**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Hidrolisados proteicos na alimentação de juvenis de dourado *Salminus
brasiliensis***

Evandro Kleber Lorenz

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2017**

Evandro Kleber Lorenz
Engenheiro de Pesca

Hidrolisados proteicos na alimentação de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Lorenz, Evandro Kleber

Hidrolisados proteicos na alimentação de juvenis de dourado *Salminus
brasiliensis* / Evandro Kleber Lorenz. - - versão revisada de acordo com a resolução
CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

80p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Subprodutos de aves 2. Subprodutos de peixes 3. Tilápia 4. Suíno 5. Atum. .
I. Título

DEDICATÓRIA

A Jêneli,

Por seu amor incondicional e companheirismo sem limites.

A Fabiana, Edson, Emanuele e Bernardo,

Pelo amor fraternal, apoio e enorme incentivo.

A Marlene e Romeu,

Por me adotarem e dividirem comigo o seu amor maternal.

A Família Francisco,

Pela prestatividade, carinho e amizade que dispensaram a nós de forma sincera.

A Nelcinda (“in memorian”),

Por ter sido a Minha Melhor Mãe do Mundo e, apesar de todas as dificuldades, não ter medido esforços para nossa educação. Nunca esquecerei suas palavras:

“Não tenho condições de dar a vocês o que gostariam, mas farei de tudo para lhes dar estudo, pois é a única coisa que nunca irão lhes tirar.”

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Esalq/USP, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências Animais e Pastagens, por disponibilizar estrutura adequada e corpo docente competente.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento da Bolsa de estudos registrada sob o processo nº 2013/16023-0.

A Falbom Agroindústria Ltda., representada pela competente Engenheira de Pesca e minha grande amiga Fabiana Dieterich, por ter fornecido prontamente os hidrolisados utilizados durante a pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Piscicultura, Sérgio Pena e Ismael Baldessin Jr., pelo auxílio prestado.

Aos colegas: Daniel Sonoda, Eduardo França, Fernando Cornélio, Fernando Yamamoto, Fredy Aguilar, Gustavo Bosano, Ligia Uribe, João Koch, Rafael Barone, Rafael Sabioni, Renan Donadelli, Roselany Corrêa, Thaline da Cruz, Thiago Freato e Wellington França. Por terem auxiliado nas pesquisas, contribuído para o meu crescimento profissional e, sobretudo, pela amizade.

Aos meus amigos do B.C.F.C. que, mesmo distantes, sempre estão presentes com a mais sincera amizade.

Aos estagiários que contribuíram para a conclusão desse trabalho: Xã, Claiti, Baby, Vã-Gog, 100-Kina e Madoka.

Agradecimento especial ao Prof. José Eurico Possebon Cyrino (Zico), por ter acreditado na minha capacidade e ter me orientado. Por ter disponibilizado todas as estruturas e, principalmente, por ter contribuído significativamente à minha formação técnica e pessoal.

EPÍGRAFE

“Filho, aprenda o que eu lhe ensino e nunca esqueça o que mando você fazer.

Escute os sábios e procure entender o que eles ensinam.

Sim, peça sabedoria e grite pedindo entendimento.

Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido.

*Se você fizer isso, saberá o que quer dizer **temer o SENHOR**, e aprenderá a conhecê-lo.*

*É o **SENHOR** quem dá sabedoria; a sabedoria e o entendimento vêm dele.*

*Ele dá ajuda e proteção a quem é **direito e honesto**.*

*Deus protege os que tratam os outros com **justiça** e guarda os que lhe obedecem.*

*Se você **me ouvir**, entenderá o que é **direito, justo e honesto** e saberá o que deve fazer.*

Você se tornará sábio, e a sua sabedoria lhe dará prazer”.

Provérbios 2:1-10

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. DOURADO	13
2.2. FARINHA DE PEIXE E AS FONTES PROTEICAS SUBSTITUTAS PARA AQUICULTURA	18
2.3. HIDROLISADOS PROTEICOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. HIDROLISADOS PROTEICOS	27
3.2. DIGESTIBILIDADE DE HIDROLISADOS PROTEICOS	29
3.2.1. Dietas experimentais.....	29
3.2.2. Estrutura e procedimentos de coleta	30
3.2.3. Ensaio enzimático	32
3.2.4. Análises estatísticas	33
3.3. NÍVEIS DE INCLUSÃO DE HIDROLISADOS DE FÍGADO SUÍNO NO DESEMPENHO DE DOURADOS	33
3.3.1. Dietas experimentais.....	33
3.3.2. Estrutura, animais e condições experimentais	35
3.3.3. Desempenho zootécnico.....	36
3.3.4. Análises hematológicas e imunológicas	37
3.3.5. Composição química.....	38
3.3.6. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. DIGESTIBILIDADE DE HIDROLISADOS PROTEICOS	39
4.2. DESEMPENHO DE DOURADOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE INCLUSÃO DE HIDROLISADOS DE FÍGADO SUÍNO	47
4.2.1. Desempenho produtivo	47
4.2.2. Condições hematológicas e imunológicas	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	79

RESUMO

Hidrolisados proteicos na alimentação de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*

A exigência de alimento proteico palatável e de alto valor nutricional torna a dieta dos peixes carnívoros altamente dependente de farinha de peixe [FP], alimento de alto custo e já escasso no mercado. Hidrolisados de subprodutos da indústria animal são alimentos de alta qualidade que podem ser usados para substituir a FP nas dietas para peixes. Este trabalho foi realizado em dois ensaios: o primeiro avaliou a digestibilidade de hidrolisados de resíduos de tilápia [RTI], cabeças de atum [CAT], fígados de suínos [FSU] e de aves [FAV] e a influência da inclusão dos hidrolisados nas dietas no perfil de enzimas digestivas nos estômagos, cecos pilóricos e intestinos de juvenis ($39,73 \pm 5,30$ g) do Characiforme carnívoro dourado, *Salminus brasiliensis*; o segundo ensaio avaliou o desempenho de juvenis de dourados ($4,57 \pm 1,25$ g) alimentados com níveis crescentes de inclusão de FSU (0, 70, 140, 210 e 280 g kg⁻¹) na dieta. A inclusão dos hidrolisados na formulação das dietas diminuiu o pH das rações mas não interferiu no consumo pelos peixes. Os maiores coeficientes de digestibilidades dos nutrientes foram registrados em peixes alimentados com as dietas contendo RTI e FSU, enquanto os menores foram encontrados para aqueles alimentados com as dietas contendo CAT. A atividade da protease e da lipase foi maior nos estômagos dos animais, em especial aqueles que foram alimentados com a dieta contendo FSU. A atividade de amilase foi maior nos cecos pilóricos, enquanto nos intestinos foi registrada maior atividade nas dietas controle e RTI. Hidrolisados de subprodutos da indústria animal foram altamente digestíveis para dourados e o perfil enzimático dos peixes foi dependente dos nutrientes da dieta. No segundo ensaio os menores valores de ingestão diária foram registrados nos peixes alimentados com a dieta sem inclusão de hidrolisado, mas os menores valores de ganho de peso, peso final e das taxas de crescimento específico, de eficiência proteica e energética, e de retenção proteica foram registrados nos peixes alimentados com a dieta contendo 280 g kg⁻¹ de hidrolisado suíno. A grande proporção de aminoácidos livres e pequenos peptídeos nas dietas com inclusões acima de 140 g kg⁻¹ do produto aparentemente reduziu a síntese de proteínas dos animais. A saúde dos peixes não foi afetada significativamente pela inclusão de hidrolisados na dieta, porém, aparentemente, os peixes alimentados com dietas contendo até 140 g kg⁻¹ de hidrolisado tiveram melhores índices imuno-hematológicos.

Palavras-chave: Subprodutos de aves; Subprodutos de peixes; Tilápia; Suíno; Atum

ABSTRACT

Protein hydrolysates in diets for juvenile dourado, *Salminus brasiliensis*

Carnivorous fish diets strongly depend on fish meal (FM), a high-cost, scarce feedstuff, given the need for palatable protein and high nutritious value. Animal by-product hydrolysates are high-quality feedstuff that can substitute FM in fish diets. This study evaluated digestibility of hydrolysates from tilapia residue [TR], tuna head [TH], swine liver [SL] and poultry liver [PL], and the profile of digestive enzymes in the stomachs, pyloric cecum and intestines of juvenile ($39,73 \pm 5,30$ g) dourado, *Salminus brasiliensis*, a carnivorous Characin fed diets containing graded levels of hydrolysates, and the performance of juvenile dourado ($4,57 \pm 1,25$ g) fed diets containing increasing levels of FSU (0, 70, 140, 210 and 280 g kg^{-1}). The addition of hydrolysates to diets lowered the pH of feed, but did not alter feed intake by fish. Higher digestibility coefficients of nutrients were recorded for fish fed diets containing TR and SL, and the lower for those fed diets containing TH. Protease and lipase activity in the fish's stomach was higher, especially for those fed diets containing SL. Amylase activity was higher in pyloric caeca, while in the intestines the higher activity was registered for fish fed control and TR diets. Animal by-product hydrolysates were highly digestible for dourado, and enzymatic profile of fish depended on nutrients of diets. In the second trial, the lowest values of daily intake were recorded for fish fed diet without inclusion of hydrolysate. However, the lowest weight gain, final weight and specific growth rate, protein and energy efficiency, and protein retention rates were recorded for fish fed diet with 280 g kg^{-1} of swine hydrolysate. The large proportion of free amino acids and small peptides in the diets with inclusions above 140 g kg^{-1} of the product apparently reduced the protein synthesis by fish. Health status of fish was not significantly affected by dietary hydrolysates, but apparently, fish fed diets containing more than 140 g kg^{-1} had better immuno-hematological indices.

Keywords: poultry by-product; fish by-product; tilapia; swine; tuna

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da produção de hidrolisados	21
Figura 2. Fluxograma da produção dos hidrolisados proteicos.....	28
Figura 3. Atividade de protease inespecífica no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de <i>S. brasiliensis</i> alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves.....	40
Figura 4. Atividade de lipase inespecífica no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de <i>S. brasiliensis</i> alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves.....	41
Figura 5. Atividade de amilase inespecífica no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de <i>S. brasiliensis</i> alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves.....	42
Figura 6. Dourados que morreram por canibalismo: (A) Animal parcialmente dilacerado (B) Cabeça de indivíduo consumido	49
Figura 7. Regressão polinomial do ganho de peso médio de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno.....	50
Figura 8. Regressão linear da conversão alimentar aparente [CAA] de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno	51
Figura 9. Regressão linear das taxas de eficiência proteica e energética (TEP e TEE) de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de digestibilidade aparente de alguns alimentos utilizados na nutrição de dourados (<i>Salminus brasiliensis</i>)	16
Tabela 2. Composição química e aminoacídica dos hidrolisados proteicos utilizados no ensaio de digestibilidade.	28
Tabela 3. Formulação e composição química das dietas experimentais utilizadas no ensaio de digestibilidade aparente de hidrolisados para dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>). 29	
Tabela 4. Formulação das dietas experimentais basais: com farinha de peixe (A) e; com hidrolisado de fígado suíno (B); e proporções das dietas basais nas dietas com níveis crescentes de HFS.	33
Tabela 5. Composição química das dietas experimentais (com base na matéria seca) com níveis crescentes de HFS utilizadas no ensaio do desempenho de dourados.	34
Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente [ADCs] de nutrientes e energia da dieta controle e hidrolisados para o dourado	39
Tabela 7. Desempenho e utilização do alimento pelo dourado alimentado com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.	48
Tabela 8. Composição química na matéria natural da carcaça de dourados alimentados com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.....	54
Tabela 9. Hematologia e imunologia em dourado alimentado com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.	56

1. INTRODUÇÃO

Embora o consumo anual mundial de pescado tenha aumentado em aproximadamente $16,5 \times 10^6$ t entre os anos de 2006 e 2010, a pesca extrativa está estagnada em aproximadamente 90×10^6 t desde a década de 1990. Como consequência, a aquicultura mais que duplicou a produção entre os anos 2000 e 2014, passando de 32,4 para 73,8 milhões de toneladas. Porém, além de suprir o déficit, a aquicultura também terá que suprir anualmente um adicional de 29×10^6 t de pescado para manter os níveis atuais de consumo até 2030 (Browdy et al., 2012; FAO, 2016, 2014, 2012).

Dentre os organismos utilizados na aquicultura mundial, os peixes de água doce dominam o setor contribuindo com aproximadamente 56,4% do pescado produzido. Os ciprinídeos (carpas) têm dominado a produção com aproximadamente 71,9% do total, seguido pelos cicliformes - principalmente tilápias (10,4 %), e salmonídeos (7,1 %). A produção de peixes carnívoros, apesar do menor volume, contribui com valores expressivos em termos da geração de receita. O salmão do Atlântico (*Salmo salar*), por exemplo, liderou as estatísticas com valor aproximado do desembarque de US\$ 6,4 bilhões em 2009, mas a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), com produção aproximadamente três vezes superior em tonelagem, ocupou a segunda colocação em geração de receita com US\$ 5,2 bilhões (FAO, 2012, 2014; Lopera-Barreto et al., 2011).

O Brasil é o 14º maior produtor de pescado em aquicultura correspondendo por 0,56% da produção mundial. A produção aquícola continental brasileira teve aumento de 40% entre os anos de 2008 e 2010 e, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2013 a produção total em aquicultura foi de aproximadamente 392×10^3 t. Os últimos dados estatísticos da FAO descrevem aumento da produção total no ano de 2014 para $562,5 \times 10^3$ t, das quais $474,3 \times 10^3$ t são referentes à aquicultura continental. Mesmo assim a balança comercial de pescado apresentou déficit de aproximadamente 247×10^3 t em 2010, um acréscimo de 21,8% em relação ao ano anterior (FAO, 2012, 2014, 2016; IBGE, 2013; MPA, 2012). O crescimento significativo da aquicultura no Brasil deve-se principalmente à criação de peixes de água doce, principalmente tilápias, que fez com que a produção de rações para piscicultura passasse de 161×10^3 t em 2005 para 835×10^3 t previstas para 2015, crescimento de aproximadamente 419% em 10 anos (SINDIRAÇÕES, 2010).

A alimentação na aquicultura pode representar entre 40 e 70% dos custos de uma produção intensiva (Lovell, 1998; Scorvo-Filho et al., 2010). Os métodos utilizados para mitigar os custos decorrentes da alimentação são bastante variados como, por exemplo,

adequação de manejo ou substituição de alimentos de acordo com a disponibilidade e preço (Hilbig et al., 2012; Kokou et al., 2015; Sun et al., 2016; Velasquez et al., 2016). A prática mais comum é a substituição parcial ou total da farinha de peixe [FP] por fontes proteicas animais e vegetais em dietas balanceadas. Essa prática normalmente envolve práticas para melhorar o valor biológico da proteína dietética, o que inclui completar a formulação com um ou mais aminoácidos essenciais limitantes, combinar diferentes alimentos para fornecer o perfil de aminoácidos necessários, e o processamento de proteínas vegetais para remover fatores antinutricionais (Seneriches e Chiu, 1988). Desta forma, a farinha e o óleo de peixe são e serão cada vez mais utilizados apenas como ingredientes estratégicos em menores níveis e para fases específicas de produção como, por exemplo, na fase de alevinagem. No entanto, a sua substituição depende de fontes, processos e tecnologias adequadas, pois além de afetar o desempenho produtivo podem afetar também a saúde dos peixes confinados (FAO, 2014).

Uma das linhas de pesquisa em rações para aquicultura é a substituição da FP por proteínas oriundas de subprodutos animais submetidos a tratamentos de autólise ou hidrólise (Bui et al., 2014; Cardoso et al., 2004; Fries et al., 2011; Gildberg et al., 1995; Hevroy et al., 2005; Lewandowski et al., 2013; Nguyen et al., 2012; Srichanun et al., 2014). Entretanto, para otimizar o desempenho zootécnico em condições adequadas de saúde os produtos, assim como os níveis adequados de inclusão nas dietas, precisam ser estabelecidos de forma espécie-específica e considerando a fase de cultivo.

Estas dúvidas e a oportunidade de contribuir com desenvolvimento da cadeia produtiva da aquicultura brasileira motivaram o desenvolvimento desse projeto que, dentre outros benefícios, pode auxiliar no melhoramento da qualidade do pescado, aumento da produção, redução de custos e desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa na piscicultura continental.

Este trabalho avaliou a digestibilidade dos hidrolisados de fígados de suíno e de aves e de resíduos de tilápia e de atum e os seus efeitos sob as atividades enzimáticas gastrointestinais de juvenis de dourado *Salminus brasiliensi*. E, num segundo ensaio, foi avaliado o desempenho e a saúde de juvenis de dourados alimentados com dietas contendo diferentes níveis do hidrolisado mais digestível e com matéria-prima mais disponível em substituição à farinha de peixe.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dourado

A produção brasileira de aquicultura é, na sua maior parte, decorrente da produção de teleósteos de água doce, enquanto a produção marinha é praticamente nula (FAO, 2014). A maioria dos peixes produzidos no Brasil é de hábito alimentar onívoro com destaque para as tilápias (*Oreochromis* spp.), espécies exóticas que representam 43,1% da produção nacional. Dentre as espécies nativas destacam-se os peixes redondos, e.g., tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e, ainda, os híbridos das duas espécies – tambacu, patinga e tambatinga, que representam 41,5 % de toda produção nacional. Os principais peixes carnívoros produzidos no Brasil são os surubins do gênero *Pseudoplatystoma* spp. (Siluriformes) e seus híbridos, porém, pode-se destacar ainda a criação de dourados *Salminus* sp., matrinxãs *Brycon cephalus*, tucunarés *Cicla* sp., traíras *Hoplias* sp. e pirarucu *Arapaima gigas* (IBGE, 2013).

O conhecimento do potencial das espécies nativas brasileiras é antigo, porém, pouco explorado (Borghetti e Ostrensky, 2002; Cyrino et al., 2012; Lovshin e Cyrino, 1998). O crescimento da produção de espécies nativas é recente e sua ascensão datada no final da década de 1990, a partir da explosão da indústria da pesca esportiva (Cyrino e Fracalossi, 2012). Nos últimos anos, além do potencial para exploração na pesca esportiva, outras qualidades dessas espécies têm sido apreciadas, e.g. qualidade de carcaça, aceitação pelo consumidor e preço de mercado (Weingartner e Zaniboni-Filho, 2013).

Conhecido como príncipe dos rios e melhor peixe nativo para pesca desportiva de água doce devido a sua agressividade e aspecto majestoso, o dourado é representado por algumas espécies do gênero *Salminus* sp. e a caracterização sistemática ainda é bastante confusa (Géry e Lauzanne, 1990; Lima e Britski, 2007; Weingartner e Zaniboni-Filho, 2013). A denominação do gênero se deve a Agassiz quando, no ano de 1829, em sua obra “Selecta Genera et Species Piscium Brasiliensium” dividiu o gênero *Hydrocyon* Cuvier em três gêneros – *Hydrocyon*, *Xiphorynchus* e *Salminus*. Porém, alguns autores, e.g. Günther (1964), atribuíram a denominação a Müller e Troschel devido à classificação apresentada na obra “Horae ichthyologicae” no ano de 1845 (De Plaza, 1950; Günther, 1864; Müller e Troschel, 1845; Spix e Martius, 1929). O primeiro fóssil encontrado desse gênero fora localizado na região centro-leste da Argentina e foi datado da fase tortoniana do mioceno (Cione et al., 2013).

Geralmente o gênero é considerado um caracídeo de médio a grande porte que ocorre nas bacias cisandinas sul-americanas do Amazonas, La Plata e São Francisco, rio Magdalena e em outros rios de drenagem transandina sul-americana (Eigenmann, 1916; Lima e Britski, 2007). Atualmente são conhecidas quatro espécies para o gênero *Salminus*: *S. affinis* (Steindachner, 1880), *S. hilarii* (Valenciennes, 1850), *S. franciscanus* (Lima e Britsky, 2007) e *S. brasiliensis* (Cuvier, 1816), a qual é considerada com maior potencial para criação e a que possui maior número de trabalhos relacionados ao desenvolvimento de seu sistema de produção (Weingartner e Zaniboni-Filho, 2013). Alguns trabalhos relativos a esta espécie são encontrados com as nomenclaturas *S. cuvieri* (Valenciennes, 1850), *S. maxillosus* (Valenciennes, 1850) e *S. orbignyanus* (Valenciennes, 1850) que, posteriormente, foram reconhecidas por Géry e Lauzanne como sinônimas de *S. brasiliensis* (Cuvier, 1816) (Géry e Lauzanne, 1990). Ainda com o binômio *S. maxillosus* a espécie *S. brasiliensis* é citada por Fuster de Plaza no ano de 1950 como a única do gênero presente no rio Amazonas, rio Grande do Sul, rio Paraguai, rio Paraná, rio Tietê, rio Uruguai e rio da Prata (De Plaza, 1950). Atualmente a distribuição geográfica aceita dessa espécie é nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, no sistema lagunar da Lagoa dos Patos e nos rios bolivianos Mamoré e alto do Chaparé (Froese e Pauly, 2016).

O dourado *S. brasiliensis* é um peixe com coloração amarelo-dourado e nadadeiras alaranjadas, de hábito alimentar carnívoro com predominância a piscivoria e com cavidade bucofaringeana anatomicamente adaptada à predação (Rodrigues e Menin, 2006), um exímio nadador que habita águas com correntezas sendo capaz de subir cachoeiras com grande facilidade (Britski et al., 1999; Moraes Filho e Shubart, 1955). É um peixe reofílico com período reprodutivo dependente de fatores ambientais como temperatura, nível do rio e fotoperíodo e, portanto, a reprodução varia conforme a região, podendo ocorrer entre os meses de outubro e janeiro. As fêmeas adultas são significativamente maiores que os machos podendo atingir até 1,16 m de comprimento e 30 kg de peso, enquanto os machos habitualmente não passam de 92 cm (Agostinho et al., 2003; Moraes Filho e Shubart, 1955; Weingartner e Zaniboni-Filho, 2013). A reprodução artificial já é bem conhecida, após cinco dias da eclosão as larvas já aceitam alimentação exógena e após mais dois dias consomem alimento artificial, porém, os relatos de canibalismo são frequentes. Dentre as principais fontes alimentares para as fases iniciais no ambiente natural podemos destacar as larvas de outros peixes (e.g. *Prochilodus lineatus*) e de insetos (cladóceras, copépodos e insetos adultos). Em laboratório é muito comum a incidência de canibalismo, principalmente quando

não são fornecidas espécies forrageiras suficientes (Ribeiro e Nuñez, 2008; Vega-Orellana et al., 2006).

Dentre as características positivas para a criação do dourado pode se destacar carne com propriedades organolépticas adequadas, rápido desenvolvimento inicial, bom preço de mercado, fácil adaptação ao manejo e à alimentação artificial em sistema intensivo de produção, e estoques naturais ameaçados de extinção (Flora et al., 2010; Weingartner e Zaniboni-Filho, 2013). Apesar das características zootécnicas favoráveis à produção em confinamento, as pesquisas sobre nutrição do dourado são bastante reduzidas. O trabalho pioneiro com esta espécie foi realizado no ano de 1990 por Borguetti e colaboradores, os quais relataram uma relação direta entre o teor de proteína na ração e crescimento em juvenis alimentados com níveis crescentes de proteína bruta (300, 350 e 400 g kg⁻¹), porém, não foi determinado o nível adequado para a espécie (Borghetti et al., 1990). Novas pesquisas com esta espécie foram acontecer somente dez anos depois quando foram avaliados diferentes organismos vivos na alimentação de pós-larvas (Luz et al., 2000).

No ano de 2003 foram avaliados diferentes tipos de alimentos e a influência do fotoperíodo para a alimentação da espécie e em 2006 foi estudado o desenvolvimento ontogenético de proteinases digestórias e a transição alimentar (Schutz, 2003; Vega-Orellana et al., 2006). O trânsito gastrointestinal da digesta foi avaliado no ano de 2007 quando Braga e colaboradores verificaram que a partir da segunda hora depois da alimentação ocorre redução gradativa do conteúdo estomacal e após 18 horas todo o trato gastrointestinal se exauri completamente (Braga et al., 2007). A partir do ano de 2008 os trabalhos realizados com o dourado foram mais direcionados para ensaio de digestibilidade de ingredientes e níveis de substituição de farinha de peixe na dieta (Braga et al., 2008; Corrêa, 2016; Moro et al., 2015) (Tabela 1)

Tabela 1. Coeficientes de digestibilidade aparente de alguns alimentos utilizados na nutrição de dourados *Salminus brasiliensis*

Ingrediente	Processamento da ração	Peso médio (g)	Coeficiente de digestibilidade aparente ¹ (%)						Bibliografia
			MS ¹	PB ²	EE ³	Energia	AA ⁴	Amido	
Farinha de peixe	Peletizada	33,51±01,40	-	94,67	-	93,86	-	-	(Braga et al., 2008)
	Extrudada	19,50±05,00	83,90	94,30	97,40	91,00	93,60	-	(Borghesi et al., 2009)
Farinha de carne e ossos	Peletizada	33,51±01,40	-	88,15	-	91,80	-	-	(Braga et al., 2008)
Farinha de sangue ⁵	Peletizada	33,51±01,40	-	96,28	-	94,07	-	-	(Braga et al., 2008)
Farinha de vísceras de aves	Peletizada	33,51±01,40	-	89,08	-	95,33	-	-	(Braga et al., 2008)
	Extrudada	19,50±05,00	80,30	91,30	96,70	90,30	89,95	-	(Borghesi et al., 2009)
Farelo de glúten de milho	Peletizada	33,51±01,40	-	96,93	-	95,73	-	-	(Braga et al., 2008)
	Extrudada	19,50±05,00	84,60	93,50	91,50	88,80	92,45	-	(Borghesi et al., 2009)
Farelo de soja	Peletizada	33,51±01,40	-	94,51	-	85,00	-	-	(Braga et al., 2008)
	Extrudada	19,50±05,00	84,30	93,60	93,30	87,80	92,07	-	(Borghesi et al., 2009)
Farelo de milho	Peletizada	33,51±01,40	-	89,65	-	80,84	-	-	(Braga et al., 2008)
	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	27,30	-	43,69	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	91,07	-	74,75	(Moro et al., 2015)
Farelo de trigo	Peletizada	33,51±01,40	-	88,24	-	77,02	-	-	(Braga et al., 2008)
	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	56,02	-	71,85	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	91,07	-	75,03	(Moro et al., 2015)
CP ⁶ soja	Extrudada	16,00±00,20	-	82,60	-	66,6	-	-	(Corrêa, 2016)
Quirera de arroz	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	52,82	-	76,58	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	81,07	-	82,12	(Moro et al., 2015)
Farinha de mandioca tostada	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	64,67	-	85,25	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	68,78	-	85,57	(Moro et al., 2015)
Amido de mandioca	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	25,98	-	41,18	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	98,14	-	83,00	(Moro et al., 2015)
Amido de milho	Peletizada	73,97±12,00	-	-	-	22,77	-	60,33	(Moro et al., 2015)
	Extrudada	73,97±12,00	-	-	-	50,92	-	66,35	(Moro et al., 2015)

¹Matéria seca, ²Proteína bruta, ³Extrato etéreo, ⁴Aminoácidos, ⁵'Spray-dry', ⁶Concentrado proteico

O primeiro estudo onde foi avaliado nível ideal de nutrientes para o dourado foi publicado em 2009 por Borghesi e colaboradores e contemplava ensaios com juvenis de dourados ($5,29 \pm 0,21$ g) alimentados por 60 dias com dietas contendo níveis de proteína bruta entre 350 e 510 g kg⁻¹ (incremento de 4%) e teores de energia bruta de 17,58 a 20,93 MJ kg⁻¹ (incremento de 0,84 MJ kg⁻¹). Neste trabalho os autores concluíram que as exigências para essa fase de crescimento são de 450,8 g kg⁻¹ para PB e 19,26 MJ kg⁻¹ para EB, definindo ainda uma relação energia:proteína entre 42,74 e 44,62 MJ kg⁻¹ como ideal para o ótimo desempenho e retenção de nutrientes e energia. No ano seguinte a exigência em PB (45,4 g kg⁻¹) foi corroborada para peixes de tamanho semelhante ($5,68 \pm 0,47$ g) enquanto que para peixes menores ($0,75 \pm 0,01$ g) a exigência para o melhor ganho em peso foi de 576,0 g kg⁻¹ de PB na dieta (Teixeira et al., 2010).

Em seguida, Dairiki et al. (2013) determinaram exigências de 21,5 e 14,8 g kg⁻¹ de lisina [LD] e arginina [AD] dietéticas, ou 50,0 e 34,3 g kg⁻¹ desses aminoácidos na proteína dietética, respectivamente, para que juvenis de dourado possam expressar melhores pesos finais, ganhos de pesos e taxas de crescimento específico. A melhor taxa de conversão alimentar foi obtida com 25,0 g kg⁻¹ de LD ou 58,0 g kg⁻¹ de lisina, na proteína dietética, e com 14,0 g kg⁻¹ de AD ou 32,5 g kg⁻¹ de arginina na proteína dietética.

Donadelli em 2014 avaliou o desempenho de juvenis de dourados ($12,00 \pm 0,58$ g) alimentados por 66 dias com dietas contendo níveis crescentes de vísceras de aves (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 g kg⁻¹) em substituição à farinha de peixe e não registrou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos, porém, observou que a maximização do lucro ocorre quando 332,9 g kg⁻¹ da farinha de peixe é substituída por vísceras de aves. Moro et al. (2015) registraram que o processo de extrusão melhora significativamente a digestibilidade da energia e do amido da farinha de trigo, do amido de mandioca, do milho, e dos amidos de arroz e milho, mas não afeta a digestibilidade de farinha de mandioca tostada para o dourado. No mesmo ano e a partir de um ensaio dose-resposta, Yamamoto (2015) determinou que não ocorre influência da vitamina E no ganho de peso, porém, observou aumento da concentração de globulinas totais no soro após infecção por *Aeromonas hydrophila*, concluindo que a dose ótima de vitamina E na dieta de juvenis de dourados ($20,04 \pm 0,09$ g) é de 151,07 mg kg⁻¹.

No ano de 2016, Moro e colaboradores concluíram que o dourado não utiliza bem os carboidratos da dieta e, por consequência, o uso de menores quantidades ou fontes menos digestíveis de carboidrato pode resultar em melhor crescimento durante a produção comercial da espécie. Também, no mesmo ano Corrêa concluiu que é possível substituir até 372 g kg⁻¹

da FP por concentrado proteico de soja [CPS] nas dietas do dourado e que níveis crescentes de CPS na dieta exercem efeito regulatório sobre a atividade de enzimas pancreáticas nos primeiros segmentos do intestino da espécie. Da Cruz e colaboradores (2016) concluíram que a inclusão de até 200 g kg⁻¹ de colostro bovino liofilizado na dieta de dourado não influenciam significativamente nas características histológicas dos enterócitos.

2.2. Farinha de peixe e as fontes proteicas substitutas para aquicultura

A dependência de alimento proteico de alta digestibilidade faz da formulação de rações balanceadas para espécies carnívoras um desafio de alto custo com grande dependência da farinha de peixe (Pereira e Oliva-Teles, 2003). A farinha de peixe [FP] contém entre 600 e 720 g de proteína por kg, 100-200 g kg⁻¹ de matéria mineral e 50-120 g kg⁻¹ de gordura (Shepherd e Jackson, 2013). É reconhecidamente a melhor fonte de proteína para a maioria das espécies de peixes e aproximadamente 73% da produção de farinha de peixe do ano de 2010 foi utilizada na aquicultura, dos quais aproximadamente 25% foram utilizados na alimentação de salmonídeos e 25% na nutrição de peixes marinhos carnívoros (IFFO, 2013; Oliva-teles et al., 2015; Shepherd e Jackson, 2013).

A preferência por FP decorre principalmente do elevado teor de proteína de alta digestibilidade e valor biológico, atratividade e adequado perfil de aminoácidos e ácidos graxos; é ainda uma rica fonte de taurina, minerais (incluindo o fósforo) e vitaminas (incluindo a colina) e, para alguns autores é considerada indispensável em formulações de dietas nutricionalmente completas, particularmente para peixes carnívoros (Borghesi, 2008; Espe et al., 2006; Hardy, 2010; Oliva-teles et al., 2015; Sales e Britz, 2003; Seneriches e Chiu, 1988).

A maior parte da FP é obtida do processamento do pescado obtido por captura e, embora muitas espécies sejam utilizadas para produção de farinha de peixe existe a preferência pelos peixes pelágicos como as anchovas (*Engraulis* sp.) que, além de proteína, apresentam uma grande proporção de óleo na carcaça, produto com alto valor de mercado. Nas últimas décadas, leis e gestões de capturas mais rigorosas e o aquecimento das águas do Oceano Pacífico (fenômeno El Niño) reduziram as capturas de anchovas e outras espécies normalmente utilizadas para obtenção da FP (Shepherd e Jackson, 2013) e, portanto, os volumes de farinha e óleo de peixe produzidos têm flutuado constantemente. A FP pode ser produzida a partir de peixes inteiros - 1kg de farinha de peixe resulta do processamento de 4,4 a 4,6 kg de peixes inteiros, restos de peixe ou outros subprodutos, como cabeças, caudas, ossos etc. A produção de farinha de peixe caiu 50% entre os anos de 1994 (30,2 x 10⁶ t – peso

vivo equivalente) e 2012; por outro lado, a produção em aquicultura teve um crescimento de 161% no mesmo período, atingindo $66,6 \times 10^6$ t em 2012 (FAO, 2014, 2012, 1995; Shepherd e Jackson, 2013).

Devido à grande demanda por FP e a estagnação da captura, a escassez do produto e o aumento dos preços se tornaram inevitáveis; consequentemente, o uso de farinha de peixe oriunda de subprodutos de abate tem aumentado a taxas entre 1 e 2% ao ano. A obtenção de FP a partir de resíduos pode afetar a composição e qualidade do produto final, pois como pode ter conteúdo proteico reduzido concomitante ao aumento de matéria mineral e de aminoácidos (tais como glicina, prolina e hidroxiprolina), a sua inclusão como ingrediente nos alimentos utilizados na aquicultura e pecuária pode ser afetada (FAO, 2014; Shepherd e Jackson, 2013).

Diante destas dificuldades, muitos esforços estão sendo realizados em todo o mundo com o objetivo de substituir parcial ou totalmente a farinha e o óleo de peixe nas composições de rações na aquicultura. O resultado desse esforço é refletido na redução da proporção do produto utilizado para produção de peixes - passou de 1,04 para 0,67 kg de FP por kg de peixe produzido entre os anos de 1995 e 2007. Se por um lado houve melhora na eficiência do processo de produção, por outro, o crescente aumento dessa atividade traz a necessidade de melhorar a eficiência dos processos para que a atividade seja considerada sustentável por muito tempo (FAO, 2014, 2012; Naylor et al., 2009).

Vários ingredientes têm sido estudados como possíveis substitutos da FP em rações para aquicultura como, por exemplo, o farelo de soja e as farinhas de carne e ossos, de penas, de sangue e de vísceras de aves (Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000a; Pastore et al., 2012; Pezzato et al., 2002; Ye et al., 2011; Yu et al., 2013). No entanto, a substituição completa ou o uso de baixos níveis de FP em rações para carnívoros pode reduzir o desempenho produtivo ou afetar a homeostase intestinal, os parâmetros imunológicos ou a resistência a doenças. Para tanto, alguns aspectos devem ser considerados ao se utilizar ingredientes alternativos: preço, teor de proteína, perfil de aminoácidos, digestibilidade, aminoácidos essenciais (EAA), fatores anti-nutricionais e palatabilidade. Ingredientes vegetais são as fontes proteicas alternativas mais abundantes para uso em aquicultura, porém, possuem uma alta variabilidade de conteúdo proteico com aminoácidos essenciais insuficientes e fatores anti-nutricionais que limitam seu uso nas formulações. Os ingredientes animais, por sua vez, não possuem fatores anti-nutricionais e são altamente palatáveis, porém, vísceras de aves, farinha de carne e farinha de carne e ossos têm altos níveis de matéria mineral e de gorduras saturadas, fatores que limitam seu uso em rações para aquicultura (Gatlin et al., 2007; Hardy, 2010; Oliva-teles et al., 2015).

2.3. Hidrolisados proteicos

Hidrolisado é o resultado do fracionamento da cadeia polipeptídica da proteína e pode ocorrer ou não por autólise, originando peptídeos menores e aminoácidos livres (Kristinsson e Rasco, 2000). As proteínas autolisadas são mais comumente denominadas silagem e originadas pela adição à matéria prima de ácidos minerais, orgânicos ou microrganismos produtores de ácido lático, por outro lado, os hidrolisados habitualmente são preparados com a adição de enzimas à fonte proteica (Borghesi, 2004).

O processo de autólise ocorre durante a estocagem, e quando não é bem executado pode resultar na oxidação de lipídeos e, principalmente, em peptídeos com sabor amargo que podem ocasionar a rejeição após a ingestão do alimento (Adler-Nissen, 1984; Dauksas et al., 2004; Hevroy et al., 2005; Srichanun et al., 2014). Por outro lado, a produção de hidrolisados pelo uso de enzimas industriais é considerada mais previsível, reproduzível e, possivelmente, mais suave na separação de compostos nitrogenados solúveis do que a autólise (Hevroy et al., 2005; Liaset et al., 2002). As enzimas possuem alta seletividade e evitam reações indesejáveis exercendo efeito em temperaturas relativamente baixas e podem ser utilizadas em baixas concentrações com fácil remoção do sistema de reações (Goosen et al., 2014; Oetterer, 1993).

Na hidrólise, a proteína é fragmentada a peptídeos de diferentes tamanhos (di, tri e polipeptídeos) e aminoácidos livres, os quais possuem características nutricionais características e podem exercer influência no sabor do alimento (Guadix et al., 2000; Kristinsson e Rasco, 2000; Zambonino Infante et al., 1997). Em geral, os hidrolisados proteicos, sobretudo os derivados de pescado, apresentam em sua composição níveis bastante altos de aminoácidos essenciais e de ácidos graxos de cadeia longa (C20 e C22) (Abowei e Ekubo, 2011; Furlan e Oetterer, 2002). Apesar de serem, em geral, nutricionalmente interessantes para o uso em dietas para organismos aquáticos, os valores nutricionais dos hidrolisados dependem, sobretudo, da fonte de proteína, do método hidrolítico e do grau de hidrólise (Kotzamanis et al., 2007). Um fluxograma dos processos necessários para obtenção de hidrolisados pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma geral da produção de hidrolisados (adaptado de Pasupuleti e Braun, 2008)

A importância da forma de obtenção do hidrolisado já foi relatada por vários autores como, por exemplo, Nguyen e colaboradores (2012), os quais realizaram um ensaio durante seis semanas em camarões *Penaeus vannamei*, alimentados com onze dietas isoproteicas (400 g kg⁻¹) distintas: uma dieta comercial; uma dieta contendo farinha de cabeça de atum [FCA] como a principal fonte de proteína (dieta controle), e nove dietas formuladas pela substituição de 50% de FCA por hidrolisado de proteína de peixe [FPH]. O FPH foi obtido por hidrólise de cabeça de atum durante 2, 3 ou 6 h e posterior centrifugação para separar proteína solúvel e sólida. As dietas foram formuladas com as proteínas solúveis, sólidas e misturadas nos diferentes tempos de hidrólise. As dietas suplementadas com proteínas solúveis, e insolúveis com duas horas de hidrólise, melhoraram significativamente a sobrevivência, o ganho de peso, a eficiência proteica e a conversão alimentar dos camarões. Por outro lado, a sobrevivência e o desempenho dos grupos alimentados com as dietas que continham a mistura de proteínas não foram significativamente diferentes ou foram inferiores às dietas controle e

comercial. Os autores registraram que a separação após a hidrólise tem efeito positivo sobre o desempenho zootécnico dos camarões (Nguyen et al., 2012).

A composição em aminoácidos dos alimentos pode ter um papel importante em várias atividades fisiológicas, afetando direta ou indiretamente a manutenção da vida. Portanto, os aminoácidos livres e as pequenas cadeias peptídicas presentes nos hidrolisados podem oferecer vantagens nutracêuticas ou como alimento funcional (Chalamaiah et al., 2012).

A quantidade e o tamanho dos peptídeos podem ter importante papel na regulação da atividade enzimática, sendo que altas quantidades de pequenos peptídeos já foram descritos como indutores da atividade de quimiotripsina e redução na produção de enzimas na borda em escova (Srichanun et al., 2014; Zambonino Infante et al., 1997). A alta quantidade de aminoácidos livres e a rápida absorção de aminoácidos essenciais através do intestino podem resultar no aumento do catabolismo de aminoácidos e no desbalanceamento na absorção dos aminoácidos, com consequente decréscimo da síntese proteica e do ritmo de crescimento (Espe e Lied, 1994; Ronnestad et al., 2000; Srichanun et al., 2014).

O peso molecular de dietas contendo hidrolisados pode impactar modestamente sobre as deformidades do esqueleto em larvas de sargos (*Diplodus sargus*) e acentuadamente sobre a proteômica do corpo das larvas. As proteínas podem estar envolvidas em diversos processos, tais como: a dinâmica do citoesqueleto, nos metabolismos de energia, carboidratos, lipoproteína, aminoácidos e de nucleotídeos, na degradação proteica, e no sinal de transdução (De Vareilles et al., 2012).

Os hidrolisados mais utilizados em aquicultura são oriundos de subprodutos de pescado e podem possuir características nutritivas e funcionais capazes de substituir ou complementar a FP nas dietas. Dentre as qualidades atribuídas aos hidrolisados destacam-se as propriedades biológicas, imunológicas e organolépticas tais como: excelente valor nutricional; compostos atóxicos; poder antioxidante, anti-hipertensivo e antimicrobiano; estimulação da imunidade não específica, com melhora na resistência a doenças e consequente aumento da sobrevivência; melhora na atividade enzimática intestinal; e alteração da expressão gênica espacial de um possível transportador de 'di' e 'tri' peptídeos. Em função das variadas qualidades, o uso de hidrolisados na dieta é proposto para diferentes fins, porém, na maioria das vezes tem sido utilizado como suplemento proteico, palatabilizante ou com função atrativa (Aguila et al., 2007; Bakke et al., 2010; Cahu et al., 1999; Goosen et al., 2014; Klompong et al., 2007; Kristinsson e Rasco, 2000; Nguyen et al., 2012).

Hidrolisados de pescados avaliados na nutrição de organismos aquáticos são oriundos de diferentes fontes proteicas como, por exemplo, farinha de peixe, krill, subprodutos de camarão e de tilápia, manto de lulas, cabeças de atum, e sardinha. Porém, outras fontes proteicas hidrolisadas também estão sendo avaliadas como possíveis substitutos da FP em rações como, por exemplo, bactérias lácticas, farelo de soja, vísceras de aves e fígados de suínos, de bovinos e de aves (Bui et al., 2014; Cardoso et al., 2004; Dieterich, 2014; Fries et al., 2011; Gildberg et al., 1995; Hevroy et al., 2005; Lewandowski et al., 2013; Nguyen et al., 2012; Srichanun et al., 2014).

A digestibilidade da proteína, a utilização do alimento e o desempenho de pargos vermelhos (*Pagrus major*) foram melhorados com a suplementação moderada de hidrolisado de krill e de camarão nas dietas. Da mesma forma, ocorreu a melhora do sistema imunológico e a resistência a doenças, particularmente em juvenis de pargos alimentados com hidrolisado de krill (Bui et al., 2014).

Ao avaliar níveis de substituição de FP por hidrolisado de soja [SPH] em juvenis de linguados estrelados (*Platichthys stellatus*), Song et al. (2014) relataram que dietas com níveis baixos a moderados (15-50%) de SPH melhoraram significativamente a conversão alimentar e aumentaram o ganho de peso, a taxa de crescimento específico, o consumo diário de ração e a taxa de eficiência proteica, enquanto a substituição completa resultou em baixo crescimento. O fator de condição foi melhorado em peixes alimentados com as dietas que continham entre 30-85% de substituição, enquanto índices hepatossomático, viscerossomático, intestinossomáticos foram significativamente reduzidos nos peixes alimentados com dietas contendo hidrolisados. A inclusão dietética de SPH (15-100%) elevou a atividade de superóxido dismutase sérica, mas somente as dietas 15-70% SPH elevaram significativamente a capacidade antioxidante total, e as dietas 15-85% SPH aumentaram significativamente a atividade de lisozima sérica. As dietas com baixos níveis de inclusão de SPH (15-30%) reduziram significativamente as atividades de aspartato aminotransferase sérica e alanina transaminase, enquanto que aquelas com níveis de inclusão de moderado para alto (50-100%) diminuíram significativamente o colesterol do soro, lipoproteínas de baixa densidade, colesterol e triglicerídeos. A inclusão de SPH não teve efeitos fortes sobre a pepsina, amilase, lipase ou atividade da fosfatase alcalina, mas as dietas com 15-70% de SPH elevaram significativamente a atividade de tripsina e as dietas com 50-100% elevaram a atividade de ATPase nos peixes. A composição de aminoácidos essenciais do músculo não teve alterações significativas com a substituição por SPH, enquanto que os teores de ácido aspártico, glutâmico, serina, glicina, e aminoácidos essenciais totais no músculo diminuíram

significativamente nos peixes alimentados com as dietas 85-100% de SPH. Avaliando todos os fatores, os autores concluíram que a substituição ideal seria de 38,32% de FP por SPH.

A taxa de crescimento e o peso final de juvenis de salmões do Atlântico (*Salmo salar*) alimentados com dietas em que 5% e 8% de FP foram substituídos por hidrolisado de peixe foram maiores que daqueles alimentados com as dietas nas quais não houve inclusão de hidrolisado. Porém, não foram relatadas diferenças relacionadas às dietas na sobrevivência, fator de condição, índice hepatossomático ou intestinosomático. Autores concluíram que o tratamento enzimático ao qual foi submetido o hidrolisado degradou as proteínas fornecendo peptídeos mais curtos e aminoácidos livres que aumentaram a atratividade, o consumo, a digestibilidade e o crescimento dos juvenis (Berge e Storebakken, 1996).

Em trabalho realizado por Gildberg e colaboradores (1995), juvenis de salmões do Atlântico foram alimentados com ração comercial suplementada com 100 g kg⁻¹ de três fontes proteicas: músculo de bacalhau (A); músculo de bacalhau hidrolisado (B); hidrolisado de cultura de bactéria de ácido láctico isolada do intestino de salmões (C). Os peixes cresceram bem e igualmente nas três dietas com taxa de crescimento específico de 2,5% dia⁻¹. Números baixos de bactérias intestinais foram detectados em peixes alimentados com as dietas A e B, enquanto uma considerável colonização do intestino por bactérias de ácido láctico foi obtida nos peixes alimentados com a dieta C. Após cinco semanas de alimentação os peixes foram infectados com *A. salmonicida* e após quatro semanas a mortandade acumulada registrada esteve entre 42 e 75% entre os diferentes tratamentos; não foi registrada diferença significativa no índice de sobrevivência, porém o grupo alimentado com a dieta contendo bactérias do ácido láctico apresentou mortandade mais elevada (Gildberg et al., 1995).

A farinha de peixe foi substituída por hidrolisado proteico de arenque em cinco níveis de inclusão (60, 120, 180, 240 e 300 g kg⁻¹) na criação de juvenis de salmões do Atlântico (174 ± 27 g) durante 68 dias. Os peixes alimentados com a inclusão média de hidrolisados (180 a 240 g kg⁻¹) mostraram tendência ao maior consumo de alimento que aqueles alimentados com níveis baixos e altos. A conversão alimentar piorou significativamente e a taxa de eficiência proteica diminuiu nos peixes alimentados com níveis de 300 g kg⁻¹ de suplementação, enquanto a taxa de crescimento específico foi menor que nos níveis médios de inclusão. As digestibilidades aparentes de proteína bruta, arginina, lisina, metionina e fenilalanina aumentaram significativamente com o aumento da inclusão de hidrolisado. Aminoácidos livres no plasma, amônia e uréia indicaram que os aminoácidos dos hidrolisados foram absorvidos anteriormente e não sincronizados, e podem ser mais propensos a ser catabolizados do que aqueles de proteína menos solubilizada. Porém, não foi

registrado impacto sobre a saúde dos peixes de acordo com os parâmetros hematológicos e clínicos (Hevroy et al., 2005).

Poucos trabalhos com hidrolisados têm sido realizados no Brasil. Dieterich (2014) avaliou efeitos em juvenis de pintado Real® (*Pseudoplatystoma* sp.) da suplementação de uma dieta controle com 200 g kg⁻¹ de hidrolisado de fígado suíno e de resíduo de tilápia, originados da hidrólise realizada por dois compostos enzimáticos - Alcalase® e Brauzin®. A inclusão de hidrolisado na dieta melhorou a conversão alimentar aparente e a taxa de eficiência proteica dos peixes, porém não alterou os parâmetros metabólicos, a composição centesimal e demais parâmetros zootécnicos dos peixes. A influência de diferentes hidrolisados cárneos (fígado suíno, carcaças de tilápia e sardinha) na alimentação de juvenis de surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) foi estudada por Lewandowski et al. (2013) que concluíram que as dietas influenciaram o peso e comprimento finais, bem como a conversão alimentar aparente, porém, não alteraram a composição da carcaça. Em 2011, Fries e colaboradores avaliaram a inclusão de 30 g kg⁻¹ de hidrolisado de vísceras de aves, resíduos de peixe e fígado de frango em ração comercial para alimentação de kinguio (*Carassius auratus*) e não registraram influência no desempenho produtivo e nem na atratividade da ração. Em 2008, Borghesi e colaboradores avaliaram a digestibilidade aparente de proteína bruta e aminoácidos de silagem ácida de peixe [AS], biológica [BS] e enzimática [ES] em juvenis de tilápias (94,5 ± 12,7 g) e registraram níveis próximos a 90% para ambos parâmetros, dados que encorajam a substituição parcial em rações balanceadas para peixes neotropicais. Este é o primeiro trabalho a avaliar a utilização de hidrolisados proteicos em dietas para dourados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em dois ensaios executados no Laboratório de Nutrição de Peixes pertencente ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA e registrado sob o número de protocolo 2015-02 de 23 de março de 2015.

No primeiro experimento foram avaliadas as digestibilidades aparentes de hidrolisados proteicos de diferentes fontes animais – resíduo de filetagem de tilápia [RT], cabeças de atum [CA], fígado de aves [FA] e fígado de suíno [FS] – em juvenis de dourados *Salminus brasiliensis*.

No segundo ensaio foi avaliado o desempenho de dourados alimentados com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno em substituição à farinha de peixe.

3.1. Hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos foram adquiridos junto à empresa Falbom Agroindústria Ltda., localizada na cidade de Toledo, PR. Segundo a fornecedora, as matérias-primas foram adquiridas resfriadas de agroindústrias e, então, foram trituradas (5,0 mm) e homogeneizadas. Em reator industrial de aço inox encamisado (2.000 kg) a matéria-prima foi misturada com água (100:15, p:v) e enzima (Alcalase 2.4L[®], Novozymes Latino Americana Ltda., Araucária, PR; 1:200, p:p), e mantida sob agitação (60 min.) a temperatura (60 °C) e pH (6,5) constantes.

Ao término da hidrólise as enzimas foram inativadas termicamente a 85°C durante 15 minutos (Adler-Nissen, 1976) e, então, fez-se o ajuste do pH (3,0) com a adição de ácido fosfórico, com objetivo de conservação dos produtos. Os hidrolisados RT e CA passaram por processo de filtração em peneira de aço inox (1,0 mm) para a retirada dos ossos e espinhas. Aos produtos hidrolisados foram adicionados 10 g kg⁻¹ de produto veículo (informação proprietária) e, então, fez-se a secagem por sistema de atomização (“spray-dry”). O fluxograma de produção dos hidrolisados utilizados nos ensaios é apresentado na Figura 2 e as composições químico-bromatológicas e conteúdos em aminoácidos dos hidrolisados são apresentadas na Tabela 2.

Figura 2. Fluxograma da produção dos hidrolisados proteicos (adaptado de Batista, 2011).

Tabela 2. Composição química e aminoacídica¹ dos hidrolisados² proteicos utilizados no ensaio de digestibilidade.

Análises	Hidrolisado			
	Fígado suíno	Fígado Ave	Resíduos Tilápia	Cabeça de Atum
	----- g kg ⁻¹ -----			
Proteína	465,0	393,4	381,4	229,7
Matéria mineral	131,4	162,1	149,7	141,0
Energia bruta (MJ kg ⁻¹)	19,2	17,4	15,4	15,8
Lipídeos	66,3	58,7	13,1	25,3
Cálcio	0,9	0,9	2,4	2,1
Fósforo	3,7	4,8	3,5	4,0
	----- g kg ⁻¹ -----			
Arginina	16,1	15,8	21,4	11,8
Histidina	11,9	8,4	8,4	7,7
Isoleucina	20,4	19,2	16,6	9,3
Leucina	37,7	29,0	28,3	11,5
Lisina	29,0	24,7	30,4	13,9
Metionina	9,5	7,9	10,0	5,0
Fenilalanina	21,6	15,4	15,0	7,4
Treonina	19,3	14,6	16,6	9,0
Valina	24,9	22,7	17,5	10,3
Ácido aspártico	36,9	38,2	36,0	19,1
Ácido glutâmico	52,0	42,0	54,6	16,6
Alanina	27,1	20,4	28,8	14,1
Cistina	9,6	7,1	3,6	2,7

Análises	Hidrolisado			
	Fígado suíno	Fígado Ave	Resíduos Tilápia	Cabeça de Atum
Glicina	23,8	15,4	24,2	14,4
Prolina	19,8	14,2	16,8	9,6
Serina	19,7	11,8	14,0	4,9
Taurina	0,0	0,7	2,4	1,1
Tirosina	18,1	14,4	11,9	5,9
Aminoácidos totais	397,5	321,9	356,4	174,3

¹Base na matéria seca

²Falbm Agroindústria S.A., Toledo – PR

3.2. Digestibilidade de hidrolisados proteicos

3.2.1. Dietas experimentais

Foi formulada uma dieta prática, controle, para atender as exigências nutricionais do dourado de acordo com a literatura existente (Borghesi et al., 2008; Cyrino et al., 2012; Dairiki et al., 2013). Os ingredientes foram moídos (0,75 mm), pesados e homogeneizados, e a partir da substituição de 300 g kg⁻¹ do peso seco na dieta controle por cada um dos hidrolisados proteicos, foram obtidas quatro dietas experimentais às quais foi adicionado 1,0 g kg⁻¹ de óxido de cromo III (Cr₂O₃) como marcador inerte. As rações foram processadas em extrusora experimental (Imbramaq, Ribeirão Preto, SP), matriz de 2,5 mm, sob temperatura controlada (112~125 °C) e, então, foram secas em estufas com circulação forçada de ar (55°C), resfriadas, armazenadas em câmara fria (-10°C) e assim identificadas: controle [CON], hidrolisado de cabeças de atuns [CAT], hidrolisado de fígados de suínos [FSU], hidrolisado de fígados de aves [FAV] e hidrolisado de resíduos de tilápias [RTI] (Tabela 3).

Tabela 3. Formulação e composição química das dietas experimentais utilizadas no ensaio de digestibilidade aparente de hidrolisados para dourado (*Salminus brasiliensis*).

Ingredientes	Dietas				
	CON ¹	RTI ²	FSU ³	FAV ⁴	CAT ⁵
	----- (g kg ⁻¹) -----				
Soja, farelo-45	144,6	101,22	101,22	101,22	101,22
Milho, glúten-60	210,0	147,00	147,00	147,00	147,00
Peixe, farinha	402,7	281,89	281,89	281,89	281,89
Trigo, farelo	71,5	50,05	50,05	50,05	50,05
Soja, óleo	50,0	35,00	35,00	35,00	35,00
Amido	80,0	56,00	56,00	56,00	56,00
Celulose	30,0	21,00	21,00	21,00	21,00
BHT ⁷	0,2	0,14	0,14	0,14	0,14
Premix Vit/min ⁸	10,0	7,00	7,00	7,00	7,00
NaCl	1,0	0,70	0,70	0,70	0,70
Hidrolisado RTI ²	-	300,0	-	-	-

Ingredientes	Dietas				
	CON ¹	RTI ²	FSU ³	FAV ⁴	CAT ⁵
Hidrolisado FS ³	-	-	300,0	-	-
Hidrolisado FA ⁴	-	-	-	300,0	-
Hidrolisado CA ⁵	-	-	-	-	300,0
Composição química ⁶					
Matéria seca	941,8	942,3	946,1	944,2	934,7
Proteína bruta	477,8	438,5	468,9	445,3	398,4
Extrato etéreo	123,4	91,5	107,7	93,9	104,2
Fibra bruta	16,0	21,1	18,1	25,6	29,9
Matéria mineral	88,9	114,2	133,9	105,3	103,1
Energia bruta (MJkg ⁻¹)	19,6	18,2	19,4	18,8	18,3
Cr ₂ O ₃ (mg kg ⁻¹)	869,5	829,1	799,3	850,2	852,1
Aminoácidos	----- (g kg ⁻¹) -----				
Ácido aspártico	37,9	36,6	36,9	37,1	31,5
Ácido glutâmico	83,0	73,2	72,7	69,6	62,0
Alanina	37,0	33,9	33,5	31,5	29,5
Arginina	28,1	25,6	24,2	24,0	22,7
Cistina	4,0	3,8	5,5	3,1	2,5
Fenilalanina	22,5	19,9	21,8	20,0	17,6
Glicina	36,3	32,1	32,1	29,6	29,1
Histidina	11,1	10,1	11,1	10,1	9,8
Isoleucina	18,4	17,5	18,6	18,2	15,3
Leucina	50,9	43,4	46,2	43,6	38,4
Lisina	25,1	26,1	25,7	24,4	21,2
Metionina	11,6	10,9	10,8	10,3	9,4
Prolina	37,2	30,6	31,6	29,9	28,4
Serina	28,1	23,5	25,2	22,9	20,8
Taurina	1,3	1,6	0,9	1,1	1,2
Tirosina	17,6	15,6	17,4	16,3	13,8
Treonina	20,1	18,7	19,5	18,1	16,4
Valina	20,6	19,3	21,4	20,7	17,1
Aminoácidos totais	490,8	442,4	455,1	430,5	386,7

¹Controle; ²Resíduos de tilápia; ³Fígado de suíno; ⁴Fígado de ave;

⁵Cabeça de atum; ⁶Base na matéria seca

⁷Butil-hidroxi-tolueno

⁸Premix (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brazil) por kg do produto: Fe 15 000 mg; Cu 15 000 mg; Zn 12 500 mg; I 375 mg; Mn 12 500 mg; Se 87,5 mg; Co 125 mg; vitamina A 2 500 000 IU; vitamina D3 600 000 IU; vitamina E 37 500 IU; vitamina K 3 750 mg; vitamina C 50 000; vitamina B1 4 000 mg; vitamina B2 4 000 mg; vitamina B6 4 000 mg; vitamina B12 4 000 mg; pantothenic acid 12 000 mg; biotin 15 mg; folic acid 1 250 mg; niacina 22 500 mg; BHT 15 000 mg

3.2.2. Estrutura e procedimentos de coleta

Juvenis de dourado ($39,73 \pm 5,30$ g) foram alojados em cinco tanques cilíndrico-cônicos (200 L; 30 peixes/tanque) e adaptados às rações experimentais e ao manejo durante uma semana. Durante o ensaio, os peixes foram alimentados até a saciedade aparente em

quatro refeições diárias (08h30m; 11h30m; 14h30m; 17h30m) e, uma hora após a última refeição (18h30m), os tanques foram limpos e a água trocada completamente. As coletas de fezes foram realizadas por sedimentação durante 12 horas em recipiente de 200 mL acoplado ao fundo do tanque e imerso em gelo. As fezes foram centrifugadas (2 296 g, 10min), o precipitado congelado (-80°C) e liofilizado, e as impurezas (e.g., escamas) removidas manualmente com o auxílio de pinças e lupa. Os tratamentos foram aleatoriamente distribuídos e os peixes totalmente substituídos a cada repetição (n=3). O ensaio foi conduzido sob fotoperíodo controlado (12horas luz/escuro) e os tanques foram abastecidos com fluxo constante de água. A temperatura ($26,36 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$), o oxigênio dissolvido ($5,50 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$) e o pH ($7,38 \pm 0,06$) da água foram monitorados diariamente com o uso de sonda multiparâmetro Horiba U-50; a concentração de amônia total na água ($\leq 0,04 \text{ mg L}^{-1}$) foi avaliada semanalmente com o uso do kit Labcon Test para água doce.

As análises centesimais das dietas e fezes foram feitas segundo metodologia estabelecida pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, a 105°C até peso constante, a proteína bruta pelo método de Kjeldahl e a energia bruta por bomba calorimétrica. O extrato etéreo foi determinado por hidrólise ácida e o teor de fibra pelo método gravimétrico, em mufla a 555°C e incineração da matéria orgânica em bico de Bunsen. A quantificação do óxido de crômio foi feita por espectrometria de absorção atômica após digestão ácida. A análise de aminoácidos foi feita por cromatografia líquida (HPLC).

Para a aferição do pH das dietas, 20 g de amostra foi suspensa em 30 ml de água deionizada e agitada por barra magnética e agitador elétrico por 10 minutos e, imediatamente após, foi feita a leitura por meio de peagâmetro.

Os coeficientes de digestibilidade aparente [ADCs] para as dietas (eq.1) e ingredientes (eq. 2) foram calculados segundo as equações sugeridas por Cho e Slinger (1979) e Bureau e Hua (2006) e adaptadas por Fracalossi et al. (2012), como segue:

$$ADC = 100 \times \left(\frac{\%Indicador_{Dieta}}{\%Indicador_{Fezes}} \right) \times \left(\frac{N_{Fezes}}{N_{Dieta}} \right) \quad (1)$$

$$ADC_{Ing}(\%) = ADC(\%)_{Dt} + (ADC(\%)_{Dt} - ADC(\%)_{Ref}) \times \left(\frac{0,7 \times N_{Ref}}{0,3 \times N_{Ing}} \right) \quad (2)$$

Onde:

Dt = dieta teste;

Ref = dieta referência;

Ing = ingrediente;

N = nutriente (%) ou energia (MJ kg^{-1}) nas fezes, dietas teste e referência, ou ingrediente.

3.2.3. Ensaio enzimático

Após cada período de coleta de fezes, três peixes foram aleatoriamente retirados por tratamento, eutanasiados por superdosagem de anestésico (benzocaína; 1 g L^{-1}), pesados e laparatomizados para coleta de estômago, cecos pilóricos e porção anterior do intestino. As coletas foram realizadas sobre superfície gelada e os segmentos gastrointestinais foram congelados em nitrogênio líquido e conservados em ultra congelador (-80°C). Frações amostrais foram pesadas (100 mg) e homogeneizadas com solução tampão Tris-fosfato:glicerol (1:1, pH 7,0) na proporção de 70 mg mL^{-1} em homogeneizador IKA Ultra Turrax T10 Basic (1 150 g, 30 s). Após centrifugação (11 000 g, 5 min., 3°C) o sobrenadante do homogeneizado foi congelado para as análises enzimáticas.

O ensaio de atividade proteolítica inespecífica foi realizado pelo método de hidrólise da caseína, adaptado de Walter (1984), com duas soluções tampão: 0,2 M glicina-HCl em pH 2,0, para o estômago; 0,1 M Tris-HCl em pH 8,0, para cecos pilóricos e intestino. A solução composta por tampão, caseína 1,0% (substrato) e homogeneizado foi incubada por 1h 30 min a 25°C e a reação foi interrompida com ácido tricloroacético - TCA 20%. As soluções foram centrifugadas (11 000 g, 3 min.), o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria ótica (280 nm) e a unidade de atividade enzimática foi calculada com o uso da curva padrão da tirosina. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar $1,0 \mu\text{g}$ de tirosina em 1,0 minuto em $1,0 \text{ mg}$ de proteína (UI).

A atividade de lipase não específica foi determinada segundo a metodologia adaptada de Albro et al. (1985). A solução para reação foi preparada com homogeneizado, $0,4 \text{ mM}$ p-nitrofenilmiristato (substrato), tampão 24 mM de bicarbonato de amônio (pH 7,8) e 0,5% triton X-100. A incubação foi realizada por 45 minutos em 25°C e a reação foi interrompida com NaOH 25 mM . As amostras foram analisadas em espectrofotometria ótica (405 nm) e a unidade da atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar $1,0 \mu\text{mol}$ de substrato hidrolisado por minuto, expressa por mg de proteína (UI).

A α -amilase foi determinada com o uso do kit Amilase CNPG Liquiform 142 (Labtest, Lagoa Santa, MG), de acordo com o protocolo sugerido pela fornecedora, e as unidades de atividade enzimática foram expressas em U mg^{-1} proteína (UI).

Finalmente, a determinação do conteúdo de proteína nos homogeneizados foi feita de acordo com o método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina bovina ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) como padrão.

3.2.4. Análises estatísticas

A normalidade e a homogeneidade de variância foram aferidas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente, e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha = 0,05$) e teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). As correlações entre as variáveis foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson [r] ($\alpha = 0,05$). A intensidade da correlação foi avaliada para valores positivos e negativos de “r” de acordo com a seguinte escala:

Fraco: $|0,00|$ a $|0,30|$

Moderado: $|0,31|$ a $|0,59|$

Forte: $|0,60|$ a $|0,79|$

Muito forte: $|0,80|$ a $|1,00|$

3.3. Níveis de inclusão de hidrolisados de fígado suíno no desempenho de dourados

3.3.1. Dietas experimentais

Cinco dietas com níveis crescentes de inclusão (0, 70, 140, 210, 280 g kg^{-1}) de hidrolisado de fígado suíno foram obtidas a partir de duas dietas isoproteicas e isoenergéticas formuladas com a inclusão de 280 g kg^{-1} de farinha de peixe (Dieta A) ou de hidrolisado de fígado suíno (Dieta B) para atender as exigências nutricionais de dourados de acordo com literatura disponível (Borghesi, 2008; Dairiki, 2009) (Tabela 4).

Tabela 4. Formulação das dietas experimentais basais: com farinha de peixe (A) e; com hidrolisado de fígado suíno (B); e proporções das dietas basais nas dietas com níveis crescentes de HFS.

Ingrediente	Dietas basais	
	A	B
	-----g kg^{-1} -----	
Farinha de peixe	280,00	0,00
Hidrolisado FS ¹	0,00	280,00
Farelo de soja – 45	310,00	310,00
Glúten de milho - 60	131,00	180,00

Ingrediente	Dietas basais	
	A	B
Farelo de trigo	72,50	120,00
Óleo de soja	59,40	41,30
Amido	100,00	21,50
Celulose	6,40	1,40
Fosfato bicálcico	31,30	33,10
BHT ²	0,20	0,20
Premix ³	8,00	8,00
Nacl	1,00	1,00

	Dietas com níveis crescentes de inclusão de FS ¹				
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28
	-----g kg ⁻¹ -----				
Dieta A	1000,00	750,00	500,00	250,00	0,00
Dieta B	0,00	250,00	500,00	750,00	1000,00

¹Hidrolisado de fígado suíno

²Butil-hidroxi-tolueno

³Premix (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brazil) por kg do produto: Fe 15 000 mg; Cu 15 000 mg; Zn 12 500 mg; I 375 mg; Mn 12 500 mg; Se 87,5 mg; Co 125 mg; vitamina A 2 500 000 IU; vitamina D3 600 000 IU; vitamina E 37 500 IU; vitamina K 3 750 mg; vitamina C 50 000; vitamina B1 4 000 mg; vitamina B2 4 000 mg; vitamina B6 4 000 mg; vitamina B12 4 000 mg; pantothenic acid 12 000 mg; biotin 15 mg; folic acid 1 250 mg; niacina 22 500 mg; BHT 15 000 mg

As dietas foram processadas semelhantemente ao primeiro ensaio e rotuladas segundo a inclusão de HFS: 0 g kg⁻¹ [FS0], 70 g kg⁻¹ [FS7], 140 g kg⁻¹ [FS14], 210 g kg⁻¹ [FS21] e 280 g kg⁻¹ [FS28]. Amostras de cada ração foram analisadas em laboratório de referência (CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP) para aferição da composição química e pH (Tabela 5).

Tabela 5. Composição química das dietas experimentais (com base na matéria seca) com níveis crescentes de HFS, utilizadas no ensaio do desempenho de dourados.

Análises	Dietas				
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28
	-----g kg ⁻¹ -----				
Matéria seca	933,90	945,80	948,01	949,20	891,00
Proteína Bruta	450,90	448,20	442,10	438,30	445,60
Extrato Etéreo por Hidrólise Ácida	60,70	70,30	83,30	99,70	96,50
Fibra Bruta	23,90	22,20	16,80	17,40	27,50
Matéria Mineral	123,00	109,70	104,90	110,30	120,80
Energia Bruta (MJ kg ⁻¹)	20,07	20,00	20,47	20,29	19,94
Energia:Proteína (MJ kg ⁻¹)	44,54	44,66	46,34	46,34	44,79
pH	5,68	5,27	4,95	4,66	4,35
Aminoácidos	-----g kg ⁻¹ -----				
Arginina	26,90	26,10	24,00	23,20	23,00
Histidina	11,40	11,20	10,50	10,20	10,10
Isoleucina	18,70	18,80	18,00	17,80	18,20

Análises	Dietas				
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28
Leucina	42,80	43,90	43,90	44,20	46,90
Lisina	23,30	23,00	21,90	21,50	21,20
Metionina	8,20	8,00	7,30	7,30	7,30
Fenilalanina	21,10	21,60	21,20	21,50	22,60
Treonina	17,90	17,20	17,00	16,90	17,50
Valina	20,60	20,50	19,70	19,50	20,20
Triptofano	3,10	2,50	2,90	2,70	2,20
Ácido Aspártico	36,20	35,10	38,50	36,80	39,50
Ácido Glutâmico	78,90	76,70	76,70	76,20	80,00
Alanina	30,30	29,50	28,70	27,80	28,40
Cistina	5,00	5,10	5,00	4,80	5,90
Glicina	28,40	26,20	23,80	22,40	20,80
Prolina	30,30	29,90	29,50	29,70	30,60
Serina	23,90	23,50	23,20	23,40	24,50
Taurina	1,10	0,70	0,50	0,30	0,10
Tirosina	15,10	16,10	16,00	16,20	17,30
Soma dos Aminoácidos	443,20	435,60	428,50	422,50	436,30

3.3.2. Estrutura, animais e condições experimentais

Juvenis de dourados ($4,57 \pm 1,25$ g) foram distribuídos em 20 tanques de 300 L (15 peixes/tanque, $n=4$) alojados em sistema fechado de recirculação de água com controle de temperatura e de fotoperíodo (12 horas luz/escuro). A distribuição dos tratamentos – dietas – foi feita aleatoriamente e os peixes foram alimentados até a saciedade aparente por 61 dias em quatro refeições diárias (8h30m, 11h30m, 14h00m e 17h30m). Os tanques foram abastecidos em fluxo constante de água; a temperatura ($26,89 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$), o oxigênio dissolvido ($4,05 \pm 0,3$ mg L⁻¹) e o pH ($7,88 \pm 0,09$) da água foram monitorados diariamente com o uso de sonda multiparâmetro Horiba U-50; a concentração de amônia total ($\leq 0,04$ mg L⁻¹) foi avaliada semanalmente com o uso do kit Labcon Test para água doce.

Ao final do experimento, dois peixes por unidade experimental foram pesados individualmente e anestesiados (benzocaína: 0,1 g L⁻¹) para coleta de sangue e, então, foram eutanasiados (benzocaína; 1 g L⁻¹), congelados (-10°C) e destinados à análise de composição de carcaça (CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP). Dois peixes foram pesados individualmente, eutanasiados (benzocaína; 1 g L⁻¹) e laparatomizados; as vísceras foram retiradas e pesadas para cálculo de índice víscerosomático; o fígado foi retirado e pesado para cálculos de índice hepatossomático. Os peixes restantes foram pesados individualmente para estudo do desempenho zootécnico junto aos pesados anteriormente.

3.3.3. Desempenho zootécnico

O desempenho zootécnico foi avaliado segundo as seguintes variáveis (Fracalossi et al., 2012):

- Biomassa Final [BI]
 $BI(g) = \text{Peso total dos peixes da unidade}$

- Peso médio Final [PF]
 $PF(g) = \text{Biomassa final} / \text{Número de peixes}$

- Ganho de Peso [GP]
 $GP(g) = \text{Pesofinal} - \text{Peso inicial}$

- Conversão Alimentar Aparente [CAA]:
 $CAA = \text{Consumo de ração}(MS) / \text{Ganho de peso}$

- Taxa de Ingestão Diária [TID]
$$TID(\%) = \left(\frac{\text{Consumo (MS)}}{\frac{\text{Peso final} + \text{Peso inicial}}{\frac{2}{t}}} \right) \times 100$$

- Taxa de Eficiência Proteica [TEP]:
 $TEP(\%) = (\text{Ganho de peso} / \text{Proteína bruta consumida}) \times 100$

- Taxa de Eficiência Energética [TEE]:
 $TEE(\%) = (\text{Ganho de peso} / \text{Energia bruta consumida}) \times 100$

- Taxa de Crescimento Específico [TCE]:
 $TCE(\% \text{ dia}^{-1}) = 100 \times [(\ln \text{pesofinal} - \ln \text{peso inicial}) / \text{dias}]$

- Taxa de Retenção Proteica Aparente [TRP]
$$TRP = \left(\frac{(\text{Peso} \times \text{Proteína corporal final}) - (\text{Peso} \times \text{Proteína corp. inicial})}{\text{Ingestão total de proteína}} \right) \times 100$$

- Sobrevivência [SOB]:
 $SOB(\%) = 100 \times (\text{Número de peixes final} / \text{Número de peixes inicial})$

- Relação hepatossomática [HS]:
 $HS(\%) = 100 \times (\text{Peso do fígado} / \text{Peso corporal total})$

- Relação víscerosomática [VS]:
 $VS(\%) = 100 \times (\text{Peso das vísceras} / \text{Peso corporal total})$

3.3.4. Análises hematológicas e imunológicas

A coleta de sangue foi feita por meio de punção do vaso caudal ($\approx 1,0$ mL) em seringas heparinizadas (Hemofol, 5.000 U.I. mL⁻¹). A contagem do número de eritrócitos (Etc) foi realizada pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando sangue total (10 μ L) suspenso em tampão formol citrato na proporção de 1:200 (v:v). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina utilizando-se kit comercial (Analisa Diagnóstica[®], Belo Horizonte, Minas Gerais) para determinação colorimétrica, segundo Collier (1944). A porcentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971). Após leitura do hematócrito foi feita a aferição da proteína plasmática (PPT) com o uso de refratômetro manual de Goldberg e pela quebra do capilar de microhematócrito acima da camada de leucócitos. Os índices hematimétricos foram calculados conforme Wintrobe (1934):

- Volume corpuscular médio [VCM]:

$$VCM = (Htc \times 10) / Etc$$

- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média [CHCM]:

$$CHCM = (Hb \times 100) / Htc$$

O ensaio da atividade respiratória dos leucócitos (“burst”) foi realizado no dia da coleta de sangue de acordo com Anderson e Siwicki (1995). O sangue heparinizado (100 μ L) foi adicionado a 100 μ L de tampão fosfato-salino (PBS – “phosphate buffer saline” 0,01M, pH 7,4; Sigma Aldrich[®]) com 0,002 g mL⁻¹ de “nitroblue tetrazolium” (NBT, Sigma Aldrich[®]), e a solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, 50 μ L da suspensão foram adicionados a 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma Aldrich[®]) e, então, centrifugados (3 000 g, 5 min.). A absorbância da solução foi aferida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (UV-1800 Shimadzu[®]).

Para determinar a concentração de lisozima foi utilizado o método turbidimétrico descrito por Ellis (1990). O plasma do sangue foi separado por centrifugação (2 100 g, 10 min., 4°C) e mantido sob congelamento (-20 °C) até análise. Para o ensaio, as amostras foram submetidas a tratamento térmico em “banho maria” (56 °C, 30 min.) para inativação das proteínas do sistema complemento. Como referência, foi realizada uma reta padrão de lisozima (Sigma[®], referência L6876) com 10 diluições em tampão fosfato de sódio (PBS - NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4) de 0,5 a 5 ng μ L⁻¹, em intervalos de 0,5 ng μ L⁻¹. Em cada poço de

placa de Elisa foi adicionado 25 μL de amostra, 75 μL de PBS e 100 μL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698; Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em PBS (0,075%). Em leitor de placas (450 nm) foram feitas duas leituras imediatamente após o preenchimento da placa, uma inicial (DOI) e outra após 5 minutos de incubação (DO5). A diferença de densidade óptica ($\Delta\text{DO}=\text{DOI}-\text{DO5}$) foi utilizada na equação da reta padrão de lisozima e multiplicada por quatro para correção das diluições em PBS. A concentração de lisozima plasmática foi expressa em $\mu\text{g dL}^{-1}$.

3.3.5. Composição química

As amostras de dietas e carcaças de peixes foram analisadas pelo laboratório CBO Análises Laboratoriais (Campinas, SP) sob metodologia estabelecida pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, a 105 °C até peso constante, a proteína bruta pelo método de Kjeldahl e a energia bruta por bomba calorimétrica. O extrato etéreo foi determinado por hidrólise ácida e o teor de fibra pelo método gravimétrico, em mufla a 555 °C e incineração da matéria orgânica em bico de Bunsen. A análise de aminoácidos foi feita por cromatografia líquida (HPLC).

Para a aferição do pH das dietas, 20 g de amostra foi suspensa em 30 ml de água deionizada e agitada por barra magnética e agitador elétrico por 10 minutos e, imediatamente após, foi feita a leitura por meio de peagâmetro.

3.3.6. Análises estatísticas

A normalidade e a homogeneidade de variância foram aferidas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente, e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha = 0,05$) e ao teste de médias de Tukey ($\alpha = 0,05$). As correlações entre as variáveis foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson [r] ($\alpha = 0,05$). A intensidade da correlação foi avaliada para valores positivos e negativos de r de acordo com a escala utilizada no ensaio de digestibilidade (3.2.4).

Para o desempenho produtivo e avaliação hematológica foram realizadas análises de regressão linear e polinomial, de acordo com o melhor ajuste da equação aos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Digestibilidade de hidrolisados proteicos

A inclusão de hidrolisados diminuiu o pH das dietas (CON - 5,59; RTI - 4,21; CAT - 3,81; FSU - 4,42; FAV - 4,00), porém, não foram registradas diferenças de consumo pelos dourados entre os tratamentos ou após o manejo diário, ao contrário do relatado Fracalossi et al. (2004). Os maiores coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da matéria seca, energia e proteína foram registrados para RTI e FSU, enquanto que em CAT foram registrados os menores CDAs, semelhantes àqueles encontrados para a dieta controle (Tabela 6). Os CDAs da matéria seca e proteína para FAV não diferiram estatisticamente de FSU, assim como de CAT. A digestibilidade média dos aminoácidos foi alta ($97,72 \pm 1,20$) e os únicos aminoácidos para os quais não foi registrada diferença estatística entre as dietas foram lisina e tirosina; os maiores CDAs dos aminoácidos foram registrados para RTI e FSU, sem qualquer diferença entre eles, enquanto que os aminoácidos de CAT foram os menos digestíveis. A digestibilidade da taurina foi maior para os ingredientes com origem do meio aquático (RTI e CAT) do que para aqueles originários do ambiente terrestre (FSU e FAV). A metionina foi o aminoácido essencial mais digestível (CDA médio de 98,72%), enquanto o menos digestível foi a fenilalanina (média 97,30%). Entre os aminoácidos não essenciais destacam-se o ácido aspártico e a cistina, com CDAs médios de 98,98% e 95,28%, respectivamente.

Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente [ADCs] de nutrientes e energia da dieta controle e hidrolisados para o dourado

Nutrientes	CON ¹	Coeficiente de digestibilidade aparente (%)				<i>P</i> valor
		RTI ²	CAT ³	FSU ⁴	FAV ⁵	
Matéria seca	78,06 (1,18)	85,98 (0,22) ^a	79,61 (0,76) ^c	83,21 (0,56) ^{ab}	82,25 (0,88) ^{bc}	0,0009
Proteína	96,25 (0,20)	97,62 (0,18) ^a	95,96 (0,26) ^c	97,23 (0,08) ^{ab}	96,61 (0,14) ^{bc}	0,0008
Energia ¹	87,47 (0,43)	90,83 (0,30) ^a	87,26 (0,22) ^c	90,03 (0,32) ^{ab}	89,10 (0,52) ^b	0,0006
Aminoácidos essenciais						
Arginina	97,43 (0,09)	98,25 (0,17) ^a	96,36 (0,47) ^c	97,69 (0,08) ^{ab}	97,00 (0,21) ^{bc}	0,0059
Histidina	97,65 (0,12)	98,65 (0,10) ^a	97,64 (0,29) ^c	98,43 (0,08) ^{ab}	97,81 (0,10) ^{bc}	0,0077
Isoleucina	97,42 (0,15)	98,22 (0,14) ^a	96,84 (0,06) ^c	97,90 (0,09) ^{ab}	97,41 (0,30) ^{bc}	0,0026
Leucina	98,11 (0,10)	98,56 (0,10) ^a	97,39 (0,18) ^c	98,42 (0,07) ^{ab}	97,72 (0,22) ^{bc}	0,0019
Lisina	97,84 (0,10)	98,72 (0,07) ^a	96,34 (1,08) ^a	98,29 (0,07) ^a	97,70 (0,17) ^a	0,0660*
Metionina	98,31 (0,07)	99,21 (0,06) ^a	98,35 (0,20) ^b	98,81 (0,11) ^{ab}	98,48 (0,14) ^b	0,0084
Fenilalanina	97,59 (0,11)	98,16 (0,14) ^a	96,15 (0,55) ^b	97,97 (0,08) ^a	96,96 (0,25) ^{ab}	0,0063
Treonina	97,52 (0,13)	98,49 (0,11) ^a	97,33 (0,08) ^b	98,30 (0,04) ^a	97,56 (0,17) ^b	0,0002
Valina	97,44 (0,14)	98,24 (0,13) ^a	97,17 (0,04) ^c	98,16 (0,05) ^{ab}	97,63 (0,20) ^{bc}	0,0009

Aminoácidos não essenciais

Ácido Aspártico	98,70 (0,09)	99,34 (0,04) ^a	98,53 (0,21) ^b	99,16 (0,11) ^a	98,90 (0,13) ^{ab}	0,0149
Ácido glutâmico	99,00 (0,05)	99,19 (0,05) ^a	98,35 (0,16) ^c	99,04 (0,08) ^{ab}	98,65 (0,12) ^{bc}	0,0027
Alanina	98,18 (0,07)	98,80 (0,07) ^a	97,74 (0,21) ^c	98,50 (0,05) ^{ab}	97,99 (0,16) ^{bc}	0,0028
Cistina	94,55 (0,71)	97,70 (0,33) ^a	91,77 (1,50) ^b	98,32 (0,05) ^a	93,34 (0,69) ^b	0,0013
Glicina	96,69 (0,17)	98,53 (0,10) ^a	96,62 (0,39) ^b	97,54 (0,13) ^{ab}	96,76 (0,17) ^b	0,0012
Prolina	97,63 (0,12)	98,37 (0,12) ^a	96,79 (0,51) ^b	97,97 (0,04) ^{ab}	97,36 (0,17) ^{ab}	0,0166
Serina	96,99 (0,12)	97,00 (0,11) ^a	96,29 (0,22) ^b	97,66 (0,14) ^a	96,70 (0,20) ^b	0,0004
Taurina	97,81 (0,47)	99,24 (0,01) ^a	97,55 (0,74) ^{ab}	96,30 (0,85) ^b	96,30 (0,15) ^b	0,0197
Tirosina	96,95 (0,14)	97,93 (0,19) ^a	97,17 (0,49) ^a	97,86 (0,08) ^a	96,96 (0,23) ^a	0,1079*
Aminoácidos totais	97,88 (0,08)	98,64 (0,09) ^a	97,28 (0,25) ^c	98,32 (0,06) ^{ab}	97,70 (0,16) ^{bc}	0,0013

¹Controle; ²Resíduos de tilápia; ³Cabeça de atum ⁴Fígado de suíno; ⁵Fígado de ave

Médias seguidas de erro padrão entre parênteses; Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$)

¹Não é considerada nutriente

* Não significativo ($P < 0,05$)

Foi registrada redução na atividade de protease inespecífica [API_n] entre os segmentos no sentido céfalo-caudal e apenas nos cecos pilóricos não foi registrada diferença entre os tratamentos, enquanto que nos estômagos a atividade enzimática foi maior nos peixes alimentados com as dietas FSU e nos intestinos para os peixes alimentados com as dietas RTI e FSU (Figura 3; Apêndice A). Peixes alimentados com a dieta FSU apresentaram a maior soma das atividades de API_n entre os segmentos enquanto que os peixes alimentados com as dietas CAT e FAV apresentaram atividades enzimáticas menores.

Figura 3. Atividade de protease inespecífica ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de *S. brasiliensis* alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves.

A atividade de lipase inespecífica [ALIn] foi maior nos estômagos e não diferiu entre cecos pilóricos e intestinos (Figura 4). As maiores atividades de ALIn nos estômagos foram registradas nos peixes alimentados com as dietas RTI e CAT, enquanto aqueles alimentados com a dieta controle apresentaram menores atividades de ALIn.

Os menores valores de ALIn foram registrados nos cecos pilóricos dos peixes alimentados com a dieta RTI, enquanto que entre os demais tratamentos não houve diferença. Os maiores valores de atividade de ALIn nos intestinos e na soma entre os segmentos foram registradas nos peixes alimentados com a dieta FSU enquanto as menores somas foram observadas naqueles que consumiram a dieta controle.

Figura 4. Atividade de lipase inespecífica ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de *S. brasiliensis* alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves

A atividade de amilase inespecífica [AAIn] foi maior nos cecos pilóricos e menor nos intestinos, enquanto que nos estômagos a AAIIn foi praticamente insignificante. Foi registrada diferença significativa entre os tratamentos para atividade de AAIIn somente entre os intestinos, onde a maior atividade foi registrada nos peixes alimentados com as dietas controle e RTI (Figura 5).

Figura 5. Atividade de amilase inespecífica ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) no intestino anterior, cecos pilóricos e estômagos de *S. brasiliensis* alimentados com dietas compostas com 30% de hidrolisados proteicos de origens distintas – resíduos de abate de tilápias, cabeças de atuns, fígados de suínos e fígados de aves

Hidrolisados proteicos de subprodutos animais são compostos por minerais, carboidratos e lipídeos, mas principalmente, por aminoácidos e peptídeos com cerca de 2 a 20 aminoácidos, que permitem a aplicação e uso de tais hidrolisados como fontes dietéticas de aminoácidos, como ingredientes funcionais e flavorizantes (Chalamaiah et al., 2012; Martínez-Alvarez et al., 2015; Pasupuleti et al., 2010). A maioria dos aminoácidos tem pH moderadamente ácido (5,79), com exceção daqueles com grupos R carregados positivamente (aminoácidos alcalinos - lisina, histidina e arginina) e negativamente (ácidos aspártico e glutâmicos) (Lehninger, 2000).

Apesar de não terem sido registradas diferenças no consumo das dietas-teste pelos peixes, o pH das mesmas pode afetar a ingestão do alimento pelo dourado, principalmente devido a presença de ácidos inorgânicos (Dairiki, 2009). A influência do pH da dieta é variável entre as espécies e aparentemente não influencia o consumo em animais com estômago, e.g. “black rock cod” *Notothenia coriiceps* e “red drum” *Sciaenops ocellatus*, porém, dietas com pH inferiores a 5,0 reduzem o peso corporal de carpas (*Cyprinus carpio*), pois a digestão que normalmente ocorre em processo neutro ou ligeiramente alcalino, passa a ocorrer em conteúdo intestinal ácido e, portanto, a assimilação dos aminoácidos é alterada (Koplovitz et al., 2009; Nose et al., 1974; Whiteman e Gatlin III, 2005). Em geral, produtos com muitos aminoácidos livres e nucleotídeos são considerados bons atrativos para peixes (Borquez e Cerqueira, 1998; Chotikachinda et al., 2013; Hidaka et al., 1977). Entretanto, a presença de peptídeos com um ou mais aminoácidos hidrofóbicos confere sabor amargo aos

produtos ou alimentos em que são utilizados (Adler-Nissen, 1976; Martínez-Alvarez et al., 2015). Aparentemente, a especificidade da alcalase para o grupo terminal dos aminoácidos hidrofóbicos pode ter reduzido o sabor amargo das dietas utilizadas neste estudo e, portanto, contribuído para a igualdade no consumo conforme sugerido por Adler-Nissen (1984).

A combinação de atividades físicas, químicas e enzimáticas do processo de digestão age diretamente na digestibilidade dos alimentos, ou seja, na proporção dos nutrientes ou energia dos alimentos ingeridos não eliminados nas fezes. Os coeficientes de digestibilidade, portanto, refletem a eficiência do organismo na hidrólise dos nutrientes, que varia de acordo com as propriedades químicas e físicas dos alimentos (Hofer e Schiemer, 1981; NRC, 1993, 2011; Rust, 2003). A alta digestibilidade registrada para a dieta controle pode ser explicada pela proporção de farinha de peixe ($402,7 \text{ g kg}^{-1}$), ingrediente com grande valor biológico e digestibilidade para o dourado, independentemente da forma de processamento (Borghesi et al., 2009; Braga et al., 2008). Da mesma forma, os hidrolisados foram altamente digestíveis para dourados, a exemplo do já demonstrado para hidrolisados de resíduos de tilápias, krill e cabeça de camarão para o pargo, *Pagrus major* (Bui et al., 2014); de farinha de peixe para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e para o linguado (*Scophthalmus maximus*) (Oliva-teles et al., 1999; Refstie et al., 2004), e de farinha de peixe ultrafiltrada também para o linguado (Wei et al., 2015).

A possível presença significativa de pequenos peptídeos e aminoácidos livres nos hidrolisados pode ter influenciado na digestibilidade destes nutrientes, pois uma vez que as proteínas são absorvidas na forma de aminoácidos e peptídeos, sua digestibilidade depende do tipo de proteína e do grau em que podem ser hidrolisadas as ligações entre as cadeias de aminoácidos, ou entre os aminoácidos e outros compostos (e.g. açúcares) (Bakke et al., 2010; NRC, 2011). A absorção de proteínas hidrolisadas pode ser até três vezes mais rápida do que aquelas intactas (Dabrowski, 1984), principalmente devido à grande proporção de pequenos peptídeos (cinco ou menos aminoácidos) que, em geral, são mais eficientemente absorvidos mesmo quando comparados com aminoácidos livres (Rérat e Nunes, 1988; Silk et al., 1985). A alta absorção torna a inclusão de hidrolisados em dietas um mecanismo interessante para a retenção de aminoácidos (Aragão et al., 2004), os quais são essenciais para a construção de proteínas, para o crescimento, e para a manutenção do tecido corporal e de energia em peixes (Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000b). A digestibilidade da proteína neste trabalho teve correlação moderadamente positiva com a proteína da dieta ($r = 0,49$; $P = 0,0012$) e com a protease total ($r = 0,40$; $P = 0,0302$), comportamento semelhante ao encontrado para o jundiá

(*Rhamdia quelen*) (Melo et al., 2006) e para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Almeida et al., 2006).

As enzimas do trato intestinal de peixes apresentam maiores atividades específicas e afinidade ao substrato do que aquelas dos animais homeotérmicos (Bakke et al., 2010) e, para os peixes carnívoros (e.g. “snakehead”, *Channa striata*) a grande atividade de pepsina – enzima responsável pela quebra de grandes peptídeos – se reflete em maior atividade de protease no estômago (Almeida et al., 2006; Chakrabarti et al., 1995; Moraes e Almeida, 2014). Em geral, o baixo pH do estômago das espécies carnívoras desnatura a proteína imediatamente após a solubilização e facilita o acesso pela pepsina proteolítica (Bakke et al., 2010). Como regra, neste ensaio a digestibilidade da proteína refletiu os resultados encontrados para os aminoácidos, porém, nem sempre a disponibilidade dos aminoácidos para os peixes ocorre proporcionalmente à digestibilidade da proteína (Portz e Furuya, 2012). As proteínas são oriundas de uma complexa união de aminoácidos e para sua determinação é feita a multiplicação do teor de nitrogênio por 6,25, o que pode superestimar o valor proteico de um ingrediente. Além disso, compostos nos quais o nitrogênio não está na forma de amina não têm qualquer valor nutricional para animais aquáticos (Angell et al., 2016; Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000b).

Todos os aminoácidos dietéticos são importantes, mas lisina, cistina e metionina são considerados aqueles mais significantes para os peixes do ponto de vista nutricional. A lisina, utilizada principalmente na retenção de nitrogênio e deposição de proteína corporal, bem como na síntese e deposição de colágeno (Botaro et al., 2007; Dairiki et al., 2007), é encontrada em alta concentração em farinhas de sangue e de peixe e em menor concentração em ingredientes vegetais; portanto, nas dietas formuladas com altos níveis de ingredientes vegetais ou processadas em condições adversas é comumente ter a lisina como principal aminoácido limitante (NRC, 2011). A metionina e a cistina - aminoácidos sulfurados - habitualmente são considerados juntos em formulações de dietas, e a primeira, por ser um aminoácido não polar (hidrofóbico), pode reconhecer e se ligar a ligantes hidrofóbicos (e.g. lipídeos). Segundo Berge et al. (2004), é necessária uma proporção adequada de aminoácidos na dieta para a sua absorção, motivo pelo qual o valor de digestibilidade da metionina é considerado um bom parâmetro para avaliar o balanço de aminoácidos da dieta.

A cistina, por sua vez, é um aminoácido hidrofílico que possui um cadeia lateral tiol com alta reatividade e, desta forma, atua como um importante componente estrutural e funcional de muitas proteínas e enzimas (NRC, 2011). Estudos realizados para determinar as exigências nutricionais em aminoácidos para dourado são limitados e apenas os níveis de

lisina (5,00% da proteína dietética) e arginina (3,43% da proteína dietética) foram definidos para o maior ganho de peso (Dairiki et al., 2013). A digestibilidade dos aminoácidos dos hidrolisados para os dourados foi superior àquela encontrada para farinha de peixe, farelos de glúten de milho e de soja (Borghesi et al., 2009), com destaque para os hidrolisados de resíduo de tilápia e de fígado de suíno, para os quais foram registrados CDAs superiores a 97%. Como destaque, a digestibilidade de taurina aumentou conforme a sua concentração na dieta (maior em pescado), porém, apesar da substituição de farinha de peixe em dietas poder causar deficiência nesse aminoácido (NRC, 2011), peixes de água doce podem sintetizar taurina a partir da metionina e cistina através da via de transulfuração e, portanto, a suplementação de taurina em dietas para peixes de água doce aparentemente não é necessária (El-Sayed, 2013).

Neste estudo a digestibilidade da proteína teve forte correlação negativa com a proporção de fibra da dieta ($r = -0,62$; $P < 0,0001$) com ponto máximo em 2,12% ($y = -2,0199x^2 + 8,5829x + 88,227$; $R^2 = 0,8502$), nível de inclusão que resultou nas maiores atividades de protease para esta espécie em trabalho realizado por Moro et al. (2016) para avaliar a relação amido:lipídeo nas dietas. Fibras são indigestas para peixes carnívoros; altos níveis de fibra dietética podem acelerar o tempo de trânsito gastrointestinal e, com isso, reduzir a absorção dos nutrientes (Hardy e Barrows, 2002; Moraes e Almeida, 2014; NRC, 1993). Em geral, a atividade proteolítica específica tem correlação negativa com o tamanho do trato digestório, porém, o tempo de exposição ao alimento aumenta com o tamanho do trato digestório (Hofer e Schiemer, 1981). O tempo de esvaziamento gastrointestinal completo do dourado alimentado com dietas compostas com 72 g kg⁻¹ de fibras é de 18 horas (Braga et al., 2007). Entretanto, neste estudo as dietas possuíam menos da metade deste teor de fibras na composição, o que deve ter alterado o tempo de esvaziamento e, por consequência, a atividade enzimática. Não foi registrada correlação entre o comportamento de AAIn nos intestinos dos peixes e a diferença nos níveis de fibra entre as dietas, possível resultado da reduzida capacidade que esta espécie tem de utilizar carboidratos dietéticos (Moro et al., 2016). A produção de amilase parece ocorrer somente no pâncreas exócrino dos peixes e é mais significativa em onívoros e herbívoros do que em carnívoros que, em geral, apresentam atividades relativamente baixas, conforme foram encontradas no presente trabalho (Chakrabarti et al., 1995; Hidalgo et al., 1999; Krogdahl et al., 2005).

Os altos ADCs de matéria seca registrados neste trabalho provavelmente resultaram do elevado teor de proteína e dos baixos teores de cinzas e de fibras nas dietas, a exemplo do relatado por McGoogan e Reigh (1996) para o “red drum” e por Teixeira et al. (2010) para o

dourado. Os ADCs registrados para RTI e FSU foram muito próximos àqueles relatados por Borghesi et al. (2009) para farelos de soja e de glúten de milho, e para as farinhas de peixe e de vísceras de aves cujos ADCs foram maiores que aqueles encontrados para FAV e CAT. Segundo Cho et al. (1994) altas digestibilidades de matéria seca são desejáveis em dietas para peixes, pois influencia no aproveitamento do alimento e, sobretudo, na redução dos resíduos na água.

A digestibilidade da energia teve forte correlação negativa com a gordura da dieta ($r = -0,63$, $P < 0,0001$) e moderadamente positiva com a protease ($r = 0,37$, $P = 0,042$) e lipase do estômago ($r = 0,46$, $P = 0,008$), mas não com a lipase total. Uma vez que existe forte correlação negativa entre a proporção de lipídeos na dieta com a lipase no estômago ($r = -0,60$, $P < 0,0003$) e moderadamente positiva com atividade no intestino ($r = 0,47$, $P = 0,007$), mas não há correlação com a lipase total, aparentemente ocorre uma adaptabilidade do perfil de enzimas ao longo do trato digestório concomitante à passagem dos lipídeos. A menor ALIn nos peixes alimentados com a dieta controle pode ser efeito da maior quantidade de fontes vegetais e, por consequência, de fibras, fitosteróis, saponinas e fitoestrógenos. Inibidores de proteinase em geral reduzem a digestibilidade de proteínas e lipídeos, principalmente dos mais saturados e monoinsaturados, pois causam a diminuição da atividade de tripsina e presumivelmente também de quimotripsina (Krogdahl et al., 2010). Peixes mais ativos, de ambientes lóticos, como o próprio dourado, apresentam atividade de lipase mais elevada do que espécies lênticas e, em geral, a maior parte da enzima está localizada no intestino anterior, cecos pilóricos e pâncreas, e o perfil de atividade pode ser modificado conforme a alimentação (Kurtovic et al., 2009; Lundstedt et al., 2004; Melo et al., 2006). Apesar das lipases ocorrerem principalmente no estômago, os sítios primários de hidrólise lipídica parecem ser a porção anterior do intestino e os cecos pilóricos, porém, no caso específico dos carnívoros, a digestão aparentemente continua nas demais porções do intestino (Ferraris e Ahearn, 1984; Moraes e Almeida, 2014).

De uma forma geral, a digestão dos nutrientes em peixes ocorre principalmente no intestino anterior e, em menor extensão, no intestino médio, enquanto que na porção distal a atividade enzimática é bem menor (Correa et al., 2007). Os coeficientes de digestibilidade de energia das dietas RTI e FSU foram semelhantes ao encontrado para a farinha de peixe e vísceras de aves por Borghesi et al. (2009), porém, inferior aos coeficientes encontrados por Braga et al. (2008) para os mesmos ingredientes. Os ADCs dos hidrolisados de fígado de aves e cabeça de atum foram semelhantes aos encontrados por Borghesi et al. (2009) para farelo de glúten e maiores que aqueles encontrados por Braga et al. (2008) para farelo de soja.

Em geral, os ADCs da energia dos hidrolisados foram altos e os produtos mais digestíveis foram os mais proteicos; provavelmente a menor concentração de fontes de energia não proteica tenha estimulado a secreção de lipases para otimizar a digestão da gordura dietética (Lundstedt et al., 2004).

4.2. Desempenho de dourados alimentados com dietas com níveis crescentes de inclusão de hidrolisados de fígado suíno

4.2.1. Desempenho produtivo

O extrato etéreo das dietas aumentou concomitante à inclusão de hidrolisados, porém, esteve dentro dos níveis praticados para esta espécie (Moro et al., 2016; Teixeira et al., 2010). As quantidades de proteína e energia bruta analisadas, assim como a relação aminoácido:lisina, oscilaram pouco entre as dietas e a relação energia bruta/proteína bruta (EB/PB) foi semelhante ou muito próximo ao recomendado por Borghesi (2008). As proporções de arginina na proteína dietética foram superiores ao recomendado por Dairiki et al. (2013) ao considerar o peso final, o ganho de peso e a taxa de crescimento específico para o dourado. Apenas para a dieta FS28 foi observada proporção de lisina na proteína dietética pouco inferior (4,86%) àquela recomendada pelos mesmos autores (5,00%).

Deficiências dietéticas de aminoácidos podem resultar de erros de formulação ou de produção, geralmente por não levar em conta a diferença entre quantidade de aminoácidos e biodisponibilidade de aminoácido nas fontes proteicas. A falta de aminoácidos nas dietas de peixes pode resultar, por exemplo, em crescimento mais lento do que o esperado, alta taxa de conversão alimentar ou, ainda, grandes mortandades (Hardy, 2001).

O pH das dietas reduziu linearmente concomitante à inclusão do hidrolisado ($y = -0,0466 + 5,636x$, $R^2 = 0,99$) e todas as dietas foram aceitas pelos dourados. Os peixes alimentados com a dieta FS28 foram visivelmente menos vorazes na captura do alimento do que aqueles alimentados com as demais dietas, porém, diferenças ($P < 0,05$) de consumo ocorreram apenas com aqueles alimentados com a dieta FS14 (Tabela 7).

Tabela 7. Desempenho e utilização do alimento pelo dourado alimentado com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.

	Dietas					P valor
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28	
PI (g)	4,75 (0,16)	4,52 (0,09)	4,64 (0,05)	4,53 (0,09)	4,39 (0,06)	0,7381*
PF (g)	30,77 (1,26) ^{ab}	33,78 (0,99) ^{ab}	34,90 (0,40) ^a	30,54 (0,52) ^{ab}	26,12 (1,12) ^b	0,0351
BF (g)	444,10 (14,47) ^a	417,15 (3,82) ^a	418,03 (21,33) ^a	356,35(11,80) ^{ab}	288,95 (13,81) ^b	0,0103
GP (g)	26,02 (1,17) ^{ab}	29,27 (1,06) ^{ab}	30,26 (0,35) ^a	26,01 (0,47) ^{ab}	21,72 (1,09) ^b	0,0334
CM (g)	372,71 (13,61) ^{ab}	368,70 (5,25) ^{ab}	388,75 (16,02) ^a	328,45 (4,56) ^{ab}	281,07 (9,83) ^b	0,0206
CAA	1,00 (0,00) ^b	1,05 (0,01) ^{ab}	1,13 (0,03) ^{ab}	1,16 (0,04) ^{ab}	1,29 (0,04) ^a	0,0217
TID (% PVD ¹)	2,29 (0,03) ^b	2,41 (0,01) ^{ab}	2,53 (0,02) ^a	2,36 (0,04) ^{ab}	2,45 (0,03) ^{ab}	0,0176
TCE (% dia ⁻¹)	2,96 (0,05)	3,19 (0,07)	3,20 (0,01)	3,03 (0,02)	2,81 (0,06)	0,0684*
TEP (%)	2,22 (0,01) ^a	2,12 (0,02) ^{ab}	2,01 (0,04) ^{ab}	2,00 (0,07) ^{ab}	1,77 (0,06) ^b	0,0363
TEE (%)	20,87 (0,10) ^a	19,85 (0,18) ^{ab}	18,14 (0,40) ^{ab}	18,08 (0,61) ^{ab}	16,54 (0,54) ^b	0,0198
TRP (%)	37,03 (0,75) ^a	35,73 (0,10) ^a	33,96 (0,72) ^{ab}	32,48 (1,12) ^{ab}	28,04 (0,90) ^b	0,0109
SOB (%)	96,67 (0,96)	83,33 (2,88)	80,00 (4,30)	78,33 (3,44)	75,00 (4,38)	0,2536*

¹PVD=peso vivo dia⁻¹; PI=peso médio inicial; PF=peso médio final; BF=biomassa final; GP=ganho de peso médio; CM=consumo médio na matéria seca; CAA=conversão alimentar aparente; TID=taxa de ingestão diária; TCE=taxa de crescimento específico; TEP=taxa de eficiência proteica; TEE=taxa de eficiência energética; TRP=taxa de retenção proteica; SOB=sobrevivência; VS=viscero-somático; HS=hepato-somático.

Médias (n=4) seguidas de erro padrão entre parênteses; Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey P < 0,05); *Não significativo (P < 0,05).

As menores taxas de ingestão diária foram registradas para os peixes alimentados com a dieta isenta de hidrolisados (FS0), com diferença (P < 0,05) daqueles alimentados com a dieta FS14, e ambos não diferiram em TID dos peixes alimentados com as demais dietas. Da mesma forma, a inclusão de níveis médios (180 g kg⁻¹ e 240 g kg⁻¹) de hidrolisado proteico de arenque na dieta aparentemente aumentou o consumo em juvenis de salmão do Atlântico em detrimento dos demais níveis de inclusão (60, 120 e 300 g kg⁻¹) e a presença de pequenos peptídeos originados da hidrólise enzimática da soja podem ter aumentado a atratividade da dieta em níveis de 150 e 500 g kg⁻¹ para linguados (*Platichthys stellatus*) (Hevroy et al., 2005; Song et al., 2014). A atratividade do hidrolisado de fígado suíno já foi demonstrada para o surubim do Iguçu (*Steindachneridion melanodermatum*); maior consumo foi registrado em peixes alimentados com 60 g kg⁻¹ do produto na dieta em comparação aos hidrolisados de tilápia (40 g kg⁻¹) e de sardinha (60 g kg⁻¹) (Lewandowski et al., 2013). No presente trabalho o consumo dos peixes alimentados com a dieta FS14 foi numericamente maior que os demais, grupo para o qual foram também registrados os maiores valores de TID. Porém, o resultado pode ter influência da taxa de sobrevivência que, apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, reduziu linearmente ($y = -0,6905x + 92,333$, $R^2 = 0,83$) com a inclusão de hidrolisados na dieta. A mortandade devido ao uso de hidrolisado não é muito relatada na literatura, principalmente para juvenis. Baixas mortandades foram registradas em alevinos de trutas alimentados com grandes proporções de aminoácidos livres, porém, não foi registrado

tal comportamento para juvenis e tão pouco para aqueles alimentados com pequenos peptídeos (Dabrowski et al., 2003). Porém, ao contrário do que foi relatado para alevinos de trutas, as mortandades ocorridas neste ensaio ocorreram em sua maioria por canibalismo (Figura 6).

Figura 6. Dourados mortos por tentativa de canibalismo: (A) Animal parcialmente dilacerado (B) Cabeça de indivíduo consumido

Segundo Smith e Reay (1991), a principal vantagem do canibalismo para os peixes dominantes é nutricional e frequentemente é relacionado com a quantidade ou baixa qualidade alimentar. A fome e a deficiência de nutrientes contribuem significativamente para o canibalismo, mas não são decisivos, pois pode ser resultado de vários outros fatores como cuidado parental, piscivoria, heterogeneidade de tamanho, correlação genética, comportamento de cardume, resposta de fuga, densidade, refúgio, luz, perturbação, etc. O canibalismo é comumente relatado para formas jovens de dourados em sistemas de produção – sobretudo em larvas – e, em alguns casos, pode dizimar a produção em grande escala (Flora et al., 2010). Em ensaio com níveis crescentes de inclusão de vitamina E em dietas para alevinos de dourados, taxas de sobrevivência acima de 90% foram relatadas por Yamamoto (2015). Resultados semelhantes foram encontrados quando a farinha de peixe na dieta foi substituída em até 60% por vísceras de aves, em até 80% por concentrado de soja, ou quando a relação amido:energia ficou entre 0,0:1,0 e 2,3:1,0 (Corrêa, 2016; Donadelli, 2014; Moro et al., 2016). A substituição total da farinha de peixe nas dietas para dourado aparentemente pode reduzir a qualidade do alimento e, assim, reduzir a sobrevivência. Porém, na maioria das vezes o canibalismo não é citado como resultado de déficit nutricional para esta espécie.

Os menores valores de peso final e ganho de peso foram registrados para os peixes alimentados com a dieta FS28, com diferença ($P < 0,05$) daqueles que consumiram a dieta FS14. Porém, não foi observado efeito da inclusão de hidrolisados na dieta sob a taxa de crescimento específico [TCE]. A quantidade máxima ideal de inclusão de hidrolisado de

fígado suíno na dieta para obtenção do melhor ganho de peso foi determinada em 111,5 g kg⁻¹ pela equação polinomial (Figura 7).

Figura 7. Regressão polinomial ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) do ganho de peso médio de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno

Os ganhos de peso dos peixes alimentados com as rações FS0, FS7 e FS14 foram semelhantes aos melhores valores encontrados por Moro et al. (2016) ao avaliar a proporção amido:lipídeo para dourados com tamanho inicial semelhante ($3,34 \pm 0,16$ g), porém, com 35 dias a mais de criação. As menores taxas de crescimento específico registradas foram superiores às maiores apresentadas pelos mesmos autores e as melhores conversões alimentares aparentes [CAA] foram semelhantes entre os dois trabalhos (Figura 8). Os valores de conversão alimentar registrados por Moro et al. (2016) para os peixes que tiveram os melhores ganhos de peso (dietas 0,7:1,0 e 1,0:1,0, amido:lipídeo) foram semelhantes aos valores registrados para as dietas FS7 e FS14 do presente ensaio, intervalo onde foram encontrados os melhores ganhos de peso (111,5 g kg⁻¹ de inclusão de hidrolisado na dieta).

Figura 8. Regressão linear ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) da conversão alimentar aparente [CAA] de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno

Os menores valores de TEP e TEE foram registrados para os peixes alimentados com a dieta FS28, que diferiu ($P < 0,05$) daqueles alimentados com a dieta FS0 (Figura 9). Os menores índices de TRP também foram registrados para os indivíduos que consumiram FS28, diferindo significativamente de FS0 e FS7.

Figura 9. Regressão linear ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) das taxas de eficiência proteica e energética (TEP e TEE) de dourados alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de hidrolisado de fígado suíno

Os ensaios de taxa de eficiência proteica requerem que a fonte proteica de interesse represente pelo menos 10% da proteína na dieta e, mesmo assim, a qualidade da proteína dietética pode não ser o principal fator que influencia no ganho de peso, pois o mesmo depende, sobretudo, da ingestão do alimento (Wu, 2013). Portanto, como neste trabalho a dieta FS7 possuía proporção menor de proteína dietética oriunda do ingrediente teste, é possível que os valores de TEP registrados para os peixes que a consumiram não representem significativamente o efeito da inclusão do hidrolisado.

A suplementação de dietas com hidrolisado proteico de peixe (50, 100 e 150 g kg⁻¹) melhorou o ganho de peso e a taxa de crescimento específico em pescadas (*Pseudosciaena crocea* R.) e os índices mais altos foram encontrados na dieta com 100 g kg⁻¹ de inclusão, semelhante aos maiores índices encontrados para o dourado (Tang et al., 2008). O menor desempenho em ganho de peso dos peixes alimentados com as dietas contendo as maiores quantidades de hidrolisados pode ser resultado da alta quantidade de aminoácidos livres e, por consequência, da rápida absorção de aminoácidos essenciais através do intestino (Adibi et al., 1967). Resultado semelhante foi relatado por Srichanun et al. (2014) para larvas de “barramundi” (*Lates calcarifer*) alimentadas com dietas contendo 500 g kg⁻¹ de proteína hidrolisada de músculo de peixe e manta de lula, situação em que a rápida absorção ocasionou o aumento do catabolismo e desbalanceamento na absorção de aminoácidos e, por consequência, o decréscimo da síntese proteica.

O peso molecular dos hidrolisados contidos nas dietas pode afetar o desempenho dos peixes por estarem envolvidas em diversos processos como, por exemplo, metabolismo de carboidratos, de lipoproteínas, de aminoácidos e de nucleotídeos, além de influenciar na degradação proteica e no sinal de transdução (De Vareilles et al., 2012). A importância do peso molecular dos peptídeos existentes em hidrolisados foi demonstrada em ensaio com linguados (*Scophthalmus maximus* L.) alimentados com dietas formuladas a partir da substituição parcial (37 g kg⁻¹) de farinha de peixe por hidrolisado de farinha de peixe não filtrado (pesos moleculares: 100 a 1000 Da – 48,6%, <100 Da – 21,5%) e ultrafiltrado (pesos moleculares: 100 a 1000 Da – 66,4%, <100 – 26,5%). Peixes alimentados com dietas contendo hidrolisado ultrafiltrado tiveram melhor utilização do alimento, crescimento, eficiência alimentar, taxa de eficiência proteica e de retenção proteica (Zheng et al., 2013). Peixes alimentados com dieta contendo hidrolisado de peixe não filtrado, por sua vez, tiveram desempenho semelhante àquele dos peixes alimentados com as dietas contendo farinha de peixe, semelhante ao descrito por Oliva-teles et al. (1999) para a mesma espécie. A inclusão

do hidrolisado na dieta aparentemente não altera o desempenho do linguado porque não há melhora na digestibilidade da proteína e os aminoácidos livres não são atrativos para esta espécie, a qual tem como estimulantes inosina e inosina 5'-monofosfato, características contrárias ao observado nesse ensaio.

Provavelmente o hidrolisado aumentou a atratividade da dieta para o dourado até o nível de inclusão de 140 g kg^{-1} , porém, o excesso de pequenos peptídeos nas dietas com níveis mais altos de inclusão reduziu o consumo e, por consequência, o desempenho produtivo, semelhante ao relatado para salmões com níveis $180\text{-}240 \text{ g kg}^{-1}$ de hidrolisado de farinha de peixe (Hevroy et al., 2005). Concomitante à redução do consumo, o aumento da inclusão de proteína hidrolisada na dieta pode ter reduzido a retenção do nitrogênio como resultado da rápida digestão e absorção dos ingredientes e consequente catabolismo do excesso de aminoácido presente no plasma, a exemplo do relatado para truta arco-íris por Aguirre et al. (1995).

Definir quais fatores contribuem para que os peixes tenham um melhor desempenho quando alimentados com dietas contendo hidrolisados nem sempre é tarefa simples. Por exemplo, apesar de Kolkovski e colaboradores (2000) considerarem que o melhor desempenho de juvenis de perca amarela (*Perca flavescens*), “walleye” (*Stizostedion vitreum*) e “lake whitefish” (*Coregonus clupeaformis*) alimentados com dietas contendo hidrolisado de krill ter resultado do aumento da taxa de ingestão, Khosravi et al. (2015) creditam o melhor desempenho de pargos (*Pagrus major*) e linguados (*Paralichthys olivaceus*) à melhor utilização do alimento contendo hidrolisado de krill ou de resíduo de atum (20 g kg^{-1}). Conforme demonstrado no primeiro ensaio, as digestibilidades da proteína, da energia e dos aminoácidos do hidrolisado de fígado de suíno para o dourado são altas, portanto, a possibilidade de ter ocorrido uma grande absorção dos aminoácidos com posterior catálise no plasma e consequente redução na retenção proteica é bastante válida. Desta forma, conforme postulado por Hardy (1991) *apud* Kolkowski et al. (2001), a alta quantidade de aminoácidos livres deve ter alterado a taxa de aminoácidos no trato gastrointestinal e, com isso, aumentado a absorção de alguns aminoácidos essenciais presentes na forma livre em relação a absorção de outros aminoácidos presentes como polipeptídeos ou proteína intacta (Kolkovski, 2001).

A composição corporal em proteína não foi influenciada pelas dietas consumidas pelos dourados. Os peixes alimentados com a dieta FS28 continham os maiores índices de matéria mineral, com diferença ($P < 0,05$) de FS0, FS7 e FS14. A matéria mineral dos peixes

teve correlação negativa muito forte ($r = -0,86969$, $P < 0,0001$) com a composição lipídica da carcaça (Tabela 8).

Tabela 8. Composição química na matéria natural da carcaça de dourados alimentados com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.

	Dietas					<i>P valor</i>
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28	
Umidade (g kg ⁻¹)	697,80 (0,62)	699,44 (0,37)	689,97 (0,40)	709,53 (0,37)	720,37 (0,10)	0,1360*
Proteína (g kg ⁻¹)	165,67 (2,54)	167,26 (1,21)	167,55 (0,69)	161,74 (0,86)	158,71 (0,97)	0,1771*
Energia (MJ kg ⁻¹)	6,95 (0,17) ^{ab}	6,70 (0,15) ^{ab}	7,25 (0,15) ^a	6,50 (0,14) ^{ab}	6,01 (0,03) ^b	0,0204
Lipídeos (g kg ⁻¹)	72,26 (1,71) ^a	68,99 (1,42) ^{ab}	73,06 (1,80) ^a	63,49 (1,87) ^{ab}	57,69 (0,54) ^b	0,0154
Matéria mineral (g kg ⁻¹)	33,10 (0,84) ^b	34,84 (0,23) ^b	34,18 (0,52) ^b	36,64 (0,52) ^{ab}	39,50 (0,32) ^a	0,0059
IVS (%)	5,47 (0,12)	5,88 (0,19)	6,01 (0,22)	5,36 (0,13)	5,07 (0,08)	0,2332*
IHS (%)	1,10 (0,06)	0,95 (0,02)	1,15 (0,09)	1,00 (0,05)	0,98 (0,04)	0,7019*

VS=viscero-somático; HS=hepato-somático.

Médias (n=4) seguidas de erro padrão entre parênteses; Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey $P < 0,05$); *Não significativo ($P < 0,05$)

Todos os valores de lipídeos e energia foram superiores àqueles relatados por Dairiki et al. (2013) para o dourado, porém, os menores valores foram registrados para os peixes alimentados com a dieta FS28, que diferiram daqueles alimentados com a dieta FS14 ($P < 0,05$). A composição lipídica da carcaça teve correlação moderadamente negativa ($r = -0,55$; $p = 0,0118$) com a da dieta, demonstrando uma tendência a aumento de gordura nos peixes que consumiram menores proporções de lipídios na dieta.

A utilização dos lipídeos dietéticos pelo dourado é dependente da quantidade de carboidrato na dieta, o qual pode ser utilizado como fonte de energia para os peixes atuando como poupador de proteínas. Entretanto, grandes quantidades de amido na dieta podem diminuir a digestão de proteínas e, por consequência, diminuir a quantidade disponível para o metabolismo (Moro et al., 2016; Phillips Jr., 1969). Apesar de não ter sido feita a quantificação do teor de amido das dietas, é possível que tenha ocorrido um desbalanceamento na relação amido:lipídeo, pois concomitante à inclusão de hidrolisado nas dietas foi reduzida a inclusão da dieta controle – que possui maior teor de amido calculado. A redução na quantidade de amido e as maiores quantidades de aminoácidos livres pode ter influenciado a utilização dos lipídeos como fonte de energia. Apenas a composição lipídica dos peixes alimentados com a dieta FS28 foi inferior àquelas registradas por Moro et al. (2016) para os peixes com melhor desempenho - alimentados com as dietas com 0,7:1,0 e 1,0:1,0 de relação amido:lipídeo.

Apesar de terem sido registradas diferenças estatísticas para lipídeos na carcaça, a inclusão de hidrolisados de fígados suínos na dieta não influenciou ($P > 0,05$) os índices

hepatossomáticos dos dourados que, segundo Moro et al. (2016), aumentam linear ($y = 0,2359x + 0,9986$, $R^2 = 0,7655$) e concomitante à relação amido:lipídeo. Ao utilizar a equação proposta e os IHS para definir a relação amido:lipídeo da dieta, a suposta relação amido:lipídeo da dieta FS14 ficaria semelhante àquelas consideradas ideais para a espécie.

Além da deposição de lipídeo, o aumento em peso e volume do fígado pode ser resultado da deposição de glicogênio, o qual tende a diminuir quando ocorre alta carga metabólica resultante de teores elevados de carboidratos dietéticos (Hemre et al., 2002; Moro et al., 2010, 2016). Os valores encontrados para IHS nos peixes alimentados com as dietas FS7 e FS28 estavam abaixo dos descritos para os peixes alimentados com as menores inclusões de amido (0,0:1,0). Apesar de não ter sido notada qualquer influência no IHS dos peixes, a inclusão de hidrolisados deve ter reduzido a proporção amido:lipídeo e, assim, influenciado na deposição de lipídeo na carcaça (Moro et al., 2016; Nankervis et al., 2000; Shimeno et al., 1993).

A inclusão de hidrolisados proteicos na dieta de peixes pode influenciar a composição lipídica da carcaça, principalmente quando ocorre uma grande quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres na sua composição. A suplementação de 20 g kg⁻¹ de hidrolisado de krill e de resíduos de atum em dietas para pargo e linguado não alteraram as suas composições corporais (Khosravi et al., 2015). Porém, níveis de 320 g kg⁻¹ de hidrolisados de peixe não filtrados e ultra-filtrados na dieta de trutas arco-íris reduziram a deposição de lipídios na carcaça em detrimento dos menores níveis de inclusão (160 g kg⁻¹) (Aksnes et al., 2006). A menor deposição lipídica nos peixes alimentados com maiores níveis de hidrolisados na dieta não possui uma explicação clara, porém, aparentemente é reflexo do desbalanceamento da relação amido:lipídeo da dieta e do menor consumo dos peixes alimentados com a dieta FS28.

4.2.2. Condições hematológicas e imunológicas

Os menores índices de hematócrito e proteína plasmática foram registrados nos dourados alimentados com a dieta FS28, que diferiram ($P < 0,05$) daqueles que consumiram as dietas FS0, FS7 e FS14 (Tabela 9). Os maiores valores de hemoglobina foram encontrados nos peixes alimentados com a dieta FS14, que diferiram das dietas FS21 e FS28 ($P < 0,05$). Por outro lado, os menores índices de volume corpuscular médio (VCM) foram encontrados no sangue de peixes alimentados com a dieta FS14 e FS21, diferentemente ($P < 0,05$) dos índices registrados nos peixes que consumiram FS0.

Tabela 9. Hematologia e imunologia em dourado alimentado com dietas contendo níveis crescentes de hidrolisados de fígado suíno.

Parâmetros avaliados	Dietas					<i>P</i> valor
	FS0	FS7	FS14	FS21	FS28	
Htc ¹ (%)	44,21 (0,51) ^a	42,75 (0,39) ^{ab}	43,50 (0,27) ^a	39,21 (0,24) ^{bc}	38,25 (0,25) ^c	0,0001
PPT ² (mg dL ⁻¹)	6,03 (0,08) ^a	5,68 (0,06) ^{ab}	5,89 (0,05) ^a	5,16 (0,04) ^{bc}	5,00 (0,04) ^c	<0,0001
Hb ³ (g dL ⁻¹)	6,74 (0,09) ^{ab}	6,73 (0,06) ^{ab}	6,99 (0,08) ^a	6,00 (0,06) ^b	6,13 (0,04) ^b	0,0013
CHCM ⁴ (%)	15,06 (0,05)	15,78 (0,13)	16,33 (0,13)	15,72 (0,12)	16,04 (0,12)	0,1037*
Etc ⁵ (10 ⁶ µL ⁻¹)	2,88 (0,05)	2,86 (0,05)	3,25 (0,05)	3,03 (0,06)	2,84 (0,03)	0,1649*
VCM ⁶ (fL)	159,92 (3,39) ^a	152,07 (3,42) ^{ab}	130,91 (1,82) ^b	129,49 (3,19) ^b	135,79 (1,92) ^{ab}	0,0373
Burst ⁷ (mg mL ⁻¹)	6,91 (0,06)	7,00 (0,05)	7,18 (0,06)	6,60 (0,05)	6,57 (0,06)	0,0524*
Lisozi ⁸ (µg µL ⁻¹)	4,05 (0,18) ^a	2,28 (0,08) ^b	3,34 (0,19) ^{ab}	3,33 (0,15) ^{ab}	2,65 (0,04) ^{ab}	0,0162

¹Hematócrito; ²Proteína plasmática total; ³Hemoglobina; ⁴Concentração de hemoglobina corpuscular média;

⁵Eritrócitos; ⁶Volume corpuscular médio; ⁷Atividade respiratória de leucócitos; ⁸Lisozi⁸ plasmática

Médias (n=8) seguidas de erro padrão entre parênteses; Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey P < 0,05); *Não significativo (P < 0,05)

O crescimento, o ganho de peso e a conversão alimentar aparente são frequentemente os principais parâmetros de produtividade e economicidade considerados na piscicultura comercial e, sem dúvida, a nutrição pode ser considerada como o principal fator para o sucesso da produção. Outros importantes fatores a serem considerados são: eficiência alimentar, sobrevivência, resistência a estresse e infecção, e sucesso reprodutivo. O sucesso produtivo é resultado da convergência de uma série de fatores que conferem condições de higidez e, consequentemente, alta sobrevivência dos peixes e produtividade dos sistemas (Forster, 2011; Gatlin, 2003; Oliva-Teles, 2012).

A hematologia é uma ferramenta de fundamental importância para avaliar a higidez dos peixes por meio de suas condições de defesa orgânica, permitindo identificar as respostas dos peixes frente aos desafios de criação (Ranzani-Paiva et al., 2013). Porém, apesar dos avanços dos últimos anos, a falta de valores de referência e a grande diversidade de espécies faz com que a interpretação dos resultados hematológicos dos peixes seja algo bastante complexo (Clauss et al., 2008). O dourado, apesar de ser um peixe bastante estudado, não possui valores hematológicos de referência definidos e, portanto, a avaliação da sua higidez baseada nesses critérios pode estar equivocada.

Os valores registrados para proteína plasmática no sangue dos peixes alimentados com as dietas FS0, FS7 e FS14 estão próximos àqueles relatados em EMBRAPA (2009), e acima dos índices registrados nos peixes alimentados com FS21 e FS28, porém, superiores aos encontrados por Yamamoto (2015) para proteína sérica. Em medicina clínica a concentração de algumas proteínas (e.g. albumina) no plasma ou soro são frequentemente utilizadas como indicador da qualidade da proteína. A deficiência proteica normalmente é

resultado do decréscimo da síntese de proteínas, incluindo aquelas exportadas pelo fígado (Wu, 2013).

A inclusão de 60 g kg⁻¹ de hidrolisado de fígado suíno em dietas não alterou a proteína plasmática, triglicerídeos e colesterol no sangue de surubim do Iguaçu (Lewandowski et al., 2013). Da mesma forma, apesar de ter efeito sob o desempenho produtivo de pargos e linguado, baixos níveis de hidrolisado nas dietas não tiveram efeito sob a proteína plasmática e demais parâmetros hematológicos - hematócrito, hemoglobina, glicose, colesterol total, triglicerídeos - após 24 horas da última alimentação, (Bui et al., 2014; Khosravi et al., 2015). Em níveis maiores de inclusão de hidrolisado também não foram registradas diferenças ($P > 0,05$) entre as concentrações de proteína plasmática de Salmões do Atlântico após cinco horas da última alimentação, porém, foi observada uma maior concentração nos peixes alimentados com a dieta controle (sem hidrolisado) (Hevroy et al., 2005).

Apesar de não terem sido registradas elevadas concentrações de amônia nos tanques em que os ensaios foram conduzidos, as reduções do ganho de peso, da retenção proteica e da proteína plasmática nos peixes alimentados com as duas dietas com maiores níveis de inclusão de hidrolisado remetem a diferentes taxas de absorção e, por consequência, redução na síntese de aminoácidos (Peres e Oliva-Teles, 2005). A coleta de sangue foi realizada 15 horas após a última alimentação e, portanto, a absorção dos aminoácidos dos últimos tratamentos deve ter ocorrido mais rapidamente que aqueles com nenhuma ou menor inclusão de hidrolisado, ocasionando diferença na proteína plasmática, assim como já foi registrado com aminoácidos livres em dietas para carpas, trutas arco-íris e tilápias (Plakas et al., 1980; Schuhmacher et al., 1997; Yamada et al., 1982). Provavelmente, a porcentagem de proteína plasmática no sangue dos peixes alimentados com maiores quantidades de aminoácidos seria maior em coletas mais próximas da última alimentação.

A hipótese de aumento da excreção nitrogenada – principalmente nitrito – é realçada quando se considera as reduções de hemoglobina e hematócrito para os peixes alimentados com as dietas FS21 e FS28. A redução de taxas de hemoglobina, percentual de hematócrito e contagem de células vermelhas pode ser causada pela formação de metahemoglobina como resultado da ação do nitrito sobre as células vermelhas, tornando-as incapazes de transportar oxigênio (Ciji et al., 2015). A capacidade de absorção e metabolização de aminoácidos livres pode ser dependente da fase de vida do peixe - juvenis podem ser menos hábeis na absorção, pois a atividade de aminopeptidase tem perfil ontogenético e é muito afetada pela fonte dietética de substrato. Essa capacidade reflete significativamente na excreção de resíduos

nitrogenados, os quais ocorrem mais rapidamente e em maior quantidade em trutas alimentadas com dietas que contêm aminoácidos livres que em peixes alimentados com dietas que contêm pequenos peptídeos ou sem a inclusão dos mesmos (Dabrowski et al., 2003). Ensaio com dourado com o objetivo de avaliar a metabolização dos aminoácidos e excreção de resíduos nitrogenados são escassos e até o momento não há relatos de excesso de excreção nitrogenada em ensaios com aminoácidos livres (Dairiki et al., 2013). A exposição crônica à amônia não-ionizada (NH_3) em concentração de até $0,46 \text{ mgNH}_3 \text{ L}^{-1}$ (pH 8,1) não influencia no desempenho de dourados (Streit, 2006), portanto, provavelmente este fator não influenciou nas diferenças produtivas registradas.

Como a maioria da mortalidade ocorreu por canibalismo, altas concentrações de nitrito provavelmente não foi a principal causa, porém, podem ter contribuído para uma condição de maior estresse. A condição de estresse aparentemente teve pouca influência sob a atividade imune nos peixes, porém, testes específicos para mensuração de estresse não foram realizados nesse trabalho. Os menores valores de lisozima no sangue dos peixes foram registrados naqueles que se alimentaram da dieta FS7, porém, semelhantes ($P > 0,05$) às dietas FS14, FS21 e FS28, os quais também não foram diferentes daqueles encontrados nos peixes alimentados com a dieta controle – valor máximo encontrado.

Os valores imunológicos costumam oscilar bastante dentro do mesmo grupo de indivíduos e, portanto, o uso do método estatístico pode influenciar na compreensão dos resultados. Os índices de ‘burst’ oxidativo, por exemplo, foram visualmente menores no sangue dos peixes alimentados com as dietas FS21 e FS28. Entretanto, os resultados do teste de média de Tukey não registraram diferenças entre os indivíduos ($P > 0,05$). Por outro lado, resultados do uso do teste de média de Duncan – menos restritivo – permite detectar efeito da dieta sob a atividade respiratória de leucócitos (FS0^{ab} ; FS7^{ab} ; FS14^{a} ; FS21^{b} ; FS28^{b}) ($P < 0,05$).

Além da sua função nutricional, os hidrolisados são estudados como fonte de peptídeos bioativos com importantes funções biológicas e como imunoestimulantes (Bogwald et al., 1996; Centenaro et al., 2014; Halim et al., 2016; Harnedy e FitzGerald, 2012). Peptídeos bioativos inativos em proteínas nativas requerem a libertação proteolítica (digestão *in vivo*) ou por hidrólise (digestão enzimática *in vitro*) para demonstrar suas funções biológicas como, por exemplo, anti-oxidação, anti-proliferação, anti-hipertensão e anti-inflamatória (Halim et al., 2016). Porém, as fontes proteicas e de enzima, o grau de hidrólise, o peso molecular dos peptídeos e a quantidade de inclusão na dieta interferem na capacidade

imunoestimulante (Bogwald et al., 1996; Bui et al., 2014; Tang et al., 2008; Zheng et al., 2013).

Os hidrolisados originados de fontes proteicas marinhas e de baixo peso molecular são aqueles sobre os quais se tem mais informação sobre seus efeitos imunoestimulantes (Bui et al., 2014; Halim et al., 2016; Wei et al., 2015). O hidrolisado de peixe com peptídeo de baixo peso molecular, em níveis baixos de inclusão nas dietas, afeta a solubilidade e a atividade antioxidante, mas pode não afetar a atividade de lisozima sérica, de NBT, de superóxido dismutase, fosfatases ácida e alcalina em linguados e pargos (Bui et al., 2014; Centenaro et al., 2014; Halim et al., 2016; Zheng et al., 2013). A suplementação de hidrolisado de krill e de resíduos de atum em dietas aumenta a atividade das lisozimas para o pargo, assim como hidrolisados de peixe aumenta a atividade em pescadas e em robalo japonês. Porém, para o linguado, apenas o hidrolisado de krill é efetivo (Khosravi et al., 2015; Liang et al., 2006; Tang et al., 2008).

Estudos sobre os efeitos imunológicos da adição de hidrolisado de fígado suíno em dietas para peixes ainda são aparentemente inexistentes, ou pelo menos escassos. Nesse trabalho, embora não existam valores de referência para poder afirmar se os peixes alimentados com níveis máximos de hidrolisados estavam em condições limitantes de saúde para a espécie, os peixes que apresentaram condições imunológicas mais adequadas foram alimentados com dietas sem hidrolisado de fígado suíno ou com as menores inclusões.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hidrolisados proteicos são altamente digestíveis para o dourado e os produtos com origem de resíduos de tilápia e fígados de suínos tiveram os melhores coeficientes de digestibilidade aparente para praticamente todos os nutrientes e energia.

O perfil enzimático digestivo foi afetado pela quantidade de nutrientes e, no caso da lipase, aparentemente há uma adaptabilidade ao longo do trato digestório concomitante a passagem de lipídeos.

O hidrolisado de fígado suíno melhora o desempenho produtivo de dourados até a inclusão de 140 g kg⁻¹ na dieta.

A ultrafiltração de hidrolisados de fígado suíno pode ser uma alternativa para aumentar a proporção do produto nas dietas.

Mais estudos com o uso de hidrolisados precisam ser feitos para que seu uso em dietas para peixes carnívoros seja viável, em especial aqueles que possuem como matéria-prima subprodutos de abate de animais terrestres. Atenção destacada deve ser dada, também, à viabilidade econômica do seu uso em substituição as demais fontes proteicas.

REFERÊNCIAS

- Abowei, J.F.N., Ekubo, A.T., 2011. Some Principles and Requirements in Fish Nutrition. Br. J. Pharmacol. Toxicol. 2, 163–178.
- Adibi, S.A., Gray, S.J., Menden, E., 1967. The kinetics of amino acid absorption and alteration of plasma composition of free amino acids after intestinal perfusion of amino acid mixtures. Am. J. Clin. Nutr. 20, 24–33.
- Adler-Nissen, J., 1984. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. J. Chem. Technol. Biotechnol. 34, 215–222.
- Adler-Nissen, J., 1976. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. J. Agric. Food Chem. 24, 1090–1093.
- Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I., Júlio Junior, H.F., 2003. Migratory fish of upper Paraná River basin, Brazil, in: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C. (Eds.), Migratory Fishes of South America: Biology Social Importance and Conservation Status. Victoria, pp. 19–98.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P.M., Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C., 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. Aquaculture 273, 641–655.
- Aguirre, P., Medale, F., Kaushik, S.J., 1995. Influence de la nature des glucides alimentaires sur l'utilisation de 2 sources protéiques par la truite Arc-en-ciel élevée à 8° ou 18°C. Reprod. Nutr. Développement 35, 129–136.
- Aksnes, A., Hope, B., Albrektsen, S., 2006. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. II: Flesh quality, absorption, retention and fillet levels of taurine and anserine. Aquaculture 261, 318–326.
- Albro, P.W., Hall, R.D., Corbett, J.T., Schroeder, J., 1985. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.-) by bile salts. Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab. 835, 477–490.
- Almeida, L.C., Lundstedt, L.M., Moraes, G., 2006. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. Aquac. Nutr. 12, 443–450.
- Anderson, D.P., Siwicki, A.K., 1995. Basic hematology and serology for fish health programs, in: Shariff, M., Arthur, J.R., Subasinghe, J.P. (Eds.), Diseases in Asian

- Aquaculture II. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 185–202.
- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2016. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *J. Appl. Phycol.* 28, 511–524.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Rønnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293–304.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed. Gaithersburg.
- Bakke, S., Jordal, A.-E.O., Gómez-Requeni, P., Verri, T., Kousoulaki, K., Aksnes, A., Rønnestad, I., 2010. Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 156, 48–55.
- Batista, I., 2011. Hidrolisado proteico de pescado, in: Gonçalves, A.A. (Ed.), *Tecnologia Do Pescado - Ciência, Tecnologia, Inovação E Legislação*. Atheneu, São Paulo, pp.386–398.
- Berge, G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, B., 2004. Intestinal absorption of amino acids in fish: Kinetics and interaction of the in vitro uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 229, 265–273.
- Berge, G.M., Storebakken, T., 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 145, 205–212.
- Bogwald, J., Dalmo, R., Mcqueen L., R., Stenberg, E., Gildberg, A., 1996. The stimulatory effect of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L., on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 3–16.
- Borghesi, R., 2008. Exigências em proteína e energia e valor biológico de alimentos para o dourado *Salminus brasiliensis*. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Borghesi, R., 2004. Avaliação físico-química, nutricional e biológica elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Borghesi, R., Dairiki, J.K., Cyrino, J.E.P., 2009. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. *Aquac. Nutr.* 15, 453–458.
- Borghesi, R., Portz, L., Oetterer, M., Cyrino, J.E.P., 2008. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia

- (*Oreochromis niloticus*). Aquac. Nutr. 14, 242–248.
- Borghetti, J.R., Canzi, C., Fernandez, D.R.A., 1990. A influência de diferentes níveis de proteína no crescimento do dourado (*Salminus maxillosus*). Brazilian Arch. Biol. Technol. 33, 683–689.
- Borghetti, J.R., Ostrensky, A., 2002. Panorama atual, problemas e perspectivas para a pesca e para a aquicultura continental no Brasil, in: Rebouças, A.C., Braga, B., Tundisi, J. (Eds.), Águas Doces No Brasil: Capital Ecológico, Uso E Conservação. Editora Escrituras, São Paulo, pp. 451–471.
- Borquez, A., Cerqueira, V.R., 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis* effect of some chemical substances. Aquaculture 169, 25–35.
- Botaro, D., Furuya, W.M., Silva, L.C.R., Dos Santos, L.D., Silva, T.S. de C., Dos Santos, V.G., 2007. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. Rev. Bras. Zootec. 36, 517–425.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Braga, L.G.T., Borghesi, R., Cyrino, J.E.P., 2008. Apparent digestibility of ingredients in diets for *Salminus brasiliensis*. Pesqui. Agropecu. Bras. 43, 271–274.
- Braga, L.G.T., Borghesi, R., Dairiki, J.K., Cyrino, J.E.P., 2007. Trânsito gastrintestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. Pesqui. Agropecu. Bras. 42, 131–134.
- Britski, H.A., Silimon, K.Z.S., Lopes, B.S., 1999. Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Embrapa-SPI, Brasília.
- Browdy, C.L., Hulata, G., Liu, Z., Allan, G. I., Sommerville, C., Passos de Andrade, T., Pereira, R., Yarish, C., Shpigle, M., Chopin, T., Robinson, S., Avnimelech, Y., Lovatelli, A., 2012. Novel and emerging technologies: can they contribute to improving aquaculture sustainability?, Farming the Water for People and Food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture 2010. Roma e Bangkok.
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K.-J., 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture 418–419, 11–16.
- Bureau, D.P., Hua, K., 2006. Letter to the Editor of Aquaculture. Aquaculture 252, 103–105.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein

- hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109–119.
- Cardoso, A.P., Radünz Neto, J., Medeiros, T.D.S., Knöpker, M.A., Lazzari, R., 2004. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. *Acta Sci. Anim. Sci.* 26, 457–462.
- Centenaro, G.S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M.L., Prentice, C., 2014. Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antioxidant Activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2877–2893.
- Chakrabarti, I., Gani, M.A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 112, 167–177.
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 135, 3020–3038.
- Cho, C.Y., Hynes, J.D., Wood, K.R., Yoshida, H.K., 1994. Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* 124, 293–305.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J., 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout, in: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. Heinemann, pp. 239–247.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T., Kumarnsit, E., 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquac. Nutr.* 19, 773–784.
- Ciji, A., Sahu, N.P., Pal, A.K., Akhtar, M.S., 2015. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. *Aquac. Res.* 46, 2013–2024.
- Cione, A.L., Las, M. De, Azpelicueta, M., 2013. The first fossil species of Salminus, a conspicuous South American freshwater predatory fish (Teleostei, Characiformes), found in the Miocene of Argentina. *J. Vertebr. Paleontol.* 4634, 1051–1060.
- Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E., 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 11, 445–462.
- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550–552.

- Correa, C.F., de Aguiar, L.H., Lundstedt, L.M., Moraes, G., 2007. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 147, 857–862.
- Corrêa, R. de O., 2016. Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*). Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Cyrino, J.E.P., Fracalossi, D.M., 2012. A pesquisa em nutrição de peixes e o desenvolvimento da aquicultura no Brasil: uma perspectiva histórica, in: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), *Nutriaqua: Nutrição E Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis.
- Cyrino, J.E.P., Roubach, R., Fracalossi, D.M., 2012. Avanços na alimentação e nutrição de peixes carnívoros de água doce, in: Débora Fracalossi, José Eurico Possebon Cyrino (Eds.), *Nutriaqua: nutrição E Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, pp. 283–293.
- Da Cruz, T.M.P., Moretti, D.B., Nordi, W.M., Cyrino, J.E.P., Machado-Neto, R., 2016. Intestinal epithelium of juvenile dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) fed diet with lyophilized bovine colostrum. *Aquac. Res.* 47, 561–569.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: present «state of the art» and perspectives. *Reprod. Nutr. Développement* 24, 807–833.
- Dabrowski, K., Lee, K.-J., Rinchard, J., 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J. Nutr.* 133, 4225–9.
- Dairiki, J.K., 2009. Exigência em aminoácidos e farelo de soja na nutrição de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816). Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Dairiki, J.K., Borghesi, R., Dias, C.T. dos S., Cyrino, J.E.P., 2013. Lysine and arginine requirements of *Salminus brasiliensis*. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48, 1012–1020.
- Dairiki, J.K., Dias, C.T. dos S., Cyrino, J.E.P., 2007. Lysine Requirements of Largemouth Bass, *Micropterus salmoides* : A Comparison of Methods of Analysis of Dose-Response Trials Data. *J. Appl. Aquac.* 19, 1–27.
- Dauksas, E., Slizyte, R., Rustad, T., Storro, I., 2004. Bitterness in Fish Protein Hydrolysates

- and Methods for Removal. J. Aquat. Food Prod. Technol. 13, 101–114.
- De Plaza, M.L.F., 1950. Una Contribuicion al conocimiento del dorado (*Salminus Maxillosus* Cuv. y Val.). Rev. del Mus. La Plata (Nueva Ser. 171–214.
- De Vareilles, M., Richard, N., Gavaia, P.J., Silva, T.S., Cordeiro, O., Guerreiro, I., Yúfera, M., Batista, I., Pires, C., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, P.M., Rønnestad, I., Fladmark, K.E., Conceição, L.E.C., 2012. Impact of dietary protein hydrolysates on skeleton quality and proteome in *Diplodus sargus* larvae. J. Appl. Ichthyol. 28, 477–487.
- Dieterich, F., 2014. Desenvolvimento, avaliação físico-química e biológica de hidrolisado proteico de resíduos agroindustriais para surubim. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Donadelli, R.A., 2014. Farinha de vísceras de aves como fonte proteica alternativa na nutrição do dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier , 1816). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Eigenmann, C.H., 1916. On the species of Salminus. Ann. Carnegie Museum 10, 91–92.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays, in: Stolen, T.C., Fletcher, P.D., Anderson, B.S., Roberson, B.S., Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, New Jersey, pp. 101–104.
- El-Sayed, A.-F.M., 2013. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and shrimp? a comprehensive review. Rev. Aquac. 6, 241–255.
- EMBRAPA, 2009. Relação Peso-Comprimento, Fator de Condição e Parâmetros Hematológicos de Dourado *Salminus brasiliensis* Cultivado em Condições Experimentais. Bol. Pesqui. e Desenvolvimento/ Embrapa Agropecu. Oeste 51, 24.
- Espe, M., Lemme, A., Petri, A., El-Mowafi, A., 2006. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? Aquaculture 255, 255–262.
- Espe, M., Lied, E., 1994. Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis? Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 107, 249–254.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.
- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.
- FAO, 1995. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome.
- Ferraris, R.P., Ahearn, G.A., 1984. Review sugar and amino acid transport in fish intestine. Comp. Biochem. Physiol. 77, 397–413.

- Flora, M.A. Della, Maschke, F., Ferreira, C.C., Pedron, F.D.A., 2010. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). Acta Vet. Bras. 4, 7–14.
- Forster, I.P., 2011. Food acquisition and digestion | Dietary requirements of fish under culture conditions, in: Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier, pp. 1617–1622.
- Fracalossi, D.M., Meyer, G., Santamaria, F.M., Weingartner, M., Zaniboni-Filho, E., 2004. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Sci. Anim. Sci. 26, 345–352.
- Fracalossi, D.M., Rodrigues, A.P.O., Silva, T.S. de C., Cyrino, J.E.P., 2012. Técnicas experimentais em nutrição de peixes, in: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), Nutriaqua: Nutrição E Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, pp. 37–63.
- Fries, E.M., Luchesi, J.D., Costa, J.M., Signor, A.A., Boscolo, W.R., Feiden, A., 2011. Hidrolisados cárneos proteicos em rações para alevinos de kinguio (*Carassius auratus*). Bol. Inst. Pesca 37, 401–407.
- Froese, R., Pauly, D., 2016. *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) [WWW Document]. Fishbase. URL www.fishbase.org (accessed 5.31.16).
- Furlan, E.F., Oetterer, M., 2002. Hidrolisado proteico de pescado. Rev. Ciência e Tecnol. 79–90.
- Gatlin, D.M., 2003. 12 – Nutrition and Fish Health, in: Fish Nutrition. pp. 671–702.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquac. Res. 38, 551–579.
- Géry, J., Lauzanne, L., 1990. Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Cybium 14, 113–124.
- Gildberg, a., Johansen, a., Bogwald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138, 23–34.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Am. J. Clin. Pathol. 56, 35–39.
- Goosen, N.J., de Wet, L.F., Görgens, J.F., 2014. The effects of protein hydrolysates on the

- immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* 428–429, 243–248.
- Guadix, A., Guadix, E.M., Paez-Dueñas, M.P., Gonzalez-Tello, P.Y., Camacho, F., 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharm.* 41, 79–89.
- Günther, A., 1864. A catalogue of the fishes of the British Museum, Vol. V. ed. Taylor and Francis, Londres.
- Halim, N.R.A., Yusof, H.M., Sarbon, N.M., 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 51, 24–33.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets : effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776.
- Hardy, R.W., 2001. Nutritional Deficiencies in Commercial Aquaculture: Likelihood, Onset, and Identification, in: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), *Nutrition and Fish Health*. The Haworth Press, New York, pp. 131–148.
- Hardy, R.W., Barrows, F.T., 2002. Diet Formulation and Manufacture, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Elsevier, pp. 505–600.
- Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J. Funct. Foods* 4, 6–24.
- Hemre, G.-I., MØmmesen, T.P., Krogdahl, A., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175–194.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000a. *Yucca Schidigera* Extract, in: *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 551–555.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000b. Fish Protein Concentrate (Hydrolysed), in: *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 192–197.
- Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac. Nutr.* 11, 301–313.
- Hidaka, I., Kiyohara, S., Oda, S., 1977. Gustatory response in the puffer-III stimulatory effectiveness of nucleotides and their derivatives. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 43, 423–428.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, a., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283.

- Hilbig, C.C., Boscolo, W.R., Feiden, A., Dieterich, F., Lorenz, E.K., Zaminhan, M., 2012. Feeding rate for pacu reared in net cages. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 1570–1575.
- Hofer, R., Schiemer, F., 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia* 48, 342–345.
- IBGE, 2013. Produção Pecuária Municipal. Rio de Janeiro.
- IFFO - The Marine Ingredients Organisation, 2013. Is aquaculture growth putting pressure on feed fish stocks ? And is the growth of aquaculture being restricted by finite supplies of fishmeal and fish ? [WWW Document]. IFFO Positional Statement. URL <http://www.iffonet/default.asp?contentID=817>
- Khosravi, S., Thi, H., Bui, D., Rahimnejad, S., Fournier, V., Kim, S., Jeong, J., Lee, K., 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) 435, 371–376.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102, 1317–1327.
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M., Kentouri, M., 2015. Effects of Fish Meal Replacement by a Soybean Protein on Growth, Histology, Selected Immune and Oxidative Status Markers of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *J. World Aquac. Soc.* 46, 115–128.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181–201.
- Kolkovski, S., Czesny, S., Dabrowski, K., 2000. Use of Krill Hydrolysate as a Feed Attractant for Fish Larvae and Juveniles. *J. World Aquac. Soc.* 31, 81–88.
- Koplovitz, G., McClintock, J., Amsler, C., Baker, B., 2009. Palatability and chemical anti-predatory defenses in common ascidians from the Antarctic Peninsula. *Aquat. Biol.* 7, 81–92.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C., 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 205–214.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B. a., 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem.* 48, 657–666.

- Krogdahl, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition : digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* 11, 103–122.
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M., 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac. Res.* 41, 333–344.
- Kurtovic, I., Marshall, S.N., Zhao, X., Simpson, B.K., 2009. Lipases from Mammals and Fishes. *Rev. Fish. Sci.* 17, 18–40.
- Lehninger, A.L., 2000. *Lehninger principles of biochemistry.*, 3rd ed. Worth Publishers, New York.
- Lewandowski, V., Decarli, J.A., Pedron, F. de A., Feiden, A., Signor, A., Boscolo, W.R., 2013. Hidrolisados cárneos na alimentação do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderma*). *Rev. Bras. Ciência Veterinária* 20, 222–226.
- Liang, M., Wang, J., Chang, Q., Mai, K., 2006. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier et Valenciennes, 1828). *Aquac. Res.* 37, 102–106.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M., 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by ProtamexTM protease. *Process Biochem.* 37, 1263–1269.
- Lima, F.C.T., Britski, H. a., 2007. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 5, 237–244.
- Lopera-Barreto, N.M., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Medez, L.D.V., Povenda-Parra, A.R., 2011. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. Agrolivros, Guaíba.
- Lovell, T., 1998. *Nutrition and feeding of fish.* Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- Lovshin, L.L., Cyrino, J.E.P., 1998. Status of commercial freshwater fish culture in Brazil. *World Aquac.* 29, 23–41.
- Lundstedt, L., Melo, J.F.B., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 137, 331–339.
- Luz, R.K., Ferreira, A.A., Reynalte-Tataje, D.A., Maffezzoli, G., Zaniboni-Filho, E., 2000. Larvicultura de pós-larvas de dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), in: *Simpósio Brasileiro de Aquicultura. Simbraq*, Florianópolis, p. 11.
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., Brenes, A., 2015. Protein hydrolysates from animal

- processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Res. Int.* 73, 204–212.
- McGoogan, B.B., Reigh, R.C., 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture* 141, 233–244.
- Melo, J.F.B., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 145, 181–187.
- Moraes, G., Almeida, L.C., 2014. Nutrição e aspectos funcionais da digestão de peixes, in: Baldisserotto, B., Cyrino, J.E., Urbinati, E.C. (Eds.), *Biologia E Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal, pp. 233–252.
- Moraes Filho, M.B., Shubart, O., 1955. Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus*) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, São Paulo.
- Moro, G.V., Camilo, R.Y., Moraes, G., Fracalossi, D.M., 2010. Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. *Aquac. Res.* 41, 394–400.
- Moro, G.V., Silva, T.S.C., Cyrino, J.E.P., 2015. Feed processing affected the digestibility of carbohydrate sources for dourado *Salminus brasiliensis*. *Aquac. Nutr.* 1–6.
- Moro, G. V., Silva, T.S.C., Zanon, R.B., Cyrino, J.E.P., 2016. Starch and lipid in diets for dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816): growth, nutrient utilization and digestive enzymes. *Aquac. Nutr.* 22, 890–898.
- MPA, 2012. Boletim Estatístico Da Pesca e Aquicultura: Brasil 2010. Brasília.
- Müller, J., Troschel, F.H., 1845. *Horae ichthyologicae, Beschreibung und Abbildung neuer Fische. Die Familie Characinen*. Verlag von Veit & Comp., Berlin.
- Nankervis, L., Matthews, S., Appleford, P., 2000. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient retention and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 191, 323–335.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–10.
- Nguyen, H.T.M., Pérez-Gálvez, R., Bergé, J.P., 2012. Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 324–325, 127–134.

- Nose, T., Arai, S., Lee, D.L., Hashimoto, Y., 1974. A note on amino acids essential for growth of young carp. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 40, 903–908.
- NRC, N.R.C., 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, D.C.
- NRC, N.R.C., 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academies Press, Washington, D.C.
- Oetterer, M., 1993. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. *Aliment. e Nutr.* 5, 119–134.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83–108.
- Oliva-teles, A., Cerqueira, A.L., Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture* 179, 195–201.
- Oliva-teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish, in: Davis, D.A. (Ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier, Cambridge, pp. 203–233.
- Pastore, S.C.G., Gaiotto, J.R., Ribeiro, F.A.S., Nunes, A.J.P., 2012. Formulação de rações e boas práticas na fabricação, in: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), *Nutriaqua: Nutrição E Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, pp. 295–345.
- Pasupuleti, V.K., Braun, S., 2008. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates, in: *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 11–32.
- Pasupuleti, V.K., Holmes, C., Demain, A.L., 2010. Applications of protein hydrolysates in biotechnology, in: Pasupuleti, V.K., Demain, A.L. (Eds.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer Dordrecht Heidelber, London, pp. 1–9.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquac. Res.* 34, 1111–1117.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2005. The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. *Aquaculture* 250, 755–764.
- Pezzato, L., Miranda, E., Barros, M., 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 31, 1595–1604.
- Phillips Jr., A.M., 1969. Nutrition, digestion, and energy utilization, in: Hoar, W.S., Randall, D. j. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 391–432.
- Plakas, S.M., Katayama, T., Tanaka, Y., Deshimaru, O., 1980. Changes in the levels of

- circulating plasma free amino acids of carp (*Cyprinus carpio*) after feeding a protein and an amino acid diet of similar composition. *Aquaculture* 21, 307–322.
- Portz, L., Furuya, W.M., 2012. Energia, proteína e aminoácidos, in: Débora Machado Fracalossi, José Eurico Possebon Cyrino (Eds.), *Nutriaqua: Nutrição E Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, pp. 65–77.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., De Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. *Eduem*, Maringá.
- Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H., 2004. Feed intake , growth , and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 239, 331–349.
- Rérat, A., Nunes, C.S., 1988. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. *Br. J. Nutr.* 60, 121–136.
- Ribeiro, D.F.O., Nuñez, a. P.D.O., 2008. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. *Aquaculture* 274, 65–71.
- Rodrigues, S.S., Menin, E., 2006. Anatomia bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817). *Biotemas* 19, 41–50.
- Rønnestad, I., Conceição, L.E., Aragão, C., Dinis, M.T., 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *J. Nutr.* 130, 2809–2812.
- Rust, M.B., 2003. Nutritional Physiology, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Elsevier, pp. 367–452.
- Sales, J., Britz, P.J., 2003. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for South African abalone (*Haliotis midae* L.). *Aquac. Nutr.* 9, 55–64.
- Schuhmacher, A., Wax, C., Gropp, J.M., 1997. Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet. *Aquaculture* 151, 15–28.
- Schutz, J.H., 2003. Avaliação de diferentes tipos de alimentos e fotoperíodos no crescimento e na sobrevivência de pós-larvas de dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Scorvo-Filho, J.D., Frascá-scorvo, C.M.D., Alves, J.M.C., De Souza, F.R.A., 2010. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 112–118.

- Seneriches, M.L.M., Chiu, Y.N., 1988. Effect of fishmeal on the growth, survival and feed efficiency of milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquaculture* 71, 61–69.
- Shepherd, C.J., Jackson, A.J., 2013. Global fishmeal and fish-oil supply : inputs , outputs and. *J. Fish Biol.* 83, 1046–1066.
- Shimeno, S., Ming, D.-C., Takeda, M., 1993. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 827–833.
- Silk, D.B.A., Grimble, G.K., Rees, R.G., 1985. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 44, 63–72.
- SINDIRAÇÕES, 2010. Indústria de alimentação animal: Boletim informativo do setor. São Paulo.
- Smith, C., Reay, P., 1991. Cannibalism in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 1, 41–64.
- Song, Z., Li, H., Wang, J., Li, P., Sun, Y., Zhang, L., 2014. Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 426–427, 96–104.
- Spix, J.B. von, Martius, K.F.P. von, 1929. *Selecta genera et species piscium : quos in itinere per Brasiliam, annis MDCCCXVII-MDCCCXX. Jussu et Auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae Regis Augustissimi. Monachii : Typis C. Wolf, Monachii : Types C. Wolf.*
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Chotikachinda, R., 2014. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarife*, Bloch) larvae. *Aquaculture* 428–429, 195–202.
- Streit, A.A.R., 2006. Efeito da exposição crônica à amônia (NH₃) no crescimento e nas aminotransferases de juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Sun, G., Liu, Y., Qiu, D., Yi, M., Li, X., Li, Y., 2016. Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquac. Res.* 47, 176–188.
- Tang, H., Wu, T., Zhao, Z., Pan, X., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 684–690.
- Teixeira, B., Machado, C.C., Fracalossi, D.M., 2010. Exigência proteica em dietas para alevinos do dourado (*Salminus brasiliensis*). *Acta Sci. Anim. Sci.* 32, 33–38.
- Vega-Orellana, O.M., Fracalossi, D.M., Sugai, J.K., 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*)

- larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture* 252, 484–493.
- Velasquez, S.F., Chan, M.A., Abisado, R.G., Traifalgar, R.F.M., Tayamen, M.M., Maliwat, G.C.F., Ragaza, J.A., 2016. Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Phycol.* 28, 1023–1030.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, pp. 270–277.
- Wei, Y., Liang, M., Mu, Y., Zheng, K., Xu, H., 2015. The effect of ultrafiltered fish protein hydrolysate level on growth performance, protein digestibility and mRNA expression of *PepT1* in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac. Nutr.* 1–12.
- Weingartner, M., Zaniboni-Filho, E., 2013. Biologia e cultivo de dourado, in: Bernardo Baldisserotto, Levy de Carvalho Gomes (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 245–274.
- Whiteman, K.W., Gatlin III, D.M., 2005. Evaluation of crystalline amino acid test diets including pH adjustment with red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 248, 21–25.
- Wintrobe, W.W., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol* 51, 32–49.
- Wu, G., 2013. *Amino acids : biochemistry and nutrition*. CRC Press, New York.
- Yamada, S., Tanaka, Y., Katayama, T., Sameshima, M., Simpson, K.L., 1982. Plasma amino acid changes in *Tilapia nilotica* fed a casein and a corresponding free amino acid diet. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 1783–1787.
- Yamamoto, F.Y., 2015. Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Ye, J.-D., Wang, K., Li, F.-D., Sun, Y.-Z., Liu, X.-H., 2011. Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal, blood meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. *Aquac. Nutr.* 17, e337–e347.
- Yu, D.-H., Gong, S.-Y., Yuan, Y.-C., Luo, Z., Lin, Y.-C., Li, Q., 2013. Effect of partial replacement of fish meal with soybean meal and feeding frequency on growth, feed

utilization and body composition of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker). Aquac. Res. 44, 388–394.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J. Nutr. 127, 608–14.

Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J., Chang, Q., 2013. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquac. Res. 44, 895–902.

APÊNDICES

APÊNDICE A.
 hidrolisados.

Perfil de enzimas digestivas de juvenis de dourados alimentados com

Enzimas	Atividade enzimática (UI)					<i>P</i> valor
	Controle	Resíduo Tilápia	Cabeça Atum	Fígado Suíno	Fígado Ave	
<i>Protease</i>						
Estômago	0,82 (0,04) ^b	0,82 (0,04) ^b	0,73 (0,03) ^b	1,27 (0,05) ^a	0,67 (0,02) ^b	0,0008
Cecos pilóricos	0,32 (0,00) ^a	0,27 (0,01) ^a	0,18 (0,02) ^a	0,25 (0,01) ^a	0,27 (0,01) ^a	0,0796*
Intestino	0,08 (0,01) ^a	0,07 (0,01) ^{ab}	0,03 (0,00) ^c	0,04 (0,00) ^{abc}	0,03 (0,00) ^{bc}	0,0241
Total	0,96 (0,08) ^{ab}	1,13 (0,05) ^{ab}	0,86 (0,06) ^b	1,51 (0,06) ^a	0,89 (0,04) ^b	0,0287
<i>Lipase</i>						
Estômago	1,61 (0,04) ^d	3,36 (0,06) ^a	3,22 (0,09) ^{ab}	2,72 (0,06) ^{bc}	2,19 (0,03) ^{cd}	0,0001
Cecos pilóricos	1,41 (0,02) ^a	0,66 (0,05) ^b	1,32 (0,07) ^a	1,60 (0,03) ^a	1,84 (0,07) ^a	0,0001
Intestino	1,23 (0,09) ^b	0,70 (0,01) ^c	1,40 (0,09) ^{ab}	1,80 (0,03) ^a	0,97 (0,02) ^{bc}	0,0001
Total	4,28 (0,08) ^c	4,55 (0,13) ^{bc}	5,73 (0,19) ^{ab}	6,33 (0,10) ^a	4,86 (0,12) ^{bc}	0,0005
<i>Amilase</i>						
Estômago	10,01 (0,38) ^a	10,26 (0,62) ^a	8,36 (0,22) ^a	7,90 (0,40) ^a	8,57 (0,51) ^a	0,5658*
Cecos pilóricos	106,55 (4,79) ^a	144,85 (6,06) ^a	93,30 (7,32) ^a	122,97 (4,27) ^a	126,57 (6,16) ^a	0,1883*
Intestino	59,66 (2,73) ^a	44,61 (3,33) ^{ab}	25,26 (1,39) ^c	24,26 (1,11) ^c	33,46 (1,27) ^{bc}	0,0001
Total	145,54 (14,25) ^a	184,83 (8,82) ^a	126,64 (8,68) ^a	152,80 (4,82) ^a	148,58 (7,37) ^a	0,3435*

Médias seguidas de erro padrão entre parênteses; Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$)

*Não significativo ($P < 0,05$)