de resíduo de vísceras de atum em dietas para o robalo asiático (*Lates calcarifer*) (CHOTIKACHINDA et al., 2013). A mesma enzima com incorporação de 26 mL para um quilograma de resíduo de pescada apresentou resultados semelhantes, em dietas para o Salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792) (HO et al., 2014). Os resultados obtidos podem demonstrar que os peptídeos e aminoácidos liberados na hidrólise são os responsáveis por essas funções, ligadas ao crescimento e palatabilidade (NIU et al., 2014; HEVRØY et al., 2005; OVISSIPOUR et al., 2014).

No entanto, a enzima Flavourzyme com diferentes substratos de pescado na alimentação de juvenis de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), e linguado (*Scophthalmus maximus* L.) resultou no hidrolisado que trouxe respostas positivas em: eficiência alimentar e atividade de enzimas do sistema antioxidante (ZHENG et al., 2012; ZHENG et al., 2013). Outras enzimas alcalinas como: Papaina com cabeça e vísceras de salmão foi responsável por formar um hidrolisado que atuou na palatabilidade de rações fornecidas ao camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) (GRAY et al., 2009). Com a enzima Protamex e cabeça de atum formou um hidrolisado responsável pela sobrevivência e palatabilidade em dietas de camarão (*Penaeus vannamei*) (NGUYEN et al., 2012). As enzimas

proteases alcalinas com resíduos de pescado têm mostrado comportamentos semelhantes, quando se trata de atrato-palatabilidade em dietas para peixes e crustáceos (GOOSEN et al., 2014; NIU et al., 2014; REFSTIE et al., 2004).

As enzimas pepsina e proteases ácidas, com resíduo de pescado, tiveram como produto hidrolisados responsáveis pelo crescimento de peixes carnívoros como linguado do pacífico (*Hippoglossus hippoglossus* L) e robalo japonês, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828) (KVÅLE et al., 2002; LIANG et al., 2006). No entanto, os resultados positivos de sobrevivência só ocorreram quando foram utilizados níveis baixos de hidrolisados nas dietas.

Proteínas hidrolisadas oriundas de substrato de pescado são mais utilizadas na aquicultura por possuírem ótimas características funcionais e nutricionais, podendo ser utilizados como substitutos da farinha de peixe ou imunoestimulantes (UCZAY, 2017; LORENZ, 2018). Por outro lado, resíduos de animais de produção terrestres como aves, suínos e gado são raramente utilizados em hidrolisados para aquicultura. Este resultado pode estar ligado às limitações impostas para impedir a transmissão de doenças priônicas através do consumo de peixes cultivados e crustáceos (MARTÍNEZ-ALVAREZ, CHAMORROe BRENES, 2015). Apesar disso, a expectativa é que a utilização de proteínas de animais terrestres cresça na aquicultura, especialmente com o aumento da concorrência e dos preços da farinha de peixe e a necessidade cada vez maior de alimentos funcionais.

1.3 Grau de hidrolise

O grau de hidrolise (GH) é fundamental para caracterizar o hidrolisado produzido. Com ele é estimado a porcentagem de quebra das ligações peptídicas das proteínas da matéria prima (BULHÕES, 2013). O que determina o grau de hidrolise são as condições usadas no processo, por exemplo: matéria-prima, concentração da enzima, tempo de hidrolise, condições físico-químicas, pH e temperatura (NOMAN et al., 2018). Quando o grau de hidrólise do produto e enzima usada são conhecidos, a probabilidade de sucesso do hidrolisado aumenta (ZAVAREZE et al., 2009). A mensuração do GH pode ser realizada por diferentes metodologias como: ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS); pH stat; ácido ortoftalaldeído (OPA); e tricloroacético (TCA) (NIELSEN, PETERSEN & DAMBMANN, 2001; RUTHERFURD, 2010).

A metodologia do TNBS consiste em uma reação que converte aminoácidos N-terminais livres em trinitrofenil-aminoácido derivados, que são depois determinados usando a absorvância (RUTHERFURD, 2010). A técnica do pH stat compreende em mesurar a quantidade de base necessária para que a reação estabilize (JACOBSEN et al., 1957). Com isso temos uma relação do número de ligações de peptídicas do hidrolisados, com base no cálculo:

$$DH = B \cdot NB / (Mpa \cdot a \cdot htot) \cdot 100$$

Onde: B é o consumo de base; NB é a normalidade da base; Mp é a quantidade da proteína; htot é o número de ligações de peptídeo na proteína, considerado o grau médio de dissociação dos grupos α -amino. (RUTHERFURD, 2010).

O método OPA consiste na reação do ortoftalaldeído com grupos amino-livres na presença de beta-mercaptoetanol. Com isso, ocorre a formação de cor que é detectável em espectrofotômetro (SCHUSTER, 1988). E o TCA é uma metodologia, em que se utiliza o ácido tricloroacético reagindo com o hidrolisado, ele expressa a porcentagem de proteínas solúveis em TCA comparadas à quantidade de proteína inicial total determinada por micro Kjeldahl ou espectrofotômetro (HOYLE & MERRITT, 1994). Determinar o GH é de suma importância, para evitar problemas nas dietas dos peixes como: baixa estabilidade de peletes e variação no valor proteico das dietas (KRISTINSSON & RASCO, 2000).

1.4 Resíduo de incubatório de aves

As indústrias produtoras de frango e ovos em todo o mundo geram uma grande quantidade de subprodutos, desde o incubatório até o processamento (GLATZ et al., 2011). Estes resíduos e subprodutos podem trazer riscos à saúde, pois acarretam poluição do ar, da água e da terra, o descarte inadequado além de causar doenças, leva a riscos ambientais (PRABAKARAN et al., 2021). Muitas vezes os resíduos são utilizados em rações na forma de farinhas, como fertilizantes ou alimentos para animais de estimação ou são totalmente descartados (FREEMAN et al., 2008).

O consumo de produtos avícolas vem crescendo, com isso a produção deve aumentar. A China e o Brasil são os maiores produtores de frango do mundo (NANDA et al., 2022). Em 2021, o Brasil produziu 4,3 milhões de toneladas de carne de frango e 54 milhões de ovos (ABPA, 2022). O resíduo de

incubatório de aves (RIA) é um subproduto oriundo de incubatórios para produção de frangos de corte ou para galinhas produtoras de ovos comerciais (poedeiras) (SHAHRIAR, 2008). Ele é constituído por cascas vazias e quebradas, ovos inférteis, pintainhos mortos, pintainhos fora do padrão, embriões mortos, líquido viscoso dos ovos e em casos de poedeiras pintainhos machos (REZAYIPOOR et al., 2022). No 4º trimestre de 2021, foram produzidas no Brasil 977,6 milhões de dúzias de ovos comerciais e 195.876 dúzias de ovos para a incubação (IBGE, 2022). A quantidade média de resíduos de incubação estima-se serem 77.000 toneladas de resíduo por semana (KOBASHIGAWA et al., 2008).

O RIA é uma fonte rica em proteínas, cinzas, cálcio, fibras e gorduras. Os resíduos de incubação são resíduos de alta proteína com 43-71% de umidade (VANDEPOPULIERE et al., 1977; HAMM & WHITEHEAD, 1982). O RIA pode conter 33,1% de proteína bruta, 29,0% de extrato etéreo, 12,1% de fibra bruta, 21,5% de cinzas e 28,8 MJ/kg de energia bruta (SHARARA et al., 1992). A energia metabolizável aparente (EMA) para aves da farinha de RIA é de 23,9 MJ/kg e a disponibilidade aparente de aminoácidos de 73,5% (SHARARA et al., 1992). Todavia, o RIA têm potencial de ser recuperado e utilizado em diferentes indústrias, o que ajuda a diminuir o volume de resíduo no ambiente (SUNG et al., 2020).

O Regulamento da Comissão das Comunidades Europeias (CE) nº 1096/2009 determina que resíduos de animais que são constituídos por corpo inteiro de um animal, partes do corpo ou produtos derivados de animais não podem ser destinados ao consumo humano (COMISSÃO EUROPEIA, 2009). No Brasil, segundo a NBR 10.004, o RIA é classificado como classe II-A não inertes (ABNT, 2004), o que significa que estes precisam de um descarte e tratamento adequado. Desta forma o RIA é promissor para ser utilizado em rações destinadas para animais de produção e pets (MORAES et al., 2008). Alguns métodos de processamento do RIA fazem com seus componentes biológicos sejam transformados em produtos de valor agregado. Estes processamentos são: compostagem, farinha para rações ou biogás oriunda de biodigestores (KOBASHIGAWA et al., 2008). Não foram encontradas pesquisas que trabalhassem com RIA como matéria prima para hidrolisados, somente há trabalhos com farinhas de RIA para aves, suínos, cordeiros e bagre africano

(MEHDIPOUR et al., 2009; AYOOLA, 2011; ABIOLA et al., 2012; SUNG et al., 2019; REZAYIPOOR et al., 2022).

Entretanto, a sustentabilidade das agroindústrias, incluindo incubatórios, está em risco (GLATZ et al., 2011). Por este motivo, é de grande importância trabalhos que desenvolvam métodos para utilização e descarte eficaz de resíduos, pois com o crescimento populacional, as agroindústrias precisam crescer para atender as demandas, aumentando o volume de resíduos gerados (MIOTTI, 2016). Por outro lado, os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) também devem ser atendidas até 2030. O que aumenta a pressão do mercado por alimentos sustentáveis. A reutilização de resíduos acata as seguintes ODS: ODS 6 (água potável e saneamento), ODS 12 (consumo e produção sustentável) e ODS 14 (vida na água) (SILVA, 2018). O objetivo deste trabalho é desenvolver um método eficaz para utilização do RIA como proteína hidrolisada para nutrição de tilápias-do-Nilo.

1.5 Sistema imune

O sistema imunológico e as respostas imunes são uma ferramenta fundamental para evolução e sobrevivência dos seres vivos (ZAPATA et al., 2006). Do ponto de vista evolutivo, os peixes são o primeiro grupo de vertebrados mais bem sucedido, diversificado e com alta capacidade de adaptação (KIRON, 2012). Este sucesso só ocorreu pois os peixes foram a primeira classe de vertebrados com imunidade inata e adaptativa (RAUTA et al., 2012). Os mamíferos possuem medula óssea e linfonodos, órgãos responsáveis pelo sistema imune, já os peixes possuem: timo, rim e baço, como principais órgãos linfoides (não-mucosos), brânquias e pele (WANG et al., 2017).

O primeiro órgão a se tornar linfoide dos peixes de água doce é o timo (CHANTANACHOOKHIN et al., 1991). O timo é o órgão responsável pelas manifestações de mudanças fisiológicas, estresse, além de ser extremamente sensível a agentes tóxicos (PEARSE, 2006). Todavia, o rim principal (cefálico ou rim cranial) é considerado a medula óssea dos peixes, sendo assim o responsável pela formação de várias células, como: macrófagos, monócitos e granulócitos (MESEGUER et al., 1995).

Por sua vez, o baço, dividido em duas porções polpa branca e vermelha, é o órgão responsável por iniciar as reações imunes contra os antígenos

(HÖHNE et al., 2021). Sendo que, a polpa branca é um agente ligado a formação das células de defesa, essa polpa é pouco desenvolvida e possui acúmulo de melano-macrófagos e elipsoides. E a polpa vermelha é a responsável pela fagocitose de células anormais e velhas (FÄNGE & NILSSON, 1985).

Brânquias e pele, tecidos linfoides relacionados a mucosas, produzem muco que é responsável pela barreira inicial contra invasores (GUARDIOLA et al., 2014). Além do mais, este muco é rico em proteínas importantes, como a lisozima e as proteínas do sistema complemento (TORT et al., 2003). O sistema de defesa inato e adaptativo dos peixes é crucial para resistência a doenças.

1.5.1 Sistema inume inato

A imunidade inata é conhecida como natural ou não específica, além de estar presente em todos os organismos multicelulares, é considerada a primeira linha de defesa, composta por barreiras químicas, físicas, celulares e moleculares (ABBAS, 2012). Portanto, afirma-se que o sistema inato é composto por um conjunto de mecanismos que protege o organismo contra infecções, independentemente de uma previa exposição específica ao microrganismo (MURPHY, 2014). Sendo assim, uma resposta imune inespecífica, apesar de não conhecer a origem da infecção, desencadeia mecanismos de defesa, sem que ocorra aprimoramento (AFFONSO, 2006).

Em peixes ósseos as barreiras físicas são: escamas e pele, e barreiras químicas: muco e proteínas antimicrobianas, como: lisozima, peptídeos antimicrobianos, lectinas, e proteínas do sistema complemento, estas barreiras são as responsáveis por impossibilitar o acesso livre de agentes patogênicos (URIBE et al., 2011). Portanto, a lisozima é um componente solúvel originário de monócitos, macrófagos, eosinófilos do intestino e neutrófilos rins. A lisozima cumpre a tarefa de lisar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além da manutenção da homeostase da microbiota comensal (SOUZA, 2021). No entanto, peptídeos com atividade antimicrobiana ainda não tem seus mecanismos de ação determinados especificamente (SMITH et al., 2000).

Já, as lectinas são proteínas ou glicoproteínas que agem como mediadores imunológicos (ELUMALAI, 2019). E as proteínas do sistema complemento são constituídas por um conjunto de proteínas solúveis do plasma, atuando em processos biológicos fagocitários, opsonização, quimiotaxia de

leucócitos e por interromper a ativação das toxinas bacterianas. O sistema complemento é conhecido como um dos principais mediadores no processo inflamatório, a ativação dele ocorre por duas vias; clássica e alternativa (MORGAN, 2000). A ativação da via clássica ocorre quando, os agregados de imunoglobulina e complexos antígeno-anticorpo as ativam, quando se trata da ativação da via alternativa o sistema precisa da presença de microrganismos como: fungos, bactérias, vírus ou helmintos, e isso faz com que aconteça a produção das proteínas solúveis em plasma (BOACKLE, 2001).

No entanto, quando os microrganismos ultrapassam as barreiras químicas e físicas, e invadem o organismo, encontram as células como macrófagos, mastócitos e células dendríticas (BERGAMINI, 2019). Elas possuem Receptores de Padrões (PRR) que atuam reconhecendo os Padrões Moleculares aos Patógenos (PAMPs). Os PAMPs são estruturas presentes em microrganismos como: LPS em bactérias Gram-negativa, RNA fita simples em vírus e Flagelina. Estas estruturas não sofrem mutações além de serem vitais para os microrganismos (SOUZA et al., 2021). Deste modo os PRR conseguem reconhecer uma extensa variedade de patógenos, e com isso desencadear sinalizadores intracelulares (BANDEIRA, 2011). Induzindo a liberação de citocinas proteínas que designam funções para as células que as secretam (ação autócrina) e/ou às células vizinhas (ação parácrina) e/ou às células adjacentes (ação justácrina) e/ou às células, tecidos ou órgãos distantes (ação endócrina) - e quimosinas que trabalham no recrutamento de células que possuem receptores para essas proteínas. Estas células são monócitos, neutrófilos, basófilos, natural killers, entre outras (KAUR & SECORD, 2019).

Os constituintes celulares do sistema imune inato são formados por células chamados fagócitos, são elas: granulócitos, macrófagos e eosinófilos diretamente ligados a fagocitose, o sistema também é constituído por células *natural killers* (SILVA, 2014). Os granulócitos têm a função de atingir o foco da inflamação e destruir os patógenos, os macrófagos fagocitam os detritos celulares e células patogênicas (HAN et al., 2019).

No entanto as células *naturais killers* lisam células infectadas ou estranhas, quando infectadas por vírus produzem imunorreguladores de citocinas (ZHANG et al., 2006). Os fagócitos têm a capacidade de realizar “burst” oxidativo ou explosão respiratória, este mecanismo tem a ação de defesa contra

infecção. O mecanismo ocorre com a ação da enzima superóxido (SOD), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substrato de enzima mieloperoxidase (MPO) liberada por leucócitos granulares, constituindo hipoclorito para produção de cloramina (DI et al., 2013). Contudo, tais radicais são os responsáveis pela destruição de microrganismos.

1.5.2 Sistema imune adaptativo

O sistema imune adaptativo é uma inovação chave associada à origem dos vertebrados (SCHLUTER et al., 1999). Sabe-se, que o reconhecimento e memória de patógenos trouxe vantagens seletivas ao longo de 500 milhões de anos de evolução (FLAJNIK & KASAHARA, 2009). O sistema imune adaptativo é composto por uma rede complexa de células, genes e mecanismos de sinalização celular com a função de responder especificamente a antígenos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Os principais componentes específicos do sistema imune adaptativo, são: os linfócitos T e os linfócitos B2 (MURPHY, 2014).

As células T são consideradas a peça principal para a imunidade adaptativa celular. Elas amadurecem no timo e são diferenciadas em células efectoras como: linfócitos T citotóxicos (CTLs) e linfócitos T auxiliares (Th) (NAKANISHI et al., 2015). As células B são produzidas no rim anterior dos peixes teleósteos, estes linfócitos B se diferenciam em células plasmáticas e produzem anticorpos (MA et al., 2013). Os anticorpos são imunoglobulinas (Igs) em forma solúvel e receptores de células B ligados a membrana.

Na invasão de microrganismos ocorre um aumento de anticorpos específicos na circulação sanguínea e assim se forma uma memória imunológica, porém, para que exista uma imunidade específica o organismo precisa de uma previa infecção pelo patógeno (CAPOLUNGHI et al., 2013). A imunidade específica possui reações limitadas, e suas respostas são lentas podendo demorar semanas após a infecção para ativá-la. Existem duas formas de se realizar as respostas imunes adaptativas, são elas: humoral e celular (TORT et al., 2003).

Nas respostas celulares são ativados os linfócitos T antígeno-específicos que reagem diretamente contra um antígeno estranho, que está presente na superfície da célula hospedeira. As células T são responsáveis por

matar as células hospedeiras, podendo impedir a replicação de vírus (WANG, et al., 2017). No entanto a resposta humoral está diretamente ligada aos anticorpos. Estes anticorpos ligam-se a agentes invasores, marcando-os para que sejam fagocitados. As células B se multiplicam, formando linfócito B ativado, que são responsáveis pela produção e liberação de anticorpos na corrente sanguínea (ELLIS, 1999).

1.6 tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) x hidrolisado

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é pertencente à família dos ciclídeos e originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África (ALVES et al., 2015). Seu hábito alimentar é herbívoro-onívoro, pois se alimenta de algas e materiais vegetais, além de pequenos animais e zooplanktons. A tilápia adapta seu hábito alimentar pelo alimento disponível no meio, também por sua fase de desenvolvimento (LEVINA, et al., 2021). Portanto, nas fases iniciais (larvas-juvenis) a tilápia possui maiores exigências nutricionais, do que na fase adulta (TESFAYE et al., 2020). Contudo, a tilápia tem ótima adaptação a rações, desde o período larval até a terminação, além disso possui: rápido crescimento, facilidade de manejo, adaptabilidade em ambientes tropicais e subtropicais (VICENTE et al., 2014). A nível mundial a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de água doce mais produzida, sendo a responsável pelo crescimento da aquicultura no Brasil e no mundo (FAO, 2018).

No entanto, a intensificação da produção de tilápia fez com que o setor se tornasse mais dependente de rações, o que exige maior conhecimento das exigências nutricionais (BOSCOLO et al., 2002). Todavia, as rações de tilápias são elaboradas com grande variedade de alimentos, o que exige a consideração de processamento do alimento e seus valores nutricionais. Além do mais, deve-se atentar à presença de fatores antinutricionais, pois podem influenciar no consumo e na saúde dos peixes (FURUYA, 2010). Os peixes possuem exigência nutricional em aminoácidos essenciais e não-essenciais presentes na estrutura da proteína. Estes aminoácidos são utilizados na deposição de proteína muscular e outras corporais, além de inúmeras funções fisiológicas (FURUYA, 2010).

Apesar disso, utiliza-se uma estimativa de exigência de proteína para suprir as necessidades de aminoácidos do animal. Segundo as tabelas

nutricionais de tilápias (FURUYA, 2010), a proteína bruta para fases iniciais (larvas em reversão) deve ser 41,3% e proteína digestível 38,6% (HAYASHI et al., 2002). Já após reversão até 100 g, a exigência por proteína bruta é de 29,7% e de proteína digestível de 26,8% (FURUYA et al., 1996). Em fases maiores de 100 g, a exigência em proteína bruta é de 26,8% e de digestível de 24,3% (BOMFIM et al., 2008). Para suprir esta exigência proteica em rações para a tilápia devem ser utilizados alimentos altamente palatáveis, digestíveis e ricos em proteínas, sendo o alimento tradicionalmente mais utilizado a farinha de peixe.

Entretanto, a farinha de peixe possui disponibilidade limitada e alto custo devido à sobrepesca e à crescente demanda (YANG et al., 2022). Estes fatores podem afetar diretamente a tilapicultura, por este motivo pesquisas vem procurando saídas para melhorar a qualidade das rações e seu custo, dentro destes se destaca a utilização de subprodutos (NASRI et al., 2017).

Por outro lado, o processamento industrial de animais terrestres de produção gera quantidades significativas de resíduos e subprodutos como: vísceras, carne, gordura, pele, pés, ovos, conteúdo líquido de ovos, conteúdo abdominal e intestinal, ossos, penas e sangue. Quando não há utilização destes produtos ocorre a perda de receita e aumento de descarte (HAMILTON, 2004). Os subprodutos animais são ricos em proteínas, aminoácidos e peptídeos, além disso o reaproveitamento pode ser o caminho para sustentabilidade e economia circular. Pois a utilização de resíduos e subprodutos geram valor econômico, e diminuem significativamente o descarte (RAMIREZ et al., 2021).

Aproximadamente 49% do peso vivo dos bovinos, 44% dos suínos, 37% dos frangos de corte, não podem ser destinados para o consumo humano e são tratados como resíduos (HICKS & VERBEEK, 2016). Por isto, tecnologias foram desenvolvidas para o reaproveitamento destes resíduos animais, alguns deles são: compostagem, biogás, farinhas e hidrolise (SHEETS et al., 2015). No entanto, a hidrolise vem demonstrando resultados animadores, pois além de transformar subprodutos em ótimos substitutos da farinha de peixe, também faz com que eles possam ser utilizados como alimentos dietéticos que colaboram com o sistema imune dos peixes.

Observou-se que hidrolisados tem atuado no sistema imune, equilíbrio da microbiota intestinal além de possuir boa palatabilidade e qualidade de peptídeos quando adicionados em dietas de dourada (*Pagrus major*) (KHOSRAVI et al., 2015; BUI et al., 2014). Os trabalhos científicos têm empregado o uso do hidrolisado como aditivo em dietas de inúmeras espécies de peixes inclusive da tilápia-do-Nilo (CHEN et al., 2019; SILVA et al., 2017; LORENZ et al., 2018). A utilização de hidrolisados na nutrição de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é algo promissor, pois ela possui boa adaptação na ingestão de diferentes alimentos proteicos (KONNERT et al., 2022).

Hidrolisados de muco suíno com 78,43% PB, fígado suíno com 59,8% PB e proteína de frango com 78,82% PB, adicionados em dietas de tilápias-do-Nilo apresentaram boa palatabilidade, se destacando o hidrolisado de muco suíno pois ele possui maiores índices de aminoácidos e proteínas (DOS SANTOS et al., 2021). Os hidrolisados possuem elevados teores de proteína bruta, por isso mesmo quando adicionados em níveis baixos em dietas para a tilápia-do-Nilo já demonstram resultados positivos. Foram adicionados 0,6% de hidrolisado de subprodutos de frango e suíno e os resultados observados foram melhoria de desempenho e redução de estresse, em fases iniciais de tilápia-do-Nilo (PERON et al., 2020). A utilização de hidrolisado nas fases finais de tilápia-do-nilo também pode resultar em modificação na morfometria do intestino e alterações no metabolismo energético (LUCZINSKI et al., 2019).

Ainda existem poucos trabalhos retratando o uso do hidrolisado de subprodutos de origem de animais terrestres no sistema imune e desempenho produtivo de tilápias-do-Nilo. Dessa forma, abre-se uma perspectiva para novas pesquisas a fim de verificar a eficácia e o potencial uso dos hidrolisados obtidos de subprodutos de animais terrestres de produção.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da inclusão do uso resíduo de incubatório na dieta de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da inclusão de proteína hidrolisada de resíduo de incubatório no desempenho produtivo e eficiência após a inoculação de bactéria inativada de *S. agalactiae* no sistema imune não específico da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3. Referências

- ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012.
- ABIOLA, S. S. et al. Whole hatchery waste meal as alternative protein and calcium sources in broiler diets. **Archivos de zootecnia**, v.61, n.234, p.229-234, 2012.
- ABPA. **Produção e exportações da Avicultura e da Suinocultura em 2021**. 2022. Disponível em: <https://abpa-br.org/producao-e-exportacoes-da-avicultura-e-da-suinocultura-em-2021/>. Acesso em: 01/03/2022.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.
- AFFONSO, S.F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes et al. **Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo**. 2015.
- ALVES, Gisele Kirchner et al. **Uso de papaína e bromelina para obtenção de hidrolisados proteicos de fígado suíno**. 2015.
- ANJUR, Norashikin et al. An update on the ornamental fish industry in Malaysia: Aeromonas hydrophila-associated disease and its treatment control. **Veterinary World**, v.14, n.5, p.1143, 2021
- ASPEVIK, Tone et al. Valorization of proteins from co-and by-products from the fish and meat industry. **Chemistry and chemical technologies in waste valorization**, p.123-150, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **resíduos sólidos – classificação**: Normas Brasileiras para resíduos. 2 ed. Rio de Janeiro: Abnt, 2004.

AYOOLA, Simeon O. Haematological characteristics of *Clarias gariepinus* (Buchell, 1822) Juveniles fed with poultry hatchery waste. **Iranica Journal of Energy and Environment**, v.2, n.1, p.18-23, 2011

BARNES, Andrew C. et al. Autogenous vaccination in aquaculture: A locally enabled solution towards reduction of the global antimicrobial resistance problem. **Reviews in Aquaculture**, v.14, n.2, p.907-918, 2022.

BARONY, Gustavo Moraes; FIGUEIREDO, Henrique César Pereira; LEAL, Carlos Augusto Gomes. 2. Columnariose em peixes de água doce. **PROJETO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA**, v. 43, n. 2, p. 19, 2012.

BATISTA, I. Hidrolisado proteico de pescado. **A. A. Gonçalves (ed.). Tecnologia do pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**, São Paulo, 2011.

BEHERA, Bijay Kumar. Nutritional Biotechnology to Augment Aquaculture Production. In: **Advances in Fisheries Biotechnology**. Springer, Singapore, p.231-243. 2021.

BEKHIT, Alaa A. et al. Exogenous proteases for meat tenderization. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.54, n.8, p.1012-1031, 2014.

BERGAMINI, Mariana Lobo. **Análise da concentração de células dendríticas, linfócitos T reguladores e mastócitos em lesões periapicais crônicas**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BOACKLE, Robert. The complement system. **Medical Immunology**, p.135, 2001.

BORSKI, Russell J. et al. Fishmeal-free diets improve the cost effectiveness of culturing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) in ponds under an alternate day feeding strategy. In: **Proceedings of the Ninth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Aquaculture and Fisheries Collaborative Research Support Program**. p.111-118, 2011.

BOSCOLO, Wilson Rogério; HAYASHI, Carmino; MEURER, Fábio. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.539-545, 2002.

BOUGATEF A.; NEDJAR-ARROUME, N.; RAVALLEC-PLE, R.; LEROY, Y.; GUILLOCHON, D.; BARKIA, A.; NASRI, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food Chemistry**, v.111, p.350-356, 2008.

BUI, Hien Thi Dieu et al. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. **Aquaculture**, v.418, p.11-16, 2014.

BULHÕES, Cátia Folhas. **Produção e caracterização de hidrolisados proteicos de pescado (HPP) a partir de subprodutos de cavala (Scomber colias)**. Tese de Doutorado, 2013.

CAETANO, Flávia de Faria. **Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção produtos proteicos e derivados**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CAMPESTRINI, Evandro; SILVA, VTM Da; APPELT, Matias Djalma. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.

CAPOLUNGI, Federica et al. Why do we need IgM memory B cells?. **Immunology letters**, v.152, n.2, p.114-120, 2013.

CASHION, Tim et al. Most fish destined for fishmeal production are food-grade fish. **Fish and Fisheries**, v.18, n.5, p.837-844, 2017.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, v.135, n.4, p.3020-3038, 2012.

CHANTANACHOOKHIN, Chaithuth; SEIKAI, Tadahisa; TANAKA, Masaru. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. **Aquaculture**, v.99, n.1-2, p.143-155, 1991.

CHEN, Xian-Quan et al. Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.90, p.30-39, 2019.

CHEN, Xing et al. Protein deamidation to produce processable ingredients and engineered colloids for emerging food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.20, n.4, p.3788-3817, 2021.

CHOTIKACHINDA, R. et al. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Atlantic seabass (*Lateolabrax niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v.19, n.5, p.773-784, 2013.

CHOTIKACHINDA, R. et al. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Atlantic seabass (*Lateolabrax niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v.19, n.5, p.773-784, 2013.

CLEMENTE, Alfonso. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, n.7, p.254-262, 2000.

COTTRELL, Richard S. et al. The search for blue transitions in aquaculture-dominant countries. **Fish and Fisheries**, v.22, n.5, p.1006-1023, 2021.

CUESTA, Alberto; ESTEBAN, María Ángeles. Pathologies in farmed tilapia and the use of immunostimulants and vaccines to prevent or treat diseases: An overview. **Biology and Aquaculture of Tilapia**, p.119, 2021.

CYRINO, José Eurico Possebon et al. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68-87, 2010.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Fruit processing by-products in the aquafeed industry: A feasible strategy for aquaculture sustainability. **Reviews in Aquaculture**, 2022

DE HOLANDA, Helenice Duarte de et al. **Hidrolise enzimatica do residuo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos**. 2004.

DE OLIVEIRA FILHO, Josemar Gonçalves; EGEA, Mariana Buranelo. Sunflower seed byproduct and its fractions for food application: An attempt to improve the sustainability of the oil process. **Journal of Food Science**, v.86, n.5, p.1497-1510, 2021

DI, Guilan; ZHANG, Zhaoxia; KE, Caihuan. Phagocytosis and respiratory burst activity of haemocytes from the ivory snail, *Babylonia areolata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.35, n.2, p.366-374, 2013.

DOS SANTOS CARDOSO, Marjana et al. Digestibilidade aparente de hidrolisados protéicos de resíduos de abate de frangos e suínos para tilápia do Nilo. **Aquaculture**, v.530, p.735720, 2021.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.9, n.4, p.291-308, 1999.

ELLISON, Amy R. et al. Transcriptomic response to parasite infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) depends on rearing density. **BMC genomics**, v.19, n.1, p.1-12, 2018.

ELUMALAI, Preetham et al. The role of lectins in finfish: a review. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v.27, n.2, p.152-169, 2019.

ERKINHARJU, Toni et al. cleaner fish in aquaculture: Review on diseases and vaccination. **Reviews in Aquaculture**, v.13, n.1, p.189-237, 2021.

ERTÖR, Irmak; ORTEGA-CERDÀ, Miquel. Political lessons from early warnings: Marine finfish aquaculture conflicts in Europe. **Marine Policy**, v.51, p.202-210, 2015.

ETEMADIAN, Yasaman et al. Desenvolvimento de hidrolisado de proteína de origem animal / vegetal e sua aplicação nas indústrias de alimentos, rações e nutracêuticos: Estado da arte. **Journal of Cleaner Production**, v.278, p.123219, 2021.

FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada-7**. Artmed Editora, 2018.

FÄNGE, R.; NILSSON, S. The fish spleen: structure and function. **Experientia**, v.41, n.2, p.152-158, 1985.

FLAJNIK, Martin F.; KASAHARA, Masanori. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews Genetics**, v.11, n.1, p.47-59, 2010.

Food and Agriculture Organisation (FAO), 2018. State of world fisheries and aquaculture 2018 – meeting the sustainable development goals. **FAO**, Rome, Italy, 210 pp. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf> Acesso em 18/01/2022.

Food and Agriculture Organisation (FAO), 2020. State of world fisheries and aquaculture 2020 – meeting the sustainable development goals. **FAO**. The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action. Rome Italy. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/ca9229en> ≥ Acesso em:20/02/2022.

FRACALOSS, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; GOMINHO-ROSA, M. C. Carboidratos e Fibras.In: FRACALOSS, D. M.; CYRINO, J. E. P (Org.). Nutriaqua: **nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 2ª ed.ampliada. Florianópolis, p.68-69., 2016.

FRAGA-CORRAL, María et al. Aquaculture as a circular bio-economy model with Galicia as a study case: How to transform waste into revalorized by-products. Trends in **Food Science & Technology**, v.119, p.23-35, 2022.

FREEMAN, Sharon Rowe et al. **Utilization of poultry byproducts as protein sources in ruminant diets**. 2008.

FRIED, Stephen D.; BOXER, Steven G. Electric fields and enzyme catalysis. **Annual review of biochemistry**, v.86, p.387, 2017.

FRUTON, Joseph S. A history of pepsin and related enzymes. **The Quarterly Review of Biology**, v.77, n.2, p.127-147, 2002.

FURUYA, Wilson Massamitu et al. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. 2010.

GAO, Ruichang et al. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

García-Moreno PJ, Batista I, Pires C, Bandarra NM, Espejo-Carpio FJ, Guadix A, Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Food Res**, 2014.

GHASSEM, Masomeh, See Siau Fern, Mamot Said, Zainon Mohd Ali, Saadiah Ibrahim, and Abdul Salam Babji. Kinetic characterization of Channa striatus muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, n.3, 2014.

GLATZ, Phil; MIAO, Zhihong; RODDA, Belinda. Handling and treatment of poultry hatchery waste: A review. **Sustainability**, v.3, n.1, p.216-237, 2011.

GOOSEN, Neill Jurgens; DE WET, Lourens Francois; GÖRGENS, Johann Ferdinand. The effects of protein hydrolysates on the immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v.428, p.243-248, 2014.

GREY, Michael et al. Validation of a feeding stimulant bioassay using fish hydrolysates for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, n.4, p.547-555, 2009.

GUARDIOLA, Francisco A. et al. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.40, n.1, p.24-31, 2014.

GUÉRARD, Fabienne et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.1051-1059, 2001.

GUÉRARD, Fabienne; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v.19, p.489-498, 2002.

HAJAM, Younis Ahmad et al. Efficacy of different treatments available against bacterial pathogens in fish. In: **Bacterial Fish Diseases**. Academic Press, 2022. p.379-398

HAMM, D.; WHITEHEAD, W. K. Holding techniques for hatchery wastes. **Poultry Science**, v.61, n.6, p.1025-1028, 1982

HAN, Hwa I. et al. The role of macrophages during acute kidney injury: destruction and repair. **Pediatric Nephrology**, v.34, n.4, p.561-569, 2019.

HAO, Yao-Tong et al. Effects of enzymatic hydrolysates from poultry by-products (EHPB) as an alternative source of fish meal on growth performance, hepatic proteome and gut microbiota of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture Nutrition**, v.26, n.6, p.1994-2006, 2020.

HASSAN, Md, R. P. Deepitha, K. A. Xavier, Subodh Gupta, Binaya Bhusan Nayak, and Amjad Khansaheb Balange. Evaluation of the properties of spray dried visceral protein hydrolysate from *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1978) extracted by enzymatic and chemical methods. **Waste and Biomass Valorization** 10, n.9, 2019.

HE, S., Franco, C. and Zhang, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v.50, n.1, p.289-297, 2013.

HEMKER, Ashutosh Kumar et al. Effects of pressure-assisted enzymatic hydrolysis on functional and bioactive properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product protein hydrolysates. **LWT**, v.122, p.109003, 2020.

HEVRØY, E. M. et al. Lysine intake affects gene expression of anabolic hormones in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **General and Comparative Endocrinology**, v.152, n.1, p.39-46, 2007.

HICKS, T. M.; VERBEEK, C. J. R. **Meat industry protein by-products**: sources and characteristics. In: Protein byproducts. Academic Press, 2016. p.37-61.

HIMAYA, S. W. A. et al. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. **Food Chemistry**, v.132, n.4, p.1872-1882, 2012.

HO, Thomas CW et al. Pacific hake (*Merluccius productus* Ayres, 1855) hydrolysates as feed attractants for juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792). **Aquaculture Research**, v.45, n.7, p.1140-1152, 2014.

HO, Thomas CW et al. Pescada do Pacífico (*Merluccius productus* Ayres, 1855) hidrolisada como atrativo alimentar para juvenis de salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792). **Pesquisa em Aquicultura**, v.45, n.7, p.1140-1152, 2014.

HOFFMAN, Jay R.; FALVO, Michael J. Protein – which is the best. **Journal of Sports Science & Medicine**, v.3, n.3, p.118, 2004

HÖHNE, Christin et al. The immune system of sturgeons and paddlefish (*Acipenseriformes*): a review with new data from a chromosome-scale sturgeon genome. **Reviews in Aquaculture**, v.13, n.3, p.1709-1729, 2021.

HONG, Hui et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. **Food Chemistry**, v.301, p.125222, 2019.

HOSEINIFAR, Seyed Hossein et al. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, p.2429, 2018.

HOU, Yongqing et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8, n.1, p.1-13, 2017

HOU, Yongqing et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8, n.1, p.1-13, 2017.

HOWARD, Ashton; UDENIGWE, Chibuike C. Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. **Food & Function**, v.4, n.1, p.40-51, 2013

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** Produção da Pecuária Municipal de 2017 ISSN- 0101-4234 Brasil 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIAS E ESTATÍSTICAS - **IBGE**. Disponível em:< <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/915> > Acesso em 10/03/2022

ISLAM, Mir N.; MOLINAR-TORIBIO, Eunice M. Development of a meat tenderizer based on papaya peel. **J Revistade ID Techno (RIDTEC)**, v.9, n.2, p.24-29, 2013.

JACOBSEN, Cecil Felix et al. The pH-stat and its use in biochemistry. **Methods of Biochemical Analysis**, v.4, p.171-210, 1957.

JAMIL, N. H., N. R. A. Halim, and N. M. Sarbon. "Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus* sp.) protein using response surface methodology (RSM). **International Food Research Journal**, v.23, n.1, 2016.

JE, J.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.42, p.840-846, 2007.

JEYAVANI, Jeyaraj et al. Phytotherapy and combined nanoformulations as a promising disease management in aquaculture: A review. **Aquaculture International**, p.1-16, 2022.

JUNG, W.; KARAWITA, R.; HEO, S.; LEE, B.; KIMA, S.; JEON, Y. Recovery of a novel ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.41, p.2097-2100, 2006.

KARAMI, Zohreh; AKBARI-ADERGANI, Behrouz. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v.56, n.2, p.535-547, 2019.

KHOSRAVI, Sanaz et al. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.2, p.858-868, 2015.

KIM, Jong Hyuk et al. Determination of metabolizable energy and amino acid digestibility in various hatchery byproducts for broiler chickens. **Poultry Science**, v.101, n.1, p.101544, 2022.

KINSELLA, J.E. Functional in novel proteins. Some methods for improvement. **Chemistry**, London, v.5, n.3, p.177-182, 1977.

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, n.1-2, p.111-133, 2012.

KOBASHIGAWA, Estela; MURAROLLI, Rafael Azevedo; GAMEIRO, Augusto Hauber. **Destino de resíduos de incubatórios da avicultura no estado de São Paulo**: adequação à legislação e possibilidade de uso econômico. 2008.

KRISTINSSON, Hordur G.; RASCO, Barbara A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.1, p.43-81, 2000.

KVÅLE, A. et al. Effect of predigested protein on growth and survival of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture research**, v.33, n.5, p.311-321, 2002.

LEVINA, Aleksandra D.; MIKHAILOVA, Elena S.; KASUMYAN, Alexander O. Taste preferences and feeding behaviour in the facultative herbivorous fish, Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v.98, n.5, p.1385-1400, 2021.

LI, Songlin et al. Effects of fishmeal replacement with composite mixture of shrimp hydrolysate and plant proteins on growth performance, feed utilization, and target of rapamycin pathway in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture**, v.533, p.736185, 2021.

LIANG, Mengqing et al. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). **Aquaculture Research**, v.37, n.1, p.102-106, 2006.

LORENZ, Evandro Kleber et al. Performance, hematology and immunology of *Salminus brasiliensis* fed diets containing swine liver hydrolysate. **Aquaculture**, v.483, p.46-52, 2018.

LUCZINSKI, Thiago Gabriel et al. **Proteína hidrolisada de frango em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**. 2019 Tese de Doutorado Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

LUNELLI, Taciana. **Reciclagem de resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) visando obter hidrolisado proteico como coproduto**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MA, Cuiyan; YE, Jianmin; KAATTARI, Stephen L. Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish. **European Journal of Immunology**, v.43, n.2, p.360-370, 2013.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, Oscar; CHAMORRO, Susana; BRENES, Agustín. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, v.73, p.204-212, 2015.

MAULDIN, J.M., 1998. A hatchery and breeder flock sanitation guide.

MEHDIPOUR, M. et al. Effects of Different Levels of Hatchery Wastes on the Performance, Carcass and. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.12, n.18, p.1272-1276, 2009.

MENDES, Adriano A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, p.831-840, 2011.

MESEGUER, J. López-Ruiz A, García-Ayala A. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. **Anat Rec**, v.241, p.303-309, 1995.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, p.552-580, 2010.

MIOTTI, Paula Duarte Silva. **A valorização do resíduo e o aproveitamento do biogás na agroindústria de Cacao/RO**. 2016.

MORA, Leticia; REIG, Milagro; TOLDRÁ, Fidel. Bioactive peptides generated from meat industry by-products. **Food Research International**, v.65, p.344-349, 2014.

MORAES, Elenice Andrade; AMORIM, Lincoln da Silva Amorim; ALVES, Ciro Alexandre. RESÍDUO DE INCUBATÓRIO NA ALIMENTAÇÃO DE AVES E SUÍNOS. Revista Eletrônica **Nutritime**, v.5, n.4, p.607-625, 2008.

MORGAN, B. Paul. The complement system: an overview. **Complement methods and protocols**, p.1-13, 2000.

MURPHY, Jennifer N.; HAWBOLDT, Kelly; KERTON, Francesca M. Enzymatic processing of mussel shells to produce biorenewable calcium carbonate in seawater. **Green Chemistry**, v.20, n.12, p.2913-2920, 2018.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway-8**. Artmed Editora, 2014.

N. Montoya-Camacho, E. Marquez-Ríos, F.J. Castillo-Yáñez, J.L.C. López, J.A. López-Elías, S. Ruiz-Cruz, E.I. Jiménez-Ruiz, M.E. Rivas-Vega, V.M. Ocaño-Higuera. Advances in the use of alternative protein sources for tilapia feeding. **Rev. Aquac.**, 2018.

NAKANISHI, T., Shibasaki, Y., & Matsuura, Y. (2015). **Células T em Peixe.Biologia**,4(4), Os quatro genes TCR 640-663. <https://doi.org/10.3390/biology4040640> Nam, B.-H., Hirono, I., & Aoki, T. ,2003.

NANDA KUMAR, T.; SAMANTARA, Anisha; GULATI, Ashok. Poultry Value Chain. In: **Agricultural Value Chains in India**. Springer, p.227-252. Singapore, 2022.

NASCIMENTO, Victor Fernandez et al. Evolução e desafios no gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos no Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v.10, p.889-902, 2015.

NASRI, Moncef. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.81, p.109-159, 2017.

NAYLOR, Rosamond L. et al. Uma revisão retrospectiva de 20 anos da aquicultura global. **Nature**, v.591, n.7851, p.551-563, 2021.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N.; BERDUTINA, A. V. Properties and uses of protein hydrolysates. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.36, n.5, p.452-459, 2000.

NGUYEN, Huong Thi My; PÉREZ-GÁLVEZ, Raúl; BERGÉ, Jean Pascal. Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.324, p.127-134, 2012.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D. Dambmann. C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, v.66, n.5, p.642-646, 2001.

NIMALARATNE, Chamila; BANDARA, Nandika; WU, Jianping. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food chemistry**, v.188, p.467-472, 2015.

NIU, Jin et al. Effects of graded replacement of fish meal by fish protein hydrolysate on growth performance of early post-larval Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone). **Journal of Applied Animal Research**, v.42, n.1, p.6-15, 2014.

NIU, Jin et al. Effects of graded replacement of fish meal by fish protein hydrolysate on growth performance of early post-larval Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone). **Journal of Applied Animal Research**, v.42, n.1, p.6-15, 2014.

NOMAN, Anwar et al. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. **Process Biochemistry**, v.67, p.19-28, 2018.

ODUNSI, A. A.; AKINWUMI, A. O.; FALANA, O. I. Replacement value of hatchery waste meal for fish meal in the diet of laying Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Food Research Journal**, v.20, n.6, p.3107, 2013.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise FS. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v.33, p.1549-1558, 2010.

OVISSIPOUR, Mahmoudreza et al. Tuna viscera protein hydrolysate: nutritive and disease resistance properties for Persian sturgeon (*Acipenser persicus* L.) larvae. **Aquaculture Research**, v.45, n.4, p.591-601, 2014.

P. Castellano, M.C. Aristoy, M.A. Sentandreu, G. Vignolo, F. Toldrá Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne lactobacillus **Journal of Proteomics**, v.89, p.183-190, 2013.

PASUPULETI, Vijai K.; HOLMES, Chris; DEMAINE, Arnold L. Applications of protein hydrolysates in biotechnology. In: **Protein hydrolysates in biotechnology**. Springer, p. 1-9 Dordrecht, 2008.

PEARSE, Gail. Histopathology of the thymus. **Toxicologic pathology**, v.34, n.5, p.515-547, 2006.

PEIXE BR. **Associação Brasileira da Piscicultura**. Anuário 2020. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/> > Acesso em: 01/03/2022

PERON, Felipe Pessetti; DE PAULA, Bianca Barbosa; DOS SANTOS, Adriano José Führ. Avaliação de proteína hidrolisada de aves e suínos amineAU Tilápia® sobre o desempenho e resistência ao estresse da tilápia do Nilo na fase inicial. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.8, p.55058-55064, 2020.

PIERRE, Fernanda Cristina; ARAUJO, Silvia Mara Fernandes. Tratamento de resíduos em frigorífico de bovino corte. **Tekhne e Logos**, v.8, n.4, p.81-93, 2017.

PLASCENCIA-JATOMEA, Maribel et al. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.7, p.753-759, 2002.

PRABAKARAN, R.; VALAVAN, S. Ezhil. Riqueza de resíduos de aves: uma visão geral. **World's Poultry Science Journal**, v.77, n.2, p.389-401, 2021.

RAMIREZ, Jerome et al. Wastes to profit: a circular economy approach to value-addition in livestock industries. **Animal Production Science**, v.61, n.6, p. 541-550, 2021

RASHIDIAN, Ghasem et al. Dietary effects of a low-molecular weight fraction (< 10 kDa) from shrimp waste hydrolysate on growth performance and immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Employing nanodelivery systems. **Fish & Shellfish Immunology**, v.118, p.294-302, 2021.

RAUTA, Pradipta R.; NAYAK, Bismita; DAS, Surajit. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. **Immunology letters**, v.148, n.1, p.23-33, 2012.

REFSTIE, Ståle; OLLI, Jan J.; STANDAL, Håkon. 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**, v.239, n.1-4, p.331-349, 2004.

REN, Jiaoyan et al. Otimização da produção de peptídeos antioxidantes da proteína sarcoplasmática de carpa de capim usando metodologia de superfície de resposta. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, n.9, p.1624-1632, 2008.

REVERTER, Miriam et al. Moving towards more sustainable aquaculture practices: a meta-analysis on the potential of plant-enriched diets to improve fish growth, immunity and disease resistance. **Reviews in Aquaculture**, v.13, n.1, p.537-555, 2021.

REZAYIPOOR, N. et al. Effects of substituting hatchery wastes for cotton seed meal in fattening male lamb diets on feed intake, live animal performance, carcass composition and physicochemical characteristics of Longissimus thoracis. **Meat Science**, p.108768, 2022.

RIMOLDI, S. et al. Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome. **BMC Veterinary Research**, v.16, n.1, p.1-13, 2020.

Rutherford, Shane M. "Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. **Journal of AOAC International**, 93.5 (2010): 1515-1522

SANTOS, Pedro Henrique Gomes dos. **Avaliação de subprodutos do abate de animais terrestres** e de resíduos do processamento de peixes como fonte de proteína em rações para o camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). 2013.

SCHLUTER, S. F. et al. 'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, n.2, p.107-111, 1999.

SCHMIDT, Cristiano Gautério; SALAS-MELLADO, Myriam. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v.32, p.1144-1150, 2009.

SCHUSTER, Rainer. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.431, p.271-284, 1988.

SHAHRIAR, H. Aghdam et al. Effects of dietary different levels of hatchery wastes in broiler. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, n.1, p.100-105, 2008.

SHARARA, H. H.; EL-HAMMADY, H. Y.; ABD-EL-FATTAH, H. Nutritive value of some non-conventional by-products as poultry feed ingredients. 2.-biological determination of metabolizable energy. **Assiut Journal of Agricultural Sciences (Egypt)**, 1992.

SHARMA, Mayuri et al. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v.15, n.2, p.69-78, 2019.

SHEETS, Johnathon P. et al. Beyond land application: Emerging technologies for the treatment and reuse of anaerobically digested agricultural and food waste. **Waste Management**, v.44, p.94-115, 2015.

SHEIH, I.-Chuan; FANG, Tony J.; WU, Tung-Kung. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p.279-284, 2009.

SIDDIK, Muhammad AB et al. Dietary tuna hydrolysate modulates growth performance, immune response, intestinal morphology and resistance to *Streptococcus iniae* in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.1-13, 2018.

SILVA, Enid Rocha Andrade da Coordenadora. Agenda 2030: **ODS-Metas nacionais dos objetivos de desenvolvimento sustentável**. 2018.

SILVA, Thiberio Carvalho da et al. Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, p.485-492, 2017.

SILVESTRE, M. P. C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.60, n.2, p.263-271, 1997.

SILVESTRE, Marialice Pinto Coelho et al. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, p.278-290, 2013

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. **Process Biochemistry**, v.40, p.1415-1424, 2005.

SOCACI, Sonia A. et al. Food wastes as valuable sources of bioactive molecules. **Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine**. Rijeka, Croatia: InTech, p.75-93, 2017.

SOUZA, D.C. de M. et al. **Imunologia dos peixes amazônicos: o quanto conhecemos?** Disponível em <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1130748>> 2021. Acesso em 14/03/2022

SPALVINS, Kriss; BLUMBERGA, Dagnija. Production of fish feed and fish oil from waste biomass using microorganisms: overview of methods analyzing resource availability. **Rīgas Tehniskās Universitātes Zinātniskie Raksti**, v.22, n.1, p.149-164, 2018.

SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v.13, n.6, p.447-453, 2003.

SUNG, Jung Yeol et al. Energy concentration and phosphorus digestibility in hatchery byproducts fed to nursery pigs. **Animals**, v.9, n.5, p.255, 2019.

SUNG, Jung Yeol; KIM, Beob Gyun. Effects of a hatchery byproduct mixture on growth performance and digestible energy of various hatchery byproduct mixtures in nursery pigs. **Animals**, v.10, n.1, p.174, 2020.

TAVANO, Olga Luisa. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, p.1-11, 2013.

TORT, Lluís; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v.22, n.3, p.277-286, 2003.

TUKMECHI, A.; BANDBONI, M. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on immune response, hematological parameters, body composition and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). **Journal of Applied Ichthyology**, v.30, n.1, p.55-61, 2014

UCZAY, JULIANO. **Utilização de hidrolisados de origem animal e vegetal em dietas para juvenis de jundiá**. 2017 Tese de Doutorado Universidade do estado de Santa Catarina.

UDENIGWE, Chibuike C.; ALUKO, Rotimi E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v.77, n.1, p.R11-R24, 2012

URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarian Medicina**, v.56, n.10, p.486–503, 2011.

VALENTI, Wagner C. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v.19, p.100611, 2021.

VAN DER VEN, Cornelly et al. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, v.12, n.10, p.813-820, 2002

VANDEPOPULIERE, J. M. et al. Broiler and egg type chick hatchery by-product meal evaluated as laying hen feedstuffs. **Poultry Science**, v.56, n.4, p.1140-1144, 1977.

VO, Binh Van, Muhammad AB Siddik, Md Reaz Chaklader, Ravi Fotedar, Ashfaqun Nahar, Md Javed Foysal, Dien Phan Bui, and Huy Quang Nguyen. Growth and health of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) challenged with DO hypoxia after feeding various inclusions of germinated, fermented and untreated peanut meals. **PLoS One**, v.15, n.4, 2020.

WANG, Wei et al. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. **Aquaculture Research**, v.48, n.1, p.1-23, 2017.

WARREN, Charles. What are the products of enzymatic cleavage of organic N. **Soil Biology and Biochemistry**, v.154, p.108152, 2021

WISUTHIPHAET, Nicharee; KONGRUANG, Sasithorn; CHAMCHEUN, Chalinee. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. **J. Medical Bioeng**, v.4, 2015.

WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Biotecnologia de Alimentos**, v.1, p.143-171, 2013.

WUBSHET, Sileshi G. et al. Bioanalytical aspects in enzymatic protein hydrolysis of by-products. In: Proteins: Sustainable source, processing and applications. **Academic Press**, 2019. p. 225-258.

XAVIER, Tadeu Orlandi. **Digestibilidade e desempenho de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando farinha de penas submetida a diferentes tecnologias de produção**. 2015.

XING, R. E. et al. Effect of enzymatically hydrolyzed scallop visceral protein powder used as a replacement of fish meal on the growth performance, immune responses, intestinal microbiota and intestinal morphology of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 207, p. 15-24, 2018.

YADAVA, Karun Kant et al. Probiotics and Immunostimulants in Aquaculture. **Biotica Research Today**, v. 3, n. 10, p. 901-903, 2021

YANG, Hang et al. Effects of replacing fish meal with fermented soybean meal on the growth performance, intestinal microbiota, morphology and disease resistance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture Reports**, v. 22, p. 100954, 2022.

ZAMORA-SILLERO, Juan; GHARSALLAOUI, Adem; PRENTICE, Carlos. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. *Marine Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 118-130, 2018

ZAPATA, A. et al. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 20, n. 2, p. 126-136, 2006.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

ZHANG, Cai et al. **The regulatory effect of natural killer cells:** do “NK-reg cells” exist. *Cell Mol Immunol*, v. 3, n. 4, p. 241-254, 2006.

ZHANG, Yuexing et al. Avaliação da água doce convencional ou hidrolisada do subproduto do atum gaiado de qualidade alimentar em dieta para garoupa híbrida (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂). **Aquaculture**, p.737714, 2021.

ZHAO, Xuebing et al. Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 567-590, 2017.

ZHENG, K. et al. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 297-303, 2012.

ZHENG, Keke et al. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*S. cophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 895-902, 2013.

ZOU, Ye et al. Values-added utilization of protein and hydrolysates from animal processing by-product livers: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 432-442, 2021.

Proteína hidrolisada de resíduo de incubatório (PHRIA) em dietas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seus efeitos do desempenho produtivo e sistema imune inato antes e após ao desafio com bactéria inativada *Streptococcus agalactiae*

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da proteína hidrolisada de resíduo de incubatório de aves (PHRIA) em diferentes níveis de inclusão nas dietas (0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0%) nas variáveis imunológicas, desempenho e parâmetro hematológico de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*, antes e após o desafio com bactéria inativada de *Streptococcus agalactiae*. Os animais foram divididos de forma aleatória em 24 tanques de polietileno de 200 L com densidade de 14 juvenis em cada, e peso médio de $32 \pm 0,45$ g. Os peixes receberam as dietas experimentais durante 60 dias. Ao final do experimento avaliou-se as variáveis de desempenho zootécnico: peso final (PF), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE) e sobrevivência, também três peixes escolhidos aleatoriamente de cada caixa foram submetidos ao desafio com a inoculação da bactéria *Streptococcus agalactiae*. Foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nas variáveis de desempenho avaliadas. Por outro lado, as tilápias apresentaram adequado ganho de peso (109 a 118 g) e peso final (141 a 151 g), além do consumo não ser prejudicado pela inclusão de hidrolisado nos níveis testados. Bem como foram avaliados a atividade respiratória de leucócitos (burst), ativação do sistema complemento, atividade lisozima e volume corpuscular (VCM). No entanto, todas as variáveis obtiveram diferença significativa antes e após o desafio, destacando a inclusão de 1,20% que resultou em aumento significativo em variáveis imunológicas (burst e lisozima). Estes resultados comprovam que o hidrolisado de resíduo de incubatório pode ser utilizado em dietas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) como imunoestimulante melhorando as variáveis imunológicas.

Palavras chaves: hidrolise enzimática, incubatório de aves, sustentabilidade, piscicultura.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of hydrolyzed poultry hatchery waste protein (PHRIA) at different inclusion levels (0; 0.6; 1.2; 1.8; 2.4; 3.0%) on immunological variables, performance and hematological parameters of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, before and after challenge with inactive *Streptococcus agalactiae* bacteria. The animals were randomly divided into 24 polyethylene tanks of 200 L with a density of 14 juveniles in each, and mean weight of 32 ± 0.45 g. The fish received the experimental diets for 60 days. At the end of the experiment, the zootechnical performance variables were evaluated: final weight (FP), weight gain (WG), apparent feed conversion rate (AFC), specific growth rate (SGR) and survival. Also, three fish randomly selected from each box were challenged with the inoculation of *Streptococcus agalactiae* bacteria. Differences ($P > 0.05$) were observed in the performance variables evaluated. On the other hand, tilapia presented adequate weight gain (109 to 118 g) and final weight (141 to 151 g), besides the consumption not being harmed by the inclusion of hydrolysate at the tested levels. Leukocyte respiratory activity (burst), complement system activation, lysozyme activity, and corpuscular volume (MCV) were also evaluated. However, all variables showed significant difference before and after the challenge, highlighting the inclusion of 1.20% that resulted in significant increase in immunological variables (burst and lysozyme). These results prove that the hydrolysate of hatchery waste can be used in diets of tilapia-do-Nile (*Oreochromis niloticus*) as immunostimulant, improving immunological variables.

Key words: enzymatic hydrolysis, poultry hatchery, sustainability, fish farming.

4. Introdução

A produção mundial de carne de frango foi estimada em 100 milhões de toneladas no ano de 2021 (USDA, 2022). O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo, produzindo cerca de 14,32 milhões de toneladas em 2021, e alojando cerca de 55 milhões de matrizes no mesmo ano (ABPA, 2022). Em decorrência deste fato, 757 milhões de dúzia ovos foram destinados para incubação em 2021 (IBGE, 2022). No entanto, estima-se que 5 a 8% dos ovos são inférteis (NUNES et al., 1998), 10% não eclodem ou são pintinhos natimortos e pintinhos fora do padrão (MORAES et al., 2008). O resultado das perdas durante a incubação gera 77.000 toneladas de resíduo por semana (KOBASHIGAWA et al., 2008). O resíduo de incubatório (RIA) é um problema ambiental e para indústria, portanto pesquisas devem ser realizadas para encontrar soluções para uma destinação adequada.

O RIA é uma fonte rica em proteínas e lipídios, nutrientes necessários para a formulação de dietas destinadas a animais de produção e estimação (ALVES, 2018). O desenvolvimento de estratégias para a utilização de subprodutos como o hidrolisado proteico pode atender à demanda de ingredientes em dietas oferecidas a animais de produção, principalmente para aquicultura que requer níveis elevados de proteína, e necessita encontrar substitutos da farinha de peixe. A farinha de RIA empregada em dietas de peixes carnívoros pode ser utilizada como um complemento alimentar, o que acarreta a diminuição do custo de produção (AYOOLA, 2011)

Proteína hidrolisada de resíduo de incubatório (PHRIA) é um produto originado a partir da hidrólise enzimática de proteínas, ocasionando a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (WISUTHIPHAET & KONGRUANG, 2015). No entanto, a PHRIA ainda não foi explorada por pesquisas, porém hidrolisados semelhantes como o hidrolisado de carne de frango mecanicamente separada (DE OLIVEIRA et al., 2014), hidrolisado de vísceras de aves (CARVALHO, 2019; MARTINS et al., 2021), hidrolisado de intestino de frango (WU et al., 2022) e hidrolisado de carne de frango (SAIGA et al., 2003; NI et al., 2021) foram avaliados em projetos de pesquisas e alguns estão disponíveis no mercado de aditivos e ingredientes destinados a aquicultura (BRF ingredientes, 2021).

Hidrolisados de frango quando incluídos em dietas para peixes melhoram a digestibilidade, desempenho e palatabilidade (ROCHA, 2018; OLIVEIRA, 2020). Os hidrolisados de subprodutos do abate de aves apresentaram valores elevados das frações nutricionais, além de peptídeos que podem atuar como imunoestimulantes (CARDOSO, 2019). Contudo, são escassas pesquisas com hidrolisados de frango atuando em respostas imunes de peixes. A hidrólise enzimática de proteínas resulta em peptídeos biologicamente ativos que podem atuar de modo benéfico com efeitos antioxidantes, imunológicos e metabólicos nos peixes (SIDDIK et al., 2021).

A PHRIA tem o objetivo de disponibilizar os peptídeos e aminoácidos necessários para a imunomodulação e crescimento das tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A inclusão de aditivos imunoestimulantes é crucial para a saúde dos peixes, o que afeta diretamente em seu crescimento. O RIA hidrolisado enzimaticamente foi então utilizado como aditivo em dietas com foco no desempenho zootécnico e respostas imunes da tilápia-do-Nilo desafiada a bactéria.

5. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tilapicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O experimento foi organizado com seis dietas experimentais e quatro repetições (24 unidades experimentais). Os juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram alimentados com uma dieta controle e cinco níveis de inclusão (Tabela 2) de hidrolisado proteico de resíduo de incubatório (PHRIA) para avaliar os efeitos no desempenho e respostas imunes antes e depois do desafio com a bactéria inativada *Streptococcus agalactiae*.

5.1.0 Peixes e instalações experimentais

Os juvenis de tilápia-do-Nilo foram obtidos de uma piscicultura comercial (Piscicultura Aquagenetics do Brasil Ltda, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil) e aclimatados no laboratório durante duas semanas. Após a adaptação, os peixes foram distribuídos em 24 tanques de 200 L com 14 peixes por tanque. Durante todas as manipulações os peixes foram anestesiados com benzocaina (35 mg L⁻¹).

O sistema foi composto de tanques de polipropileno de 200 L (24 unidades) em sistema fechado de recirculação de água. O sistema de recirculação foi composto por um decantador, filtro mecânico e filtro biológico. A temperatura foi mantida com um trocador de calor (Sodramar s85), e a aeração feita através de um difusor de ar, que distribuía ar para pedras porosas acopladas em mangueiras de silicone dispostas em cada tanque do sistema. Os peixes foram alimentados com dieta peletizada duas vezes (10 h e 17 h) até a saciedade aparente, durante 60 dias.

5.1.1 Produção do hidrolisado proteico de resíduo de incubatório.

O PHRIA foi preparado com a utilização de resíduos de incubatório de frango de corte compostos por cascas de ovos, ovos, penugem e pintinhos inteiros (Figura 1) de diferentes fases da incubação das aves. O resíduo de incubatório foi obtido em um incubatório comercial de Nuporanga-SP. Para a preparação do hidrolisado o resíduo passou por um processo de moagem e homogeneização (Figura 2) e foi congelado em freezer -20°C até o início das análises.

O início das análises aconteceu com a homogeneização do resíduo com água destilada. Esta homogeneização foi feita em liquidificador (Turbo L-1000, 1000 W, Mondial) em velocidade alta por 60 segundos, depois o resíduo foi levado em um béquer ao banho-maria à 85°C por 20 minutos para que as enzimas endógenas fossem inativadas (GHASSEM et al., 2014). Este material foi transferido para um béquer encamisado de 2000 mL, ligado diretamente ao banho-maria, e a agitação e homogeneização constante do resíduo foi realizada por um agitador mecânico.

A enzima escolhida foi uma enzima protease alcalina, pois testes anteriores com a protease acida não alterou o pH do produto, o que não nos permitia mensurar o tempo da hidrólise pela metodologia pHstat. A enzima utilizada foi a Alkaline protease (Shandong Longda-Bio-Products Co. LTD, Shandong Province, China) com temperatura ótima de 55 °C e pH igual a 8,4. A temperatura para a hidrólise foi mantida a 55 °C no banho maria, e o pH da amostra foi alterado com a adição de NaOH em todo o processo de hidrólise.

Foram adicionados 0,16 g de enzima para 500 g de resíduo e quando o pH da mistura se manteve estável a hidrólise foi considerada finalizada. A metodologia utilizada foi a de pH-stat (ADLER-NISSEN, 1979) com o monitoramento da amostra quanto ao tempo e pH (HOYLE, 1994; LICEAGA, 1999). Após o término do processo de hidrólise a temperatura da mistura foi elevada a 85°C por 20 minutos para interromper a atividade da enzima.

Os hidrolisados líquidos foram mantidos à 7°C por 24 horas para que ocorresse a sedimentação (Figura 3). O sedimento foi peneirado sendo utilizada a fração líquida da mistura. Uma amostra de 6 mL do líquido foi utilizada para análise de grau de hidrólise (DH) pela metodologia (TCA) e o restante foi disposto em bandejas. A secagem do hidrolisado ocorreu em uma estufa de ar forçado a temperatura de 65°C por 16 horas, depois deste período o material seco, foi moído e transformado em pó.

Ao final do processamento dos hidrolisados realizou-se as análises bromatológicas do mesmo, sendo determinados: proteína bruta (PB, método 984.13), matéria seca (MS, método 934.01), matéria mineral (MM, método 942.15) e extrato etéreo (EE, método EE 954.02) de acordo com AOAC (2006). Resumidamente, os métodos utilizados foram os seguintes: para proteína (PB) o cálculo foi realizado a partir da análise de nitrogênio pelo método MS Kjeldahl ($\% \text{ nitrogênio em MS} \times 6,25$); para determinação da matéria seca (MS) as amostras de ingredientes e dietas foram secas em estufa a 105° C por 24 h; para determinação da matéria mineral (MM), a amostra foi incinerada a 600°C durante 4 h; para a análise de extrato etéreo (EE) foi realizada a extração com solvente orgânico (éter de petróleo) e determinado através da diferença gravimétrica. Estas análises foram realizadas Laboratório de Ciências Avícolas – AVINESP da Unesp de Jaboticabal, São Paulo. Exceto a análise de extrato etéreo que foi realizada no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) Chapecó, Santa Catarina.

Tabela 1. Composição centesimal da proteína hidrolisada de resíduo de incubatório.

Composição centesimal %	Valores
Proteína bruta	48,78
Matéria seca	94,60
Matéria mineral	15,00
Extrato não nitrogenado	69,14
Energia bruta Kcal/kg	5.808
Extrato etéreo	33,83

A metodologia para a obtenção do grau de hidrólise (DH) consistiu em coletar 6 mL da amostra, com uma pipeta, colocar em Erlenmeyer de 50 mL e adicionar 4 mL da solução TCA (6,25%), deixando o material em repouso por 15 minutos. Passado este período, a amostra foi filtrada (filtro Whitman nº1), e o filtrado transferido para um tubo Falcon e armazenado e congelado. Posteriormente, foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Lowry (POP 23 Determinação de proteína solúvel – LOWRY), e o grau de hidrólise determinado utilizando a equação abaixo (DH) (HOYLE & MERRITT, 1994; LICEAGA-GESUALDO & LI-CHAN, 1999).

Cálculo em porcentagem (%):

$$\%GH = \frac{A \text{ (mg)} \times 100}{B \text{ (mg)}}$$

Onde:

A = Proteína solúvel em TCA 6,25% (mg), ou seja, resultado obtido pelo Método de Lowry;

B= Proteína total da amostra (mg), ou seja, o valor obtido pelo método de Micro Kjeldahl.

5.1.2 Dietas experimentais

Uma dieta controle contendo farinha de peixe (controle 0%) e cinco dietas contendo diferentes inclusão de PHRIA foram formuladas constituindo as seis dietas experimentais (0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3,0%). A composição analisada e os ingredientes utilizados para a confecção das dietas são mostrados na Tabela 2. Os ingredientes foram misturados em um misturador tipo “Y” e, em seguida, moídos em moinho, peneira 0,5 mm. Após este processo, foi adicionada água a ração (40%) e gelatina incolor (0,1%) e iniciou-se a peletiza-

ção das dietas experimentais. As dietas foram processadas em moedor de carne e os peletes foram secos em estufa de ar forçado a 55°C por 48 horas, e armazenados em sacos plásticos e conservados em freezer à -20°C durante todo o período experimental.

As dietas experimentais foram formuladas para serem isoprotéicas (30% PB) atendendo as exigências nutricionais da tilápia-do-Nilo (FURUYA et al., 2010; NRC, 2011). Os nutrientes e energia das dietas foram calculados a partir dos coeficientes de digestibilidade descritos por FURUYA et al. (2010) e análises bromatológicas (Tabela 2).

Tabela 2. Dietas experimentais e composição bromatológica

Ingredientes	–	Níveis de inclusão %					
		0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Farelo de soja, 48%PB ¹		40,10	40,10	40,22	40,32	40,39	40,47
Farinha de ² peixe		12,00	11,40	10,80	10,20	9,60	9,00
Milho ³		37,00	37,00	37,00	37,00	37,00	37,00
Farelo de trigo		7,30	7,30	7,30	7,30	7,30	7,30
Óleo de soja		1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
Fosfato Bicálcico		0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Supl. Vit e Min ⁴		0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Vit.C		0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Caolin		0,68	0,68	0,56	0,46	0,39	0,31
Hidrolisado		0,00	0,60	1,20	1,80	2,40	3,00
Composição centesimal %							
Matéria seca		89	89	89	89	89	89
Proteína bruta		30	30	30	30	30	30
Extrato etéreo		4	4	4	4	4	4
Fibra Bruta		3	3	3	3	3	3
Matéria Mineral		4	4	4	5	5	5
Extrato não nitrogenado		49	43	45	51	50	50

¹ e ³ Laboratório de Suinocultura da UNESP (Jaboticabal, Brasil). ² e ⁴ Fornecido por Agromix (Jaboticabal, Brasil) ⁴O premix vitamínico e mineral forneceu por Kg⁻¹: Ácido Fólico (Mínimo)

1200,00 mg/kg; Ácido Nicotínico (Mínimo) 20,00 g/kg; Ácido Pantoténico (Mínimo) 10.000,00 mg/kg; BHT (Mínimo) 5.000,00 mg/kg; Biotina (Mínimo) 200,00 mg/kg; Cobalto (Mínimo) 80,00 mg/kg; Cobre (Mínimo) 3.500,00 mg/kg; Colina (Mínimo) 100,00 g/kg; Ferro (Mínimo) 20,00 g/kg; Iodo (Mínimo) 160,00 mg/kg; Inositol (Mínimo) 25,00 g/kg; Manganês (Mínimo) 10.000,00 mg/kg; Selênio (Mínimo) 100,00 mg/kg; Vitamina A (Mínimo) 2.400.000,00 UI/kg; Vitamina B1 (Mínimo) 4.000,00 mg/kg; Vitamina B2 (Mínimo) 4.000,00 mg/kg; Vitamina B12 (Mínimo) 8.000,00 mcg/kg; Vitamina C (Mínimo) 60,00 g/kg; Vitamina B2 (Mínimo) 4.000,00 mg/kg; Vitamina B6 (Mínimo) 3.500,00 mg/kg; Vitamina D3 (Mínimo) 600.000,00 UI/kg; Vitamina E (Mínimo) 30.000,00 UI/kg; Vitamina K3 (Mínimo) 3.000,00 mg/kg; Zinco (Mínimo) 24,00 mg/kg.

5.1.3 Bactéria inativada (*Streptococcus agalactiae*)

A bactéria utilizada foi a *Streptococcus agalactiae* cepa ip202 16S gene de RNA ribossômico, sequência parcial. As amostras coletadas foram provenientes do rim de tilápias infectadas, na cidade de Ilha Solteira São Paulo, Brasil (NCBI, 2022). Para o preparo do inóculo, a cepa foi cultivada em meio TSA (Triplic SoyAgar, Sigma-Aldrich, MO, EUA), incubada a 28°C por 24 horas e para confirmação da pureza foi analisado a morfologia da colônia em placa e coloração de Gram.

Após confirmação, uma colônia foi repicada em meio TSB (Triplic Soy Broth, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubada a 28°C por 24 horas em estufa de crescimento. Após, foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 3.000 × g em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804 R) e lavada várias vezes com solução salina tamponada de fosfato esterilizado (PBS) até que se formasse peletes no fundo do tubo. A cultura foi inativada por adição de formalina tamponada a 10%, concentração final de 3%. As culturas inativadas foram centrifugadas a 6000 RPM por 30 minutos, a 4°C. Os peletes das culturas foram lavados e ressuspensos em solução salina estéril a 0,9%. A concentração bacteriana final foi de 1×10^7 UFC. A bactéria foi inoculada no primeiro dia de coleta, porém a coleta dos animais inoculados foi feita 48 horas após.

5.1.4 Amostragem

Ao final do período experimental de 60 dias, os peixes foram submetidos a jejum por aproximadamente 24 h. No primeiro dia de coleta foram coletados seis animais por tanque (vinte e quatro por tratamento), três peixes foram selecionados aleatoriamente para coleta de sangue e outros três para o desafio com a bactéria inativada. Os peixes foram anestesiados e as amostras de sangue foram coletadas imediatamente de vasos caudais utilizando seringas e

agulhas descartáveis, sendo destinada uma alíquota para separação do soro e outra para separação do plasma (15 µL de fluoreto de potássio + EDTA, Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, Brasil). Com o sangue total, coletado com heparina (100 UI mL⁻¹) foi realizada a determinação do hematócrito e contagem de eritrócitos, e após separação do plasma em centrifuga (3500 rpm) a atividade respiratória dos leucócitos. Para separação do soro, a amostra de sangue foi mantida em temperatura ambiente por três horas para coagulação, e após centrifugação (4°C por 10 min a 2000 x g), o soro foi coletado e armazenado em ultra freezer -80°C até sua utilização, para as análises de indicadores de resposta imune.

Os peixes foram inoculados no peritônio com a utilização de agulhas com 0,5 mL PBS que continham 1x 10⁷ UFC. Os peixes inoculados, foram novamente dispostos em suas caixas de origem, e após 48 horas, foi realizada a coleta de sangue.

5.2 Análises

Neste trabalho foram avaliados o desempenho zootécnico, variáveis hematológicas e indicadores de respostas imunes antes e após o desafio com a bactéria.

5.2.1 Desempenho Zootécnico

Depois de anestesiados realizou-se a pesagem individual de todos os animais em balança digital semi-analítica (Marte Científica, São Paulo, Brasil) e se aferiu o comprimento dos peixes. Com estes dados foram calculadas as variáveis de desempenho produtivo:

- **Peso médio final (PF);**
- **Ganho em peso:**

GP (g) = (peso médio final – peso médio inicial);

- **Taxa de crescimento específico:**

TCE (%/dia) = 100 x [(ln peso final – ln peso inicial) / período experimental];

- **Consumo alimentar diário:**

CONS (g/dia) = alimento consumido / período experimental;

- **Conversão alimentar aparente:**

CA = alimento fornecido / ganho em peso total;

5.2.2 Indicadores de imunidade inata

Atividade respiratória de Leucócitos (Burst oxidativo)

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada pela determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo Burst oxidativo (ANDERSON & SIWICHI, 1994; BRIDLE et al., 2005). Em microtubos contendo 50 µL de nitroazul de tetrazolium (NBT) foi adicionado 50 µL de sangue. As amostras foram incubadas por 30 min no escuro em temperatura ambiente e 50 µL desta solução foi adicionada à 1 mL de NN-dimetilformamida agitada e centrifugada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm absorbância).

Atividade do sistema complemento - via alternativa

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com Zanuzzo et al. (2015) e modificações. Primeiramente, retirou-se sangue de um coelho. O sangue foi utilizado para coletar os eritrócitos que foram lavados e isoladas RaRBCs.

Os eritrócitos do coelho foram empregados como um indicador. Foi realizado um ensaio cinético que determinou o tempo necessário para as amostras do soro do peixe lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho na densidade óptica inicial (0,7 a 700 nm) da suspensão RaRBCs.

As amostras de soro da tilápia-do-Nilo, que estavam a -80°C foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em tampão TEA-EGTA 8nM e Mg²⁺ 2 nM, com gelatina (0,1%). Para calibrar uma curva e facilitar o processo, foi feito um pool de amostras de soro (120 µL), suspensão e 200 µL de tampão para 400 µL de eritrócitos do sangue de coelho. Após isso, foi medido a absorbância a 700 nm utilizando espectrofotômetro (Modelo Genesys 10S, Thermo Scientific Inc., Madison, WI, EUA).

A via alternativa do complemento sérico foi determinada como o tempo em segundos necessário para a redução a metade (~ 0,35 a 700 nm) caracterizando 50% de hemólise mediada pelo complemento do soro. Para termos a atividade hemolítica da via alternativa, utilizou-se: HA-AP = tempo para obter 50% de hemólise (segundos).

Atividade da lisozima

Para determinação da concentração de lisozima sérica foi utilizado o soro e a metodologia empregada foi a de análise da suspensão da bactéria Gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (Ref M3770-25G Lot 117 K8707 - Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), de acordo com Demers e Bayne (1997). A partir da curva padrão determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Primeiramente foi determinada a curva de calibração, com todas as amostras de soro submetidas a tratamento térmico (banho-maria à 56° C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, certificando-se que a análise do *M. lysodeikticus* fosse provocada somente pela lisozima.

As amostras de soro foram colocadas em uma placa de fundo chato com 96 poços com uma suspensão de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil; M3770). Após a mistura, a absorvância foi medida a 450 nm ao longo de 10 min usando um leitor de microplaca (Multiskan Ascent Model, Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, EUA) à temperatura ambiente. A taxa de diminuição da absorvância para cada amostra foi então relacionada e obtida com a curva padrão ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$).

5.3 Análises Estatísticas

Para a avaliação dos dados utilizou-se testes de normalidade e homogeneidade de variância usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, não sendo observada violação dessas suposições ($P < 0,05$). Os resultados de desempenho foram submetidos a análise de regressão polinomial de primeiro e segundo grau. Para as variáveis hematológicas e sistema imune foram utilizados análises de variância two-way. As análises foram realizadas com o software Statistical Analysis Systems versão 1.2 do Rstudio Team (Rstudio, Inc., Boston, MA, 2018).

6. Resultados

6.1 Desempenho de zootécnico

A inclusão de proteína hidrolisada de resíduo de incubatório não resultou em efeito quadrático e linear significativo em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho produtivo de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório.

*Variáveis	Níveis de inclusão						SEM	Valor P	
	0	0,60	1,20	1,80	2,40	3,0		Linear	Quadrática
PI	32	32	32	32	31	32	0,11	0,11	0,24
CI	11	11	11	11	11	11	0,03	0,06	0,77
PF	149	144	141	145	144	151	1,62	0,69	0,06
CF	19	19	19	19	19	19	0,06	0,58	0,81
GP	116	111	109	112	112	118	1,62	0,61	0,07
TCE	2	2	2	2	2	2	0,01	0,38	0,15
CONS	173	173	169	171	171	173	1,65	0,91	0,44
CA	1	1	1	1	1	1	0,01	0,51	0,17

Medias de 6 tratamentos com 4 repetições cada *PI: peso inicial; CI: comprimento inicial; PF: peso final; CF: comprimento final; GP: ganho de peso; TCE: taxa de crescimento específico; CONS: consumo médio de ração; CA: conversão alimentar.
SEM = erro padrão da média

6.2 Indicadores de imunidade inata e volume corpuscular médio (VCM).

Os resultados dos tratamentos nos indicadores de imunidade inata e volume corpuscular médio (VCM), estão descritos na Tabela 4. A utilização do hidrolisado proteico resultou em diferenças significativas na atividade respiratória de leucócitos (Burst), atividade da lisozima, ativação do sistema complemento e VCM, com efeitos significativos da interação entre níveis de inclusão do hidrolisado proteico e desafio com *Streptococcus agalactiae* em todas as variáveis.

Tabela 4 Indicadores de imunidade inata e volume corpuscular médio (VCM) de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório.

Variáveis	0,0	0,60	Hidrolisado				Desafio		Two-way ANOVA		
			1,20	1,80	2,40	3,00	Antes	Após	Hidrolisado	Desafio	Interação
Burst	0,40 7a	0,433 a	0,383a b	0,409 a	0,428 a	0,374a b	0,408	0,403	<0,001	0,480	<0,001
Comple	297, 20c	389,7 6a	310,90 bc	281,3 0c	296,4 0c	341,31 b	295,08 b	343,9 2a	<0,001	<0,0 01	<0,001
Lisozima	12,8 8b	12,81 b	13,78a	12,39 b	11,44c	12,64b	9,46b	15,85 a	<0,001	<0,0 01	<0,001
VCM	115, 58ab	117,9 8a	101,15 c	103,9 6c	101,6 8c	116,10 ab	109,28	109,5 4	<0,001	0,920	<0,001

Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
SEM: Erro padrão da média

6.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (Burst)

A interação entre os níveis de inclusão do hidrolisado de resíduo de incubatório e desafio com *S. agalactiae* na atividade respiratória está apresentada na Tabela 5. A maior atividade respiratória ocorreu: com 2,4% de inclusão e após o desafio: com 0,60%. Antes do desafio o maior valor de burst foi observado nos peixes que receberam a dieta com 2,4% do resíduo de incubatório hidrolisado, mas sem diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$). E após o desafio os peixes que receberam a dieta com 0,6 e 1,2% do resíduo apresentaram os maiores valores, sem diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 5 Atividade respiratória de leucócitos (Burst) de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e inoculados com *S. agalactiae*.

Variável	Hidrolisado	Desafio	
		Antes	Após
Burst	0,0	0,426 abA	0,389 abB
	0,60	0,429 ab	0,436 a
	1,20	0,346 cB	0,420 aA
	1,80	0,410 ab	0,408 ab
	2,40	0,449 aA	0,406 abB
	3,00	0,389 bc	0,360 b

Letras minúsculas indicam médias estatisticamente diferentes entre os níveis de inclusão de hidrolisado pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam médias estatisticamente diferente antes e após o desafio pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

6.2.2 Ativação do Sistema Complemento

A interação entre os níveis de inclusão do hidrolisado de resíduo e desafio na ativação do sistema complemento está apresentada na Tabela 6. Os níveis de 1,80, 0,0 e 3,0 % de inclusão de resíduo resultaram em menor tempo de ativação do sistema, complemento, no entanto este tempo foi menor após o desafio somente em níveis 1,2 e 2,4% de inclusão.

Tabela 6 Ativação do sistema complemento de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e desafio com *S. agalactiae*.

Variável	Hidrolisado	Desafio	
		Antes	Após
Complemento	0,0	277,50bcB	316,91bA
	0,60	345,66aB	433,86aA
	1,20	313,76ab	308,03b
	1,80	252,06cB	310,54bA
	2,40	304,50ab	288,30b
	3,00	276,75bcB	405,88aA

Letras minúsculas indicam médias estatisticamente diferentes entre os níveis de inclusão de hidrolisado pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam médias estatisticamente diferente antes e após o desafio pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

6.2.3 Atividade de lisozima

A interação entre os níveis de inclusão do hidrolisado de resíduo e desafio na atividade de lisozima está apresentada na Tabela 7. Os níveis de inclusão do resíduo 0,6 e 3,0% resultaram em menor atividade de lisozima antes do desafio, mas sem diferença da inclusão de 0,0 e 2,4% do resíduo. E após o desafio, a inclusão de 1,8 e 2,4% do resíduo resultou em menor atividade.

Tabela 7 Atividade de tilápias-do-Nilo alimentadas com hidrolisado proteico de resíduo de incubatório e desafio com *S. agalactiae*.

Variável	Hidrolisado	Desafio	
		Antes	Após
Lisozima	0,0	9,41abB	16,34aA
	0,60	8,80bB	16,82aA
	1,20	10,27aB	17,28aA
	1,80	10,21aB	14,58bA
	2,40	9,35abB	13,54bA
	3,00	8,73bB	16,56aA

Letras minúsculas indicam médias estatisticamente diferentes entre os níveis de inclusão de hidrolisado pelo teste Tukey ($P<0,05$). Letras maiúsculas indicam médias estatisticamente diferente antes e após o desafio pelo teste Tukey ($P<0,05$).

6.3 Volume corpuscular médio (VCM)

A interação entre os níveis de inclusão do hidrolisado de resíduo e desafio na atividade de volume corpuscular médio VCM está apresentada na tabela 8. Não houve diferença entre os tratamentos 0,60 e 3% de inclusão sendo que estes obtiveram VCM maior antes do desafio. Após o desafio houve aumento do VCM dos tratamentos 0,0 e 1,20%.

Tabela 8 Volume Medio Corpuscular (VCM) de diferentes níveis de inclusão de hidrolisado com interação antes e após o desafio.

Variável	Hidrolisado	Desafio	
		Antes	Após
VCM	0,0	101,52cB	129,65aA
	0,60	112,28ab	113,69ab
	1,20	92,04cB	110,26bA
	1,80	107,03bc	100,89b
	2,40	105,01bc	98,35b
	3,00	127,81aA	104,38bB

Letras minúsculas indicam médias estatisticamente diferentes entre os níveis de inclusão de hidrolisado pelo teste Tukey ($P<0,05$). Letras maiúsculas indicam médias estatisticamente diferente antes e após o desafio pelo teste Tukey ($P<0,05$).

7. Discussão

A alimentação animal requer uma quantidade elevada de proteína, sendo esta um nutriente chave para o desenvolvimento, desempenho produtivo e imunológico (CELI et al., 2017). No entanto algumas fontes de proteína utilizadas estão se tornando escassas, e é necessário a utilização de novos materiais proteicos (ZERMEÑO-CERVANTES et al., 2020). Diante disso, pesquisas estão sendo elaboradas com fontes oriundas do processamento de produtos de origem animal, ou fases da produção, pois são geradas grandes quantidades de resíduos e subprodutos que contém elevados níveis proteicos (JAYATHILAKAN et al., 2012).

Outro ponto importante da utilização destes produtos é para o desenvolvimento de estratégias de gestão de resíduos, que colaboram na implementação da sustentabilidade (JIANG et al., 2020). Para a construção de uma economia circular precisa-se reduzir ao máximo a geração de resíduos (PIRES & MARTINHO, 2019). Neste sentido, o emprego de PHRIA demonstra o seu potencial de utilização, por apresentar um nível elevado de proteína (48%), que consiste em muitos aminoácidos, que são características nutricionais comparáveis com a da farinha de peixe. Mas não há relatos até o presente momento da utilização de PHRIA na nutrição animal, sendo este um trabalho inovador na área. Os resultados que obtivemos nesta pesquisa abre portas para novos estudos utilizando este produto, em maiores e menores níveis de inclusão ou até mesmo como substituto da farinha de peixe.

Nas variáveis de desempenho analisadas não foram observadas diferenças significativas, isso demonstra que não houve prejuízo no desempenho em comparação com a dieta sem a inclusão do PHRIA. A farinha de resíduo de incubatório substituindo 25% de farinha de peixe, não causou problemas de desempenho produtivo em bagres africanos (*Clarias gariepinus*) o que demonstrou que sua utilização pode diminuir o custo de produção das dietas (AYOOLA, 2011). No entanto, quando se trata de diferentes níveis de inclusão de hidrolisado de vísceras de aves e suínos em dietas de juvenis de tilápia-do-Nilo, foi observado que níveis baixos como 0,3 e 0,6% de inclusão podem trazer resultados positivos para desempenho (PERON, et al., 2020).

O grau de hidrólise (GH) da PHRIA foi de 15,91% sendo considerado um grau de hidrólise máximo alto quando comparado a outros trabalhos

que utilizaram subprodutos de frango. Com a utilização do resíduo de abatedouro de aves a hidrólise máxima obtida foi de 12,78% (TESHNIZI et al., 2020). Entretanto, na hidrólise com farinha de frango o GH foi de 11,13% (NCHIENZA et al., 2010). GH representa a porcentagem de ligações peptídicas quebradas, o que afeta as propriedades físico-químicas e funcionais do hidrolisado (WASSWA et al., 2007).

Nas variáveis de imunidade inata foram observados resultados significativos entre diferentes níveis de inclusão de PHRIA antes e após o desafio. Pode-se observar menor atividade respiratória de leucócitos com 3% de inclusão antes e após o desafio. O nível 1,2% resultou em menor atividade respiratória de leucócitos antes, no entanto, após o desafio resultou na maior atividade observada. Em níveis maiores de inclusão de hidrolisados de fígado suíno foi observado uma menor atividade respiratória de leucócitos (LORENZ, 2018). A influência que o hidrolisado de animais terrestres de produção pode ter sobre a atividade respiratória de leucócitos, possivelmente está ligada à sua concentração proteica, e ao perfil de aminoácidos e peptídeos liberados na hidrólise.

Observamos maior atividade da lisozima em 1,2% de inclusão antes e após o desafio. A atividade da lisozima é afetada pelos peptídeos bioativos presentes no hidrolisado (BUI et al., 2013). Podemos afirmar que quanto maior atividade de lisozima e ativação do sistema complemento, melhor serão os benefícios oferecidos pelo imunoestimulante, pois estas variáveis são importantes marcadores da resposta imune inata (SAURABH et al., 2008; SUYER, 2003). A ativação do sistema complemento ocorreu em menor tempo em inclusões 1,8, 0,0 e 3,0% antes do desafio, os níveis após 1,2 e 2,4% resultaram em menor tempo de ativação. O sistema complemento é o responsável pela eliminação e reconhecimento de patógenos (GONZALEZ, 2007). O que corrobora com a hipótese que o PHRIA seja um imunoestimulante eficaz no estímulo de respostas imunes inatas.

No volume corpuscular médio foi observado diminuição entre os diferentes níveis, sendo que 3,0% foi maior antes do desafio e 0,0 e 1,20% resultaram em maior volume corpuscular médio. O VCM representa o tamanho de eritrócitos presentes, este indicador é importante para identificar anemias causadas por doenças e deficiências minerais ou vitamínicas. (RANZENI, 2014). O resíduo de incubatório de aves em substituição a farinha de peixe

teve uma ligeira diminuição em parâmetros hematológicos de *Clarias gariepinus*, segundo este resultado pode estar ligado ao tipo de sistema experimental e ao estresse que os animais foram expostos (AYOLA, 2011).

O PHRIA quando incluído 1,2% em dietas de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstrou resultados significativos na estimulação da imunidade inata antes e após o desafio com a bactéria inativada de *Streptococcus agalactiae*. Este nível de inclusão é considerado intermediário entre os demais, o que pode acarretar menor custo em sua inclusão em dietas.

8. Conclusão

Em conclusão, os resultados de desempenho do presente ensaio demonstram que o hidrolisado proteico de resíduo de incubatório pode ser utilizado em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem prejudicar o desempenho dos peixes quando comparado a dieta que contém somente farinha de peixe nos níveis avaliados. Além disso, a inclusão de 120 gramas de PHRIA se destacou pois melhorou os parâmetros imunológicos, sendo esta a inclusão mais indicada para utilização.

9. Referências

- ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 69-74, jul. 2002
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.
- AL-SOUTI, A. et al. Attractability and palatability of formulated diets incorporated with chicken feather and algal meals for juvenile gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture Reports**, v. 14, p. 100199, 2019.
- ALVES, D. R. S. et al. Palatability of protein hydrolysates from industrial byproducts for Nile tilapia juveniles. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 311, 2019.
- ALVES, G. P. **Caracterização dos resíduos de incubatório de ovos destinados à produção de frangos de corte**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Grande Dourados.
- ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.) Diseases

in **Asian Aquaculture** II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 1994. p.185-202.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 18th ed. Assoc. Anal. Chem, Gaithersburg, MD, USA.

AYOOLA, S. O. Utilization of compounded feed and poultry hatchery waste in the diet of *Clarias gariepinus*. **Niger. J. Fish**, v. 8, p. 291-299, 2011.

BAE, J. et al. Effects of enzymatically hydrolyzed fish by-products in diet of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2019.

Brazil foods- **BRF** Proteína Hidrolisada de Frango na aquicultura. Disponível em: <<https://www.brfeedingredients.com/pt-br/nutricao-animal/proteina-hidrolisada-de-frango/>> Acesso em:24/06/2022

BRIDLE, A. R.; CARTER, C. G.; MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. The effect of β glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 347–356, 2005.

CALLEGARO, K.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Beyond plucking: feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. **Waste Management**, v. 95, p. 399-415, 2019.

CARDOSO, Marjana dos Santos et al. **Digestibilidade aparente de hidrolisados proteicos de resíduos do abate de frangos e suínos pela tilápia do Nilo**. 2019 Tese de Doutorado Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

CARDOSO, Matheus dos Santos. **Proteína hidrolisada de frango em dietas para reprodutores de tilápia-do-Nilo**. 2020.Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista.

CARVALHO, K. V. et al. **Hidrolisado proteico misto de subprodutos de aves e fígado suíno em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. Tese de Doutorado Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

CARVALHO, K. V. et al. Poultry byproducts and swine liver used in diets for Nile tilapia juveniles. **Latin american journal of aquatic research**, v. 48, n. 5, p. 895-900, 2020.

CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017.

DE CARVALHO, S. M. M.; BARROS¹, M. R.; BASTOS, F. J. F.. **Resíduos da produção de frangos de corte: incubatório**. 2013

DE OLIVEIRA, M. S. R.; DE LIMA FRANZEN, F.; TERRA, N. N.. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 291-302, 2014.

DE PAIVA, M. J. T. R. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá- EDUEM, 2013.

DEMERS, N.E., BAYNE, C.J., 1997. **The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout**. **Developmental & Comparative Immunology**, 21, 363-373.

DIETERICH, F. et al. Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2014.

DOS SANTOS CARDOSO, M. et al. Digestibilidade aparente de hidrolisados proteicos de resíduos de abate de frangos e suínos para tilápia do Nilo. **Aquacultura**, v. 530, p. 735720, 2021.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA**
<<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>
Acesso em 10/03/2022

FASAKIN, E. A.; SERWATA, R. D.; DAVIES, S. J. Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*× *Oreochromis mossambicus*) diets. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 329-338, 2005.

FURUYA, W. M. et al. 2010. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM. 100p.

GHASSEM, M.; FERN, S. S.; SAID, M.; ALI, Z. M.; IBRAHIM, S.; BABJI, A. S. "Kinetic characterization of *Channa striatus* muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates." **Journal of Food Science and Technology** 51, no. 3, 2014.

GOLDENFARB, P. B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American journal of clinical pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GONÇALVES, A. FN. **Hidrolisados proteicos de víscera residual de sardinha na alimentação de trutas arco-íris**. 2021. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2019.

GOOSEN, N. J.; DE WET, L. F.; GÖRGENS, J. F.. The effects of protein hydrolysates on the immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 428, p. 243-248, 2014.

HA, N. et al. Sardine (*Sardinella spp.*) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture**, v. 500, p. 99-106, 2019.

HAMILTON, C. R. et al. Real and perceived issues involving animal proteins. In: **Protein sources for the animal feed industry. FAO Expert Consultation and Workshop, Bangkok, Thailand, 29 April-3 May 2002**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), p. 255-276, 2004.

HOU, Y. et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

HOYLE, NANA T.; MERRITT, JOHN H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of food Science**, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIAS E ESTATÍSTICAS - **IBGE**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/915#resultado> > Acesso em 10/03/2022

JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JIANG, P. et al. Data-driven analytical framework for waste-dumping behaviour analysis to facilitate policy regulations. **Waste Management**, v. 103, p. 285-295, 2020.

KITAGIMA, R. E.; FRACALLOSSI, D. M. Digestibility of alternative protein-rich feedstuffs for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 3, p. 306-312, 2011.

KVÅLE, A. et al. Effect of predigested protein on growth and survival of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 5, p. 311-321, 2002.

LEAL, A. L. G. et al. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. **Aquaculture international**, v. 18, n. 4, p. 635-646, 2010.

LEBOUTE, E. M. avaliação do resíduo de incubação como alimento para poedeiras comerciais'. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 22, n. 8, p. 859- 866, 1987.

LEDUC, A. et al. "Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets." **BMC genomics** 19, no. 1., 2018.

LEWANDOWSKI, V. et al. Hidrolisados cárneos na alimentação do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 4, 2013.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of food science**, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

LORENZ, E. K. et al. Performance, hematology and immunology of *Salminus brasiliensis* fed diets containing swine liver hydrolysate. **Aquaculture**, v. 483, p. 46-52, 2018.

LUCZINSKI, T. G. et al. **Proteína hidrolisada de frango em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**. 2019. Tese de Doutorado Universidade do Oeste do Paraná.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, v. 73, p. 204-212, 2015.

MARTINS, M. X. B. et al. Potencial redução do estresse em pós-larvas de tilápia do nilo alimentadas com hidrolisado proteico de fígado de aves. **EMBRAPA**, 2021.

MORAES, A. M. et al. **Avaliação zootécnica e econômica do cultivo de tilápia do Nilo, *Oreochromis Niloticus*, em tanques-rede, considerando diferentes rações comerciais**. 2008. Tese de Doutorado Universidade Federal de Santa Catarina.

National Center for Biotechnology Information - **NCBI** Streptococcus agalactiae strain ip202 16S ribosomal RNA gene. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU605554.1>>

NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National academies press, 2011.

NI, L. et al. Hydrolyzed chicken meat extract attenuates neuroinflammation and cognitive impairment in middle-aged mouse by regulating M1/M2 microglial polarization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 34, p. 9800-9812, 2021.

NUNES, R.V. Aproveitamento de Resíduos de Incubatório e de Granja. **congresso nacional dos estudantes de zootecnia**, 1998, Viçosa, MG. Anais... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.295-314, 1998.

NUNES, R. V. et al. Valores energéticos de subprodutos de origem animal para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1217-1224, 2005.

OLIVEIRA, S. R. et al. **Atratividade e palatabilidade de diferentes proteínas hidrolisadas para a espécie ornamental Betta splendens (Regan, 1910)**. 2020. Tese de Doutorado Universidade do Oeste do Paraná.

PIRES, A.; MARTINHO, G. Waste hierarchy index for circular economy in waste management. **Waste Management**, v. 95, p. 298-305, 2019.

POULTRY PRODUCTION United States Department of Agriculture – **USDA** Disponível em :<https://www.nass.usda.gov/Charts_and_Maps/Poultry/> Acesso em:16/05/2022

RADENKOVS, V. et al. Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. **Trends in food science & technology**, v. 77, p. 64-76, 2018.

RIMOLDI, S. et al. Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2020.

ROCHA, J. D. et al. Proteína hidrolisada de frango para tilápia do Nilo: digestibilidade e desempenho produtivo. 2018. Tese de Doutorado Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ROSTAGNO, H. S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. ED. ROSTAGNO, H.S. Viçosa: UFV, p. 252, 2017.

SAIGA, A. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1741-1745, 2003.

SANTOS, J. F. et al. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International**, v. 21, n. 3, p. 563-577, 2013.

SARKER, B. C. et al. Waste management of commercial poultry farms in Bangladesh. **Journal of innovation and development strategy**, v. 2, n. 3, p. 34-37, 2009.

SIDDIK, M. A.B. et al. Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 406-430, 2021.

SOARES, M. et al. Protein hydrolysates from poultry by-product and swine liver as an alternative dietary protein source for the Pacific white shrimp. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100344, 2020.

VANDEPOPULIERE, J. M. et al. Broiler and egg type chick hatchery by-product meal evaluated as laying hen feedstuffs. **Poultry Science**, v. 56, n. 4, p. 1140-1144, 1977.

WENG, Z. et al. A review on processing methods and functions of wheat germ-derived bioactive peptides. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, p. 1-17, 2021

WINNIKES, F. R. et al. Análise de viabilidade econômica da utilização de proteína hidrolisada de frango (PHF) na alimentação da tilápia-do- Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2020. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

WISUTHIPHAET, N.; KONGRUANG, S. Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. **Journal of Medical and Bioengineering**, 4(6), 466–470. <http://doi.org/10.12720/jomb.4.6.466-470>. 2015.

WU, D. et al. Assessment of chicken intestinal hydrolysates as a new protein source to replace fishmeal on the growth performance, antioxidant capacity and intestinal health of common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish & Shellfish Immunology**, 2022.

ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; MONTROYA, L. N. F.; FAVERO, G.; URBINATI, E. C., 2017. Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & shellfish immunology**, 65, 198-205.

ZERMEÑO-CERVANTES, L. A. et al. Antibacterial proteins and peptides as potential treatment in aquaculture: current status and perspectives on delivery. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1135-1156, 2020.

ZHENG, K. et al. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*S. cophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 895-902, 2013.

10. FIGURAS

Figura 1 - Residuo de incubatório em natura, composto por cascas de ovos, ovos quebravos, pintinhos de descarte, e líquido viscoso de ovos. (MICHIELIN, 2021).



Figura 2 Moagem e homogeneização do resíduo de incubatório, a moagem transformava o resíduo em partículas menores para possibilitar o processo de hidrólise (MICHIELIN, 2021).

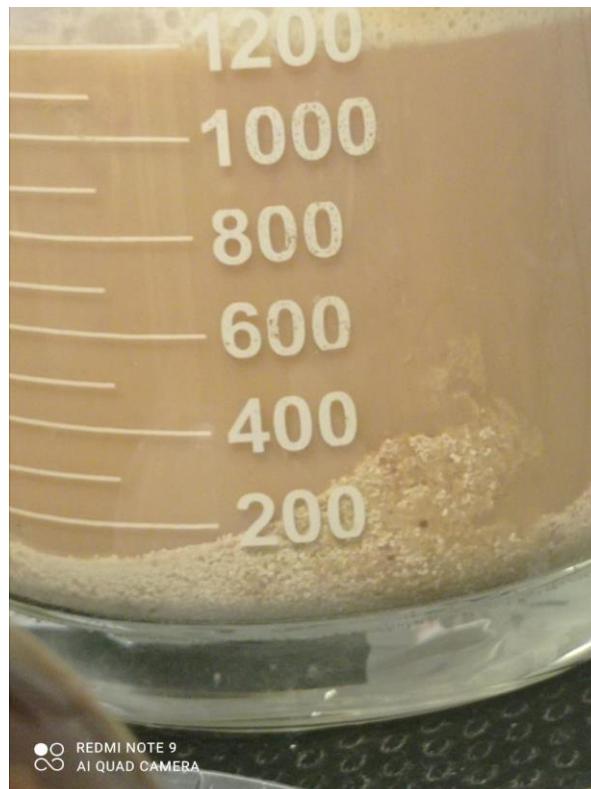


Figura 3 Sedimento de ovos do hidrolisado, o sedimento era composto por cascas de ovos penugem e bico, materiais que não sofreram hidrólise (MICHIELIN, 2021).