

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS EM DIETAS
PARA TILÁPIA-DO-NILO

RENAN DE MATTOS BOTELHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU-SP

Novembro de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS EM DIETAS
PARA TILÁPIA-DO-NILO

RENAN DE MATTOS BOTELHO
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luíz Edivaldo Pezzato
COORIENTADORA: Profa. Dra. Helena Peres

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU-SP
Novembro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO- BOTUCATU (SP)

B748g Botelho, Renan de Mattos, 1988-
Grãos secos de destilaria com solúveis em dietas para
tilápia-do-Nilo / Renan de Mattos Botelho. - Botucatu :
[s.n.], 2015
viii, 84 f. : tabs.

Tese(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015
Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato
Coorientadora: Helena Peres
Inclui bibliografia

1. DDGS. 2. Disgestibilidade. 3. Nutrição e saúde. 4.
Oreochromis niloticus. I. Pezzato, Luiz Edivaldo. II.
Peres, Helena. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho". Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. (Campus de Botucatu). III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista,

Aos meus pais,

Valdeci Augusto Botelho e Fátima Regina de Mattos Botelho,
pelo amor, compreensão e incentivo!

Meus exemplos de caráter e perseverança;

À minha noiva,

Julcy Torriceli de Sousa,
pela amizade, cumplicidade e apoio irrestrito em todos os momentos;

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato,
pela amizade, incentivo e oportunidade de trabalharmos juntos!
Exemplo de vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, persistência, alegria e coragem para superar meus desafios. Sou grato por tudo que Deus me proporcionou na vida. Obrigado Senhor meu Deus!

À minha família e noiva, que torceram por mim, apoiaram e me confortaram nos momentos difíceis, me fortaleceram e proporcionaram momentos de alegria por toda minha caminhada. Muito obrigado por tudo, amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela orientação, confiança, amizade, companheirismo, ensinamentos e constante preocupação com minha formação. Obrigado Prof. Dr. Pezzato por tudo, foi e sempre será uma honra trabalharmos juntos!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Helena Peres, pelas contribuições e dedicação a este trabalho. Muito obrigado por tudo Profa. Dra. Helena;

À Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pela amizade, confiança, ensinamentos e todas as contribuições para realização deste trabalho, por toda a atenção dedicada a minha formação e encorajamento para dar meus próprios passos, me sinto também muito honrado por ter tido a chance de trabalharmos juntos. Muito obrigado Profa. Dra. Margarida!

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – FCA/UNESP/Botucatu, pela contribuição e ajuda nas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, pelas muitas conversas que contribuíram para este trabalho e pelos momentos de descontração que sempre foram alegres e abençoados. Muito Obrigado Prof. Dr. Dirlei, meu companheiro de muitas pescarias que passaram e que ainda virão!

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha pelos ensinamentos, amizade e ajuda nas análises químicas;

Ao Prof. Dr. Carlo Rossi Del Carratore, por ter fornecido a base dos conhecimentos para que pudesse chegar até aqui, por acreditar em mim, pelas oportunidades, incentivo, amizade e exemplo profissional. Muito obrigado Prof. Dr. Carlo.

À Hinglidj de Carvalho Müller (Cabrita), aluna do curso de graduação em Zootecnia – FMVZ/UNESP/Botucatu, pela amizade, companheirismo e auxílio com as análises bromatológicas;

Aos meus Amigos, Nuno Alves Cardoso, Guilherme Eduardo Sassi (Cachara), Pedro Luiz P. F. de Carvalho (Revoltado), Renie Venn Chan (China), Lucas Duarte (Careca) e Rafael Santos de Almeida (Portuga), pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e imensa ajuda proporcionada. Muito obrigado por tudo meus amigos!

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Peixes – AquaNutri: Vivian G. dos Santos, Caroline P. Teixeira, Ademir C. Fernandes Júnior, João Fernando A. Koch, Lara Genovez, Jakeline Marcela A. de Freitas, Juliana Mara Costa, Mariucha K. H. Rocha, Rafael L. da Silva, Pedro P. F. de Carvalho, Flávia M. Damasceno, Felipe T. Cintra, Eric P. de Araújo, Guilherme Eduardo Sassi, Leonardo Sato, Igor S. Tiagua, Paula Novelli, Paula Lima, Rafael Santos de Almeida, Hinglidj de Carvalho Müller, Renie Venn Chan, Matheus G. Trento, agradeço a todos pela imensa ajuda e amizade!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ-UNESP, Botucatu, pelos ensinamentos e disposição em ajudar seus alunos.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FMVZ, Seila C. C. Vieira e Ellen Cassemiro Guilhen;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2012/19233-2), pela concessão dos recursos financeiros e bolsa de estudos;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Formulation (%) and calculated composition of reference diet.....	42
Table 2. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %) of nutrients and energy of the experimental diets (% dry matter)	43
Table 3. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets.	44
Table 4. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %) of nutrients and energy of the test ingredients (% dry matter).	45
Table 5. Growth performance and feed utilization of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days.....	46
Table 6. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days	47
Table 7. Villus height (VH), crypt depth (CD) and villus:crypt ratio (V:C) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days	48
Table 8. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the CDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress.....	49
Table 9. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the CDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress.....	50

CAPÍTULO III

Table 1. Formulation (%) and calculated composition of reference diet.....	74
Table 2. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %) of nutrients and energy of the experimental diets (% dry matter)	75
Table 3. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets	76
Table 4. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %) of nutrients and energy of the test ingredients (% dry matter).	77
Table 5. Growth performance and feed utilization of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days.....	78

Table 6. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days	79
Table 7. Villus height (VH), crypt depth (CD) and villus:crypt ratio (V:C) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days	80
Table 8. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the DDGSS for 90 days and subjected to grading-induced stress.....	81
Table 9. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the DDGSS for 90 days and subjected to grading-induced stress.....	82

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	02
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Método de obtenção e características físicas dos DDGS	03
2.2 Composição química e avaliação nutricional dos DDGS	04
2.3 Utilização de DDGS em dietas para peixes	06
2.4 Nutrição e saúde de peixes	10
2.5 Estresse em peixes	12
3 REFERÊNCIAS	14

CAPÍTULO II

Grão seco de destilaria com solúveis do milho em dietas para tilápia-do-Nilo: valor nutritivo, desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse	20
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução.....	23
2. Material e Métodos	24
2.1 Estudo I - Ensaio de digestibilidade	24
2.2 Estudo II – Desempenho produtivo	26
2.3 Parâmetros de crescimento e utilização do alimento.....	28
2.4 Morfometria intestinal	28
2.5 Análises químicas	29
2.6 Estresse por classificação	29
2.7 Análises Hematológicas	30
2.8 Análise estatística	31
3. Resultados	31
4. Discussão	32
5. Referências.....	36

CAPÍTULO III

Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do grão seco de destilaria com solúveis do sorgo em dietas para tilápia-do-Nilo, sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse

.....	51
Resumo	52
Abstract	53
1. Introdução	54
2. Material e Métodos	55
2.1 Ensaio de digestibilidade	56
2.2 Ensaio de desempenho produtivo	57
2.3 Variáveis de desempenho, utilização do alimento e gordura visceral	58
2.4 Coleta dos dados e amostras	59
2.5 Análises das amostras	60
2.6 Estresse por classificação	61
2.7 Hematologia	61
2.8 Análise estatística	62
3. Resultados	63
4. Discussão	64
5. Referências	68
CAPÍTULO IV	
IMPLICAÇÕES	84

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

A alimentação representa o maior custo no cultivo intensivo da tilápia-do-Nilo, sendo a proteína o nutriente mais nobre e caro da dieta. Os esforços para reduzir estes custos resultam em sua maior parte na utilização de fontes de proteína de origem vegetal.

O farelo de soja, por apresentar excelente valor nutricional e alta disponibilidade é o alimento proteico vegetal mais utilizado na alimentação animal, podendo compor mais de 40% da ração da tilápia, portanto, a substituição parcial do farelo de soja por fontes proteicas mais baratas reduziria os custos com a alimentação.

Os grãos secos de destilaria com solúveis conhecidos como DDGS (distiller's dried grains with solubles), coproduto da produção do etanol a partir de cereais, pode ser 48,58% mais barato, tomando por base uma unidade de proteína, do que o farelo de soja. Aproximadamente 98% dos DDGS produzidos na América do Norte são provenientes da produção do etanol para combustível, enquanto que 1-2% são da produção de bebidas (Bucheit, 2002).

Na América do Sul, em alguns países, o etanol é produzido a partir de vários cereais. No Brasil, as usinas de produção de etanol a partir da cana de açúcar podem utilizar os cereais como segunda matéria-prima e produzirem não só combustível, mas também alimento proteico, além disso, algumas destilarias produzem etanol somente a partir do milho e do sorgo, o que torna os DDGS disponíveis para as indústrias de rações.

Os DDGS apresentam bom teor proteico, em média 30% de PB, sem a presença dos fatores antinutricionais comumente encontrados nos alimentos proteicos de origem vegetal (Zhou et al., 2010). Destaca-se que este alimento, segundo Lim et al. (2008), contém a levedura dentre as substâncias que o compõe, com razoável quantidade de β -glucanos, objeto de estudo como moduladores da resposta imune em peixes.

Atualmente, os DDGS são amplamente estudados na alimentação animal (Stein & Shurson, 2009), embora sua utilização na alimentação de peixes seja restrita, provavelmente por seu baixo teor de lisina, reflexo do cereal empregado para a produção do etanol (NRC, 1993). Segundo Webster et al. (1995), as pesquisas para

determinação do valor nutritivo do DDGS tiveram início em 1940. Estes autores afirmaram que este alimento se mostra com potencial para compor a formulação da dieta de diferentes espécies, como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Cheng & Hardy, 2004), o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Tidwell et al., 1990; Webster et al., 1993; Lim et al., 2008) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Wu et al., 1996; Tidwell et al., 2000; Lim et al., 2007).

Os resultados destes estudos baseiam-se, principalmente, nas respostas de desempenho produtivo e composição corporal, enquanto os autores sugerem estudos objetivando verificar a influência do DDGS na higidez dos peixes. Destaca-se, ainda, a falta de informações sobre o valor nutritivo do DDGS obtido pelas destilarias de etanol no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Método de obtenção e características físicas dos DDGS

O DDGS (distiller's dried grains with solubles) é co-produto seco da produção do etanol após fermentação do amido de grãos de cereais por leveduras. A obtenção de etanol a partir de cereais é basicamente resumida por dois processos: moagem úmida ou moagem seca. Na moagem úmida o grão é fracionado em componentes primários (amido, gérmen e fibra), sendo que este processo gera vários co-produtos. No processo de moagem a seco existem seis etapas majoritárias: moagem, cozimento, liquefação, sacarificação, fermentação e separação. Os produtos finais da moagem a seco incluem álcool combustível, dióxido de carbono e grão secos de destilaria com solúveis (Kim & Dale, 2005).

Assim como no etanol produzido a partir da cana de açúcar, durante a fermentação, a glicose é convertida em etanol pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O líquido produzido segue para um conjunto de centrífugas, na qual é separada a parte fina (que pode ser recirculada no processo) e a parte restante segue para evaporadores, nos quais é produzido o xarope (com cerca de 50% de umidade). O xarope é misturado aos sólidos retirados da centrífuga e seco, dando origem ao DDGS. As demais etapas de destilação são equivalentes às de obtenção de etanol a partir da cana (Rausch & Belyea, 2005; Xu et al., 2009). A cada 2,54 kg de milho fermentado são

produzidos 1,02 L de etanol, 0,28 kg de dióxido de carbono e 0,82 kg de DDGS (Lim & Yildirim-Aksoy, 2008).

Os DDGS do milho são produtos granulares com coloração que pode variar do amarelo claro ao marrom escuro, pois, vários fatores podem influenciar sua coloração, como a quantidade de solúveis adicionados aos grãos de destilaria antes da secagem, até a temperatura e tempo de secagem. A cor da matéria prima influencia pouco a coloração final do DDGS (Rosentrater 2006; Liu 2009).

O principal entrave quanto à utilização dos DDGS em dietas é a variação no teor nutricional devido a diferenças nos métodos de processamento para obtenção de etanol (Liu 2009). A coloração é forte indicadora do valor nutricional do DDGS, ou seja, métodos incorretos de processamento (temperatura, tempo de secagem ou ambos, por exemplo) resultam em produtos com cor mais escura e, conseqüentemente, com menor valor nutritivo para os animais (Fastinger et al., 2006).

2.2 Composição química e avaliação nutricional dos DDGS

O milho contém cerca de dois terços de amido que quando convertido em etanol durante a fermentação torna os nutrientes (proteína, ácidos graxos, minerais e vitaminas) contidos neste cereal mais concentrados. O DDGS contém de três a quatro vezes mais proteína, fósforo e fibra do que o milho. Desse modo, a composição química do DDGS pode variar de acordo com as fontes e a qualidade dos grãos utilizados para produção de etanol, sendo desejado que não haja variações no conteúdo em nutrientes mesmo que sejam de plantas diferentes. No entanto pode haver variação até mesmo entre os grãos provenientes da mesma espécie de planta dependendo, por exemplo, do tempo e eficiência da fermentação, além do processo de secagem (Lim & Yildirim-Aksoy, 2008).

Embora o milho seja o principal grão, trigo, cevada e sorgo também podem ser utilizados na produção de etanol. Lee et al. (1991) estudaram a composição de DDG (distiller's dried grains) e DDGS provenientes do milho e do trigo e observaram no co-produto do milho conteúdo inferior em proteína bruta e maior teor de extrato etéreo (DDG 32,9% e DDGS 28,7% de PB; DDG 17,6% e DDGS 17,6% de EE) do que no obtido a partir do trigo (DDG 48,7% e DDGS 42,7% de PB; DDG 6,2% e DDGS 5,6% de EE). Resultados semelhantes foram obtidos por Dong et al. (1987) em estudo com

DDGS do milho, trigo branco e trigo vermelho, que encontram valor de proteína bruta e extrato etéreo de 31,6% e 8,9% para o milho; 40,4% e 3,2% para o trigo branco; e 34,4% e 3,4% para o trigo vermelho, respectivamente.

Segundo Lodge et al. (1997) os DDGS do sorgo apresentam conteúdo em proteína bruta semelhante aos dos DDGS do milho com 31,4%, valor superior ao encontrado por Hancock (1995), que em estudo também com DDGS de duas variedades, o sorgo bronze e o amarelo, encontrou valores de 26,6 e 25,6% de proteína bruta, respectivamente.

No intuito de se obter co-produtos que se tornem mais atrativos no ponto de vista de utilização na aquicultura, pesquisas buscam elevar o conteúdo proteico e reduzir o teor de fibra não digerível dos ingredientes (Stone et al., 2005). Isto pode ser alcançado aplicando-se tecnologia de fracionamento, para separar a fração fermentável do grão, da porção não fermentável antes da moagem e processamento por fermentação (Singh et al., 2005; Robinson et al., 2008). Um dos co-produtos que resultam a partir deste processo é o HPDDG (high protein distiller's dried grains), que comparado ao DDGS convencional produzido a partir do milho, possui maior conteúdo em proteína bruta (44,7 e 27,5%), menor teor de gordura (5,4 e 18,5%) e menor teor de fibra em detergente neutro (7,3 e 26,5%), respectivamente (Singh et al., 2005; Overland et al., 2013).

Para a obtenção de DDG a partir do trigo com maior conteúdo proteico e menor quantidade de polissacarídeos não amiláceos, Reveco et al. (2012) extraíram a proteína de dois diferentes tipos de DDG, por meio de precipitação com adição de água, autoclavagem e secagem em estufa, obtendo um co-produto denominado DDG-PC (distiller's dried grains protein concentrate) que passou de 24,95 para 52,22 e 43,18 para 68,51% de proteína bruta, respectivamente. Estes autores encontraram ainda, valores maiores de aminoácidos nos dois DDG-PC, a lisina apresentou aumento nos valores de 0,95% para 1,39% e de 1,00% para 1,80%, e a metionina passou de 0,41% para 0,98% e 0,69% para 1,41%, respectivamente.

O perfil de aminoácidos encontrado nos DDGS é semelhante ao do grão de origem (Dong et al., 1987). A proteína do milho é deficiente em lisina, assim, o produto gerado a partir dele conservará essa característica. Devido ao menor teor de proteína, as porcentagens de aminoácidos essenciais de produtos de grãos de destilaria a partir do

milho, trigo, sorgo e cevada são consideravelmente mais baixas do que as encontradas no farelo de soja.

O aminoácido mais limitante em DDGS a partir dessas fontes quando comparadas ao farelo de soja é a lisina (Dong et al., 1987; Hancock et al., 1995; Feedstuffs, 2008). A concentração de vitaminas e minerais diferem entre as fontes e os lotes de DDGS. Os DDGS de milho são ricos em vitamina A, niacina, colina, e fósforo, que é altamente biodisponível (Lim et al., 2011a).

É de essencial importância a determinação dos valores digestíveis dos alimentos para que se torne possível formular dietas balanceadas. Deste modo, Thompson et al. (2008) avaliaram a digestibilidade do DDGS pelo sunshine bass (*Morone chrysops X M. saxatilis*) e obtiveram valores de coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta e lipídeos de 64,94 e 68,72%, respectivamente. Li et al. (2013) avaliaram o valor nutritivo do DDGS do milho pelo bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), e encontraram CDA da matéria seca, proteína bruta, energia, lisina e metionina do DDGS de 50,8, 89,9, 58,5, 72,1 e 84,8% respectivamente.

Magalhães et al. (2015), em estudo para verificar o valor nutritivo de dois diferentes DDGS de milho pelo European seabass (*Dicentrarchus labrax*) e pelo meagre (*Argyrosomus regius*) obtiveram CDA da matéria seca, proteína e energia, de 63,3 e 56,7; 96,3 e 92,1; 67,9 e 63,6% pelo European seabass e 65,6 e 57,2; 97,9 e 91,8; 67,4 e 58,0% pelo meagre. Estes autores concluíram que apesar dos elevados CDAs para proteína, os CDAs da matéria seca são baixos devido ao alto teor de fibra bruta dos dois DDGS (7,2 e 7,8%).

Além de conter bom conteúdo protéico, os DDGS possuem na levedura presente em sua composição boa quantidade de β -glucano e mananos que tem sido objeto de vários estudos sobre sua ação como estimuladores da resposta imune em peixes (Lim, 2008).

2.3 Utilização de DDGS em dietas para peixes

Embora o emprego de produtos gerados pelas destilarias em aquicultura seja recente, a utilização de DDGS em dietas para peixes tem sido estudada desde o ano de 1940 (Webster et al., 1995).

Phillips et al. (1964) em estudo com truta marrom (*Salmo trutta*) reportaram que os peixes alimentados com dieta contendo farinha de peixe, farelo de algodão, levedura de cerveja e DDGS apresentaram desempenho produtivo igual aos peixes alimentados com dietas contendo misturas de farinhas de carne. Além disso, esta foi a primeira dieta seca a proporcionar ovos viáveis de matrizes de truta, com taxa de eclosão total de 86% e sobrevivência de 88% no estágio de olhos. Anteriormente, a taxa de ovos viáveis para incubação obtida com alimentação de dieta seca era de 4 a 5%.

Em estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss*) Cheng & Hardy (2004), alimentaram os peixes com dieta referência contendo 30% de farinha de peixe em que as dietas teste substituíram 25, 50 e 75% desta farinha, formuladas para serem isoproteicas e isoenergéticas, com e sem a suplementação de lisina e metionina, os DDGS constituíram 7,5; 15 e 22,5% da dieta total. Estes autores relataram que para os peixes alimentados com 15% de DDGS na dieta, ou seja, 50% da substituição pela farinha de peixe sem a suplementação de lisina e metionina não houve decréscimo no desempenho produtivo, sendo que para a inclusão de 22,5% de DDGS (75% de substituição da farinha de peixe) se faz necessária a suplementação destes aminoácidos para que não haja perda de produtividade.

Stone et al. (2005) também realizaram estudo com a truta arco-íris, objetivando substituir a farinha de peixe pela combinação do DDGS e do glúten de milho em dietas extrusadas e peletizadas. Estes autores concluíram que até 18,4% de produtos do milho (10% de DDGS e 8,4% de glúten) pode ser utilizado na dieta, independentemente do seu processamento, sem afetar o desempenho produtivo.

Em pesquisa para obtenção e utilização de DDG-PC proveniente de dois diferentes DDG do trigo, Reveco et al. (2012) avaliaram a inclusão em dietas para truta arco-íris destes co-produtos nos níveis de 7,5; 15,0; 22,5; 30,0% e uma dieta sem inclusão. Os autores não encontraram diferenças significativas para o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, indicando que a utilização do DDG-PC até 30,0% não reduz o desempenho produtivo.

Em estudo para avaliar a substituição de ingredientes de origem vegetal (concentrado proteico de soja, farelo de girassol, farelo de colza e ervilha) pelos DDGS e HPDDG nos níveis de 50 e 100% em dietas para truta arco-íris, Overland et al. (2013) concluíram que a substituição por ambos elevou o consumo de ração o ganho de peso e

melhorou a conversão alimentar. Prachom et al. (2013) incluíram o HPDDG nos níveis de 0, 5, 10 e 15%, em substituição ao glúten de milho em dietas para truta arco-íris e determinaram melhor utilização da proteína e retenção de fósforo pelos peixes alimentados com dietas contendo HPDDG, do que os alimentados com dieta controle. Os autores sugerem ainda, que a melhor utilização do fósforo é possível devido ao HPDDG não apresentar fatores atinutricionais, como o fitato, comumente presentes nos ingredientes de origem vegetal.

O DDGS possui alta palatabilidade para bagre do canal, porém contém aproximadamente 45% a menos de lisina em sua composição, quando comparado ao farelo de soja. A substituição de toda proteína animal pela do farelo de soja é bem sucedida para bagre do canal, e parte desta proteína também pode ser substituída por outras proteínas vegetais, tais como as do DDGS (Robinson & Li, 2008).

Em estudo com alevinos de bagre do canal Deyoe & Tiemeire (1969) recomendaram a inclusão de 10% de DDGS em dieta contendo 26% de proteína, enquanto Robinette (1984) em pesquisa com mesma espécie sugeriu inclusão de 7,5% de DDGS em dieta contendo 36% de proteína bruta.

Estudos mais recentes demonstram que a inclusão de 15 a 30% de DDGS em substituição as proteínas de origem animal e ao farelo de soja para bagre do canal, proporcionam desempenho produtivo semelhante (Webster et al., 1991). Em estudo com mesma espécie Lim et al. (2009) relataram que a substituição de 40% da mistura de farelo de soja e milho por DDGS quando suplementado com lisina não alterou o ganho de peso e a eficiência alimentar. A substituição da dieta contendo farelo de soja e milho sem a suplementação de lisina para bagre do canal, não alterando o desempenho produtivo e utilização do alimento, é de 30% (Zhou et al., 2010).

Renukdas et al. (2014) avaliaram com bagre do canal e um híbrido (*Ictalurus punctatus* × *Ictalurus furcatus*) a substituição parcial do farelo de soja pelo DDGS em duas dietas contendo 28,0 e 32,0% de proteína bruta e não verificaram diferenças no desempenho produtivo, composição centesimal da carcaça, rendimento de filé, produção de nuggets e características organolépticas do produto, além de reduzir os custos da dieta com a inclusão de 20% de DDGS.

Com objetivo de determinar a possibilidade de utilizar o DDGS como fonte proteica para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), Wu et al. (1996) realizaram

pesquisa e concluíram ser possível a inclusão, sem prejuízo ao desempenho produtivo, de 16 a 49% de DDGS, em combinação com o glúten de milho, em dietas contendo de 32 a 40% de proteína bruta. Estes mesmos autores (Wu et al., 1997), em estudo com a mesma espécie, incluíram de 63 a 82% de DDGS em combinação com farelo de soja e o glúten de milho, com e sem suplementação de lisina e triptofano, em dietas contendo 28 e 32% de proteína. Após oito semanas, observaram que duas dietas contendo 28% de proteína e ambas suplementadas com lisina (67% de glúten de milho e 26% de farelo de soja e 77,15% de DDGS e 15% de farelo de soja) proporcionaram de forma semelhante, as melhores respostas produtivas.

Em pesquisa em tanque rede, Tidwell et al. (2000) avaliaram as respostas de desempenho da tilápia-do-Nilo em consórcio com o camarão (*Machrobrachium rosenbergii*), alimentadas com dietas peletizadas (26% de PB), em que a dieta teste continha o DDGS (26% PB) obtido a partir do milho. Estes autores concluíram, após 12 semanas, que o desempenho produtivo dos peixes alimentados com DDGS foi significativamente inferior, assim como os custos das rações (US\$ 0,66/kg da ração controle e de US\$ 0,26 a 0,37/kg com DDGS).

Coyle et al. (2004) avaliaram em tilápia híbrida (*O. niloticus x O. aureus*) a inclusão de 30% de DDGS em dietas contendo farinha de peixe e farinha de carne e ossos e determinaram menor ganho de peso, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência alimentar em peixes alimentados com dieta contendo 30% de DDGS na ausência de farinha de peixe e farinha de carne e ossos, comparado com os peixes alimentados com a dieta controle (a base de farelo de soja e farinha de peixe) e dietas contendo 30% de DDGS e 8% de farinha de peixe ou 26% de farinha de carne e ossos. Em estudo com a mesma espécie, Welker et al. (2014) avaliaram DDGS provenientes de diferentes grãos (milho, sorgo e trigo) em substituição de 30% do farelo de soja combinado com farelo de milho (relação de 1,8) e não encontraram diferenças no desempenho produtivo, hematologia e imunidade.

Em trabalho realizado com juvenis de tilápia-do-Nilo, utilizando níveis crescentes de DDGS (0, 10, 20, 40 e 40% com suplementação de lisina) em substituição ao farelo de soja e milho, Lim et al. (2009), observaram que os peixes alimentados com dieta contendo 40% de DDGS sem adição de lisina, apresentaram ganho de peso reduzido comparado aos tratamentos com substituição pelo DDGS até 20%. Estes

autores realizaram ainda desafio bacteriano (*Streptococcus iniae*), não sendo observado efeito sobre a resposta imune nos peixes alimentados com DDGS.

Shelby et al. (2008) observaram menor ganho de peso e eficiência alimentar pela tilápia-do-Nilo alimentadas com dieta contendo 60% DDGS sem adição de lisina em comparação aos peixes alimentados com as dietas controle a base de farelo de soja e dietas contendo menor quantidade de DDGS (0, 30 e 30% + lisina). A adição de lisina em dietas contendo 60% de DDGS melhorou o ganho de peso e a eficiência alimentar a níveis verificados com a dieta controle, sugerindo que, com a suplementação de lisina, podem ser incorporados 60% de DDGS em dietas de tilápia.

2.4 Nutrição e saúde de peixes

Ao longo dos últimos anos a aquicultura se mostrou em seu pleno desenvolvimento, sendo a produção de peixes, responsável por boa parte deste crescimento. Tal fato deve-se a intensificação dos sistemas de produção e melhorias realizadas nos canais responsáveis pela distribuição.

Para que se torne possível o desenvolvimento da atividade intensiva, se tratando da produção de peixes, faz-se necessária a implantação de boas práticas de manejo, controle da qualidade da água, utilização de densidades adequadas e, principalmente, os cuidados com a alimentação e nutrição, tendo em vista que rações são a única fonte de alimento para os animais confinados devendo, por sua vez, atender em todos os aspectos suas exigências nutricionais.

Do mesmo modo que nas outras espécies de produção, a probabilidade de ocorrerem doenças em sistema intensivo de cultivo é maior (Bondad-Reantaso et al., 2005). Dessa forma o maior desafio para a aquicultura é manter os peixes em condição saudável, para possibilitar rápido crescimento e maior percentual de sobrevivência. Essa condição pode ser assegurada por meio de nutrição adequada, com formulações de dietas que forneçam não apenas os nutrientes essenciais, mas que preparem os peixes para situações que possam afetar sua saúde (Gatlin III, 2002).

O conceito em se balancear dietas deve ser sustentando com base em três pilares, nutrição, saúde e responsabilidade ambiental. Muitas vezes, rações que promovem o rápido crescimento dos peixes são as que determinam melhor resistência a doenças (Blazer, 1992). Nesse sentido as pesquisas científicas têm ampliado o número

de áreas de conhecimento no intuito de estabelecer compreensão sobre as inúmeras relações existentes entre nutrição e saúde.

Desse modo Hesser (1960), propõe o uso de parâmetros hematológicos como indicadores de saúde. A hematologia assim como a imunologia, têm exercido importante papel no entendimento da nutrição possibilitando o desenvolvimento de estratégias para reduzir os efeitos provocados pelo estresse e elevar a resistência imunológica nos peixes permitindo a manutenção do equilíbrio orgânico nas diferentes situações em que os animais, inevitavelmente, são expostos em sistemas intensivos de produção.

Qualquer alteração fisiológica é, concomitantemente, refletida no sangue podendo afetar os parâmetros sanguíneos (Hrubec et al., 1997). Devido a essa característica, vários trabalhos têm buscado avaliar a saúde dos peixes por meio de parâmetros hematológicos com a intenção de demonstrar, que dietas que promovem melhor desempenho nem sempre proporcionam melhor higidez, ou ainda que contribuam de alguma forma para que os animais respondam da melhor maneira possível a exposição a agentes estressores (Barros et al., 2009; Lim et al., 2009; Signor et al., 2010b; Lim et al., 2011b; Teixeira et al., 2011; Barros et al., 2014).

Os DDGS possuem em sua composição a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e suas concentrações podem chegar a representar 3,9% da biomassa total destes alimentos (Ingledew, 1999). Dentre os constituintes da parede celular das leveduras encontram-se os mananoligossacarídeos (MOS), que são oligossacarídeos compostos por 40% de β -glucanos e 40% de α -D-manana (Hough, 1990).

Os β -glucanos são objeto de estudos atuando como moduladores da resposta imune em peixes (Lim et al., 2007), melhorando a atividade do sistema imune não específico e a resistência contra determinados patógenos (Elis, 2001; Costas et al., 2011) por meio do aumento da concentração plasmática de lisozima e pelos componentes do sistema complemento, que elevam a atividade fagocítica de macrófagos (Nikl et al., 1991; Anderson, 1992; Chen & Ainsworth, 1992; Dalmo & Bøgwald, 2008; Chang et al., 2013).

As α -D-mananas exercem função de ligação nos receptores lecitinas específicos de manose das bactérias enteropatogênicas, atuando como atrativos e com isso prevenindo a adesão às glicoproteínas da superfície do vilo, desse modo, reduzindo o risco de colonização e disseminação dos patógenos bacterianos (Firion et al., 1983).

2.5 Estresse em peixes

A resposta do organismo a qualquer demanda que cause alteração da condição fisiológica do animal, além do estado normal de repouso, foi definida como estresse por Selye (1973). No ambiente, a resposta ao estresse pode ser representada pela capacidade dos peixes em mobilizar reservas de energia de forma a evitar ou vencer imediatamente situações de ameaça.

Em piscicultura intensiva, as situações de estresse podem afetar o desempenho produtivo, prejudicar o estado de saúde e aumentar a suscetibilidade a doenças dos animais (Carmichael, 1984). Neste sistema de produção, vários são os fatores promotores de estresse aos animais, dentre eles podemos listar práticas de manejo comumente aplicadas como, por exemplo, biometrias e classificação dos peixes objetivando crescimento mais homogêneo. Estas práticas rotineiras envolvem vários processos de manipulação dos animais fora do ambiente aquático, ou seja, os peixes são submetidos à exposição ao ar. Nesse sentido, Silva et al. (2012) em estudo realizado em tilápia-do-Nilo alimentada com dieta comercial puderam, por meio de parâmetros sanguíneos e bioquímicos (colesterol, glicose, cálcio e sódio) diagnosticar ocorrência de estresse fisiológico nos peixes expostos ao ar.

O estresse pode influenciar negativamente na resistência a doenças, crescimento, reprodução, sobrevivência e condição geral de saúde dos animais (Barton e Iwama, 1991). Em função desses possíveis efeitos, atenção especial tem sido dada a formas de se reduzir tais consequências.

A condição de estresse provoca ajustes imediatos desencadeados nos diversos níveis da organização metabólica, predominantemente ocasionando mudanças no comportamento. De forma geral, esses ajustes possuem custo energético e buscam minimizar os efeitos orgânicos impostos pelo agente estressor (Val et al., 2005).

No entanto, em peixes, nem sempre ocorre mortalidade quando desafiados por agentes estressores. Normalmente, existe adaptação ao estresse por período de tempo finito (Barton & Iwama, 1991). Neste período, os peixes aparentam estar normais, porém, estão depletando reservas e redirecionando energia em função das exigências extras impostas pela condição de estresse. Desse modo, os peixes deixam de crescer e reproduzir e buscam retornar à condição de homeostase.

Em decorrência da condição de estresse, o organismo promove eventos em forma de cascata no intuito de manter a homeostase. A resposta ao estresse pode ser classificada em primária (aguda), secundária (crônica) e terciária (crônica prolongada), sendo denominada como Síndrome de Adaptação Geral (Pickering, 1981; Moyle & Cech, 1998). A resposta primária, ou neuroendócrina, é caracterizada pelo significativo aumento dos hormônios corticosteróides (cortisol) e concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), enquanto a resposta secundária é usualmente definida como a canalização das ações e efeitos imediatos desses hormônios em nível sanguíneo e de tecidos, estimulando a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando os níveis de glicose no sangue, diminuindo a proteína muscular, aumento do batimento cardíaco, causando distúrbios osmorregulatórios e piora do perfil hematológico. Decorridos tais eventos, a resposta terciária envolve todo o organismo do animal, de forma que o crescimento, a reprodução e o sistema imune são comprometidos (Wedemeyer et al., 1990). Esta resposta é marcada, principalmente, pela diminuição da resistência às doenças pelos peixes provocando diminuição no número de leucócitos (leucopenia); linfócitos (linfopenia) e aumento do número de neutrófilos circulantes (neutrofilia) (Mazeuad et al., 1977). Contudo, a fase de desenvolvimento e a dieta podem interferir nas respostas secundárias pelos peixes (Val et al., 2005). Desse modo, havendo a necessidade de redistribuição de energia, os animais devem estar aptos, principalmente, para prover energia, além de outros compostos como vitaminas e minerais que agirão na forma de substrato para o correto funcionamento do sistema imunológico.

Com base nessas informações, este projeto buscou realizar experimentos para avaliar o valor nutritivo, em ensaio de digestibilidade, dos DDGS provenientes do milho e do sorgo pela tilápia-do-Nilo, assim como a substituição da proteína do farelo de soja pela desses dois alimentos, por meio de ensaio de desempenho produtivo, avaliando também o perfil hematológico antes e após a exposição ao estresse por classificação.

Os resultados obtidos estão apresentados em dois capítulos – Capítulo II intitulado “Grão seco de destilaria com solúveis do milho em dietas para tilápia-do-Nilo: valor nutritivo, desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse” e Capítulo III, intitulado “Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do grão seco de destilaria com solúveis do sorgo em

dietas para tilápia-do-Nilo, sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse” – redigidos segundo normas para publicação do periódico **Aquaculture**.

3 REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, and vaccine carries in fish: applications to aquaculture. **Annual Review Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.

BARROS, M. M. et al. Hematological response and growth performance of Nile tilapia fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.

BARROS, M. M. et al. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, p. 188-195, 2014.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. **Annual Review Fish Diseases**, v.1, p.3-26, 1991.

BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, p.309-323, 1992.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p.249-272, 2005.

BUCHHEIT, J. K. Distiller's dried grains with solubles. Rural Enterprise and Alternative Agriculture Development Initiative Report No. 11. **Office of Economic and Regional Development**. Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, USA. 2002.

CARMICHAEL G. J. Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass. **The Progress Fish Culture**, v.46, p.11-115, 1984.

CHEN, D.; AINSWORTH, A. J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 295-304, 1992.

CHANG, C. S. et al. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MGB) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, p. 115-125, 2013.

CHENG Z.J.; HARDY, R. W. Nutritional value of diets containing distiller's dried grain with solubles for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 15, p. 101-113, 2004.

COSTAS, B. et al. Physiological responses of senegalese sole (*Solea senegalensis*) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free-amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, v. 316, p. 68-76, 2011.

COYLE, S. D. et al. Evaluation of growth, feed utilization and economics of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, fed diets containing different protein sources in combination with distillers dried grains with solubles. **Aquaculture Research**, v. 35, p.1-6, 2004.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 384-396, 2008.

DEYOE, C.W.; TIEMEIRE, O.W. Feeding channel catfish. In: **Proceedings of the 24th distillers feed conference**. Distiller's Feed Research Council, Des Moines, IA, 1969.

DONG, F.M.; RASCO, B.A.; GAZZAZ, S.S. A protein quality assessment of wheat and corn distillers dried grains with solubles. **Cereal Chemistry**, v. 64, p. 327-332, 1987.

ELIS, A.E. Innate host defense mechanism of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

FASTINGER, N. D.; LATSHAW, J. D.; MAHAN, D. C. Amino acid availability and true metabolizable energy content of corn distillers dried grains with solubles in adult Cecectomized Roosters. **Poultry Science**, v. 85, p. 1212–1216, 2006.

FEEDSTUFFS. **Feedstuffs ingredient analysis table**, v. 79, n38, 2008.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. **Carbohydrate Research**, v. 120, p. 235–249, 1983.

GATLIN III, D. M. Nutrition and Fish Health. In: Halver, J.E.; Hardy, R.W. **Fish Nutrition**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2002. p.671-702.

HANCOCK, J.D. The value of distillers co-products in swine diets. **Proc. Distillers Feed Res. Council**, v. 50, p. 13-20, 1995.

HESSER, E.F. Methods for routine on fish hematology. **The Progressive Fish Culturist**, v. 22, p.164-171, 1960.

HOUGH, J.S. Biotecnología de la cerveza y de malta. Zaragoza: Acribia, 1990, 194p.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; ROBERTSON, J.L. Blood biochemical reference intervals for sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) in three culture systems. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p.624-627, 1997.

INGLEDEW W. M. Yeast – could you base business on this bug? Pages 27–47 in T. P. Lyons and K. A. Jacques, editors. Under the microscope – focal points for the new

millennium – biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 1999.

KIM, S.; DALE, B.E. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. **Biomass and Bioenergy**, v.28, p. 475-489, 2005.

LEE, W.J.; SOSULSKI, F.W.; SOKHANSANJ, S. Yield and composition of soluble and insoluble fractions from corn and wheat stillages. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 559-562, 1991.

LI, M.H.; OBERLE, D.F.; LUCAS, P.M. Apparent digestibility of alternative plant protein feedstuffs for channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture Research**, v. 44, p. 282–288, 2013.

LIM, C. et al. Growth response and resistance to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing distiller's dried grains with solubles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 231-237, 2007.

LIM, C.; LI, E.; KLESIUS, P. H. Distiller's dried grains with solubles as an alternative protein source in diets of tilapia. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 172-178, 2011a.

LIM, C. et al. Thiamin requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the world aquaculture society**, Baton Rouge, v. 42, n. 6, p. 824-833, 2011b.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. In: 8th **International symposium on tilapia in aquaculture**, p. 67-82, 2008.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P.H. Growth response and resistance to *Edwardsiella ictaluri* of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing distiller's dried grains with solubles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, p. 182-193, 2009.

LIU, K. S. Effect of particle size distribution, compositional and color properties of ground corn on quality of distillers dried grains with solubles (DDGS). **Bio resource Technology**, v. 100, p. 4433–4440, 2009.

LODGE, S.L. et al. Evaluation of corn and sorghum distillers byproducts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 37-43, 1997.

MAGALHÃES, R. et al. Corn distiller's dried grains with solubles: Apparent digestibility and digestive enzymes activities in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 443, p. 90-97, 2015.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201- 212, 1977.

MOYLE, P. B.; CECH JR, J. J. **Fishes: An introduction to ichthyology**. 2ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. p. 559, 1998.

NIKL, L.; ALBRIGHT, L. J.; EVELYN, T. P. T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, p. 7-12, 1991.

NRC (National Research Council). **Nutrient requirements of fish**. National Academic Press, Washington, D.C., USA. 1993.

ØVERLAND, M. et al. Evaluation of distiller's dried grains with solubles (DDGS) and high protein distiller's dried grains (HPDDG) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.416–417, p. 201–208, 2013.

PHILLIPS, A.M. et al. Dry concentrates as complete trout foods for growth and egg production. **Progressive Fish Culturist**, v. 26, p. 155-159, 1964.

PICKERING, A.D. **Introduction: the concept of biological stress**. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.1-9.

PRACHOM, N. et al. Impact of dietary high protein distillers dried grains on amino acid utilization, growth response, nutritional health status and waste output in juvenili rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 62-71, 2013.

RAUSCH, K. D.; BELYEA, R. L. Coproducts from bioprocessing of corn. In: **ASAE. Annual International Meeting**. Proceedings... Tampa, EUA, p. 17-20, 2005.

RENUKDAS, N. et al. Performance of Alternative Diets Containing Solvent-Extracted Distillers Dried Grains with Solubles Compared to Traditional Diets for Pond-Raised Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, and Hybrid Catfish, *Ictalurus punctatus*×*Ictalurus furcatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, p. 290-300, 2014.

REVECO, F. E. et al. Aqueous fractionation improves the nutritional value of wheat distillers grains for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 202-210, 2012.

ROBINETTE, H.R. Feed formulation and processing. In: ROBINSON, E.H.; LOVELL, R.T. ed. **Nutrition and feeding of channel catfish (revised)**. Southern Cooperative Series Bull. 296, Texas A & M Univ., College Station, Texas, 1984, p. 29-33.

ROBINSON, E.H.; LI, M.H. Replacement of soybean meal in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets with cottonseed meal and distiller's dried grains with solubles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, p. 521-527, 2008.

ROBINSON, P.H. et al. Nutritional evaluation of four co-product feedstuffs from the motor fuel ethanol distillation industry in the Midwestern USA. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 345–352, 2008.

ROSENTRATER, K. A. Some physical properties of distillers dried grains with solubles (DDGS). **Applied Engineering and Agriculture**, v. 22, p. 589–595, 2006.

SELYE, H. Homeostasis and heterostasis. **Perspectives in Biology and Medicine**, v.16, p.441-445, 1973.

SHELBY, R.A. et al. Effect of distiller's dried grains with solubles-incorporated diets on growth, immune function and disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1351-1353, 2008.

SIGNOR, A. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, p. 509-519, 2010.

SILVA, R.D. et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, supl. 1, p. 99-107, 2012.

SINGH, V. et al. Comparison of modified dry-grind corn processes for fermentation characteristics and DDGS composition. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 187–190, 2005.

STEIN, H.H.; SHURSON, G.C. Board-invited review: The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1292-1303, 2009.

STONE, D. A. et al. Effects of extrusion on nutritional value of diets containing corn gluten meal and corn distiller's dried grain for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 17, p. 1-20, 2005.

TEIXEIRA, C. P. et al. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and hematological response under heat stress. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 1, p. 1-8, 2011.

THOMPSON, K.R. et al. Digestibility of dry matter, protein, lipid, and organic matter of two fish meals, two poultry by-product meals, soybean meal, and distillers dried grains with solubles in practical diets for sunshine bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. **Journal of theWorld Aquaculture Society**, v.39, p. 352–363, 2008.

TIDWELL J.H. et al. Growth, survival, and body composition of cagecultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed pelleted and unpelleted distillers grains with solubles in polyculture with freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of theWorld Aquaculture Society**, v. 31, p. 627-631, 2000.

TIDWELL, J.H.; WEBSTER, C.D.; YANCEY, D.H. Evaluation of distillers grains with solubles in prepared channel catfish diets. **Transactions of Kentucky Academy of Science**, v. 52, p. 135-138, 1990.

VAL, A.L. et al. Nutrição e estresse em peixes da Amazônia. In: SIMPÓSIO de NUTRIÇÃO e SAÚDE de PEIXES, 2005, Botucatu. **Anais...** Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ, Universidade Estadual Paulista, 2005, p.84-92.

WEBSTER C. J. et al. Growth, body composition, and organoleptic evaluation of channel catfish fed diets containing different percentages of distiller's grain with solubles. **Progressive Fish-Culturist**, v. 55, p. 95-100, 1993.

WEBSTER, C.J. et al. Evaluation of distillers' grains with solubles as an alternative protein in aquaculture diets. in: Lim, C.; Sessa, D.J. editors. **Nutrition and utilization technology in aquaculture**. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, p. 189-198, 1995.

WEBSTER, C.J.; TIDWELL, J.H.; YANCEY, D.H. Evaluation of distiller's grains with solubles as a protein source in diets for channel catfish. **Aquaculture**, v. 96, p. 179-190, 1991.

WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C.B., MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p.451-489.

WELKER, et al. Evaluation of Distiller's Dried Grains with Solubles from Different Grain Sources as Dietary Protein for Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* (♀)×*Oreochromis aureus* (♂). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, p. 625-637, 2014.

WU, Y.V.; ROSATI, R.R.; BROWN, P.B. Effect of diets containing various levels of protein and ethanol coproducts from corn on growth of tilapia fry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 1491-1493, 1996.

WU, Y.V.; ROSATI, R.R.; BROWN, P.B. Use of corn-derived ethanol coproducts and synthetic lysine and typtophan for growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 45p. 2174-2177, 1997.

XU, W.; REDDY, N.; YANG, Y. Extraction, characterization and potential applications of cellulose in corn kernels and distillers's dried grains with solubes (DDGS). **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 521-527, 2009.

ZHOU, P. et al. Growth response and feed utilization of juvenile hybrid catfish fed diets containing distiller's dried grains with solubles to replace a combination of soybean meal and corn meal. **North American Journal of Aquaculture**, V. 72, p.298–303, 2010.

CAPÍTULO II

**Grãos secos de destilaria com solúveis do milho em dietas para tilápia-do-Nilo:
valor nutritivo, desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas
fisiológicas em condição de estresse**

**Grãos secos de destilaria com solúveis do milho em dietas para tilápia-do-Nilo:
valor nutritivo, desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas
fisiológicas em condição de estresse**

Resumo: O presente estudo objetivou determinar o valor nutritivo dos grãos secos de destilaria com solúveis do milho (DDGSM) produzido no Brasil, assim como a substituição da proteína do farelo de soja (FS) pela do DDGSM em dietas para tilápia do Nilo. Foi conduzido estudo para avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia do FS e DDGSM. Os CDA foram determinados pelo método indireto (0,1% de Cr_2O_3 como indicador inerte) com base na substituição de 30% de uma dieta referência (26,81 PD e 3036 kcal kg^{-1} de ED) pelos ingredientes teste (FS e DDGSM). Para o estudo de desempenho produtivo, com duração de 90 dias, 220 juvenis (peso médio de $32,89 \pm 1,05$ g) foram distribuídos em 20 aquários (250 L) e foram alimentados com dietas isoproteicas e isocalóricas, contendo 10, 30, 50 e 70% de substituição da proteína do FS pela proteína do DDGSM e uma dieta controle sem substituição, formuladas com base nos valores digestíveis obtidos no estudo de digestibilidade para o FS e DDGSM. Após o término do ensaio de desempenho, dez peixes por tratamento foram submetidos ao estresse por classificação e em seguida determinado o perfil hematológico. As variáveis de desempenho produtivo não foram afetadas pelos tratamentos, assim como os parâmetros hematológicos antes e após estresse por classificação, no entanto houve aumento ($P < 0,05$) para relação altura de vilosidades:profundidade de criptas nos peixes alimentados com dietas contendo 50 e 70% de substituição da proteína do FS pela proteína do DDGSM. Houve aumento ($P < 0,05$) no hematócrito e hemoglobina dos peixes que receberam dieta com substituição de 30% e na proteína plasmática total e albumina nos que receberam dieta com 50% de substituição. Observou-se leucopenia, linfopenia, neutrofilia e aumento nas concentrações de glicose plasmática para todos os peixes após o estresse por classificação. A proteína do DDGSM pode substituir a proteína do FS em até 70% sem prejuízos ao desempenho produtivo e saúde, além de melhorar a integridade da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: DDGS, digestibilidade, nutrição e saúde, *Oreochromis niloticus*.

Corn distillery dry grain with soluble in diets for Nile tilapia: nutritional value, growth performance, intestinal morphology and physiological responses to stress conditions

Abstract: This study aimed to determine the nutritional value of corn distillery dry grain with soluble (CDDGS) produced in Brazil, as well as replacement of soybean meal protein (SM) by the CDDGS in diets for Nile tilapia. Was conducted study to evaluate the apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients and energy from the SM and CDDGS. ADC were determined by the indirect method (0.1% Cr₂O₃ as an inert indicator) based on replacement of 30% of a reference diet (26.81 DP and 3036 kcal kg⁻¹ DE) by test ingredients (SM and CDDGS). For the growth performance, 220 juveniles (mean weight of 32.89 ± 1.05 g) were distributed in 20 tanks (250 L). The fish were fed isocaloric and isoproteic diets containing replacement levels of 10, 30, 50 and 70% of SM protein by protein CDDGS and a control diet without replacement, formulated based on digestible values obtained in the digestibility study for the SM and CDDGS. At the end of 90 days were evaluated the performance parameters and feed utilization, intestinal morphology and determination of hematological profile. After this period, 10 fish per treatment were subjected to grading-induced stress and hematological profile was determined. Growth performance and feed utilization were not affected by treatments, as well as hematological parameters before and also after grading-induced stress, however there was a increase (P<0.05) for villus:crypt ratio in fish fed diets containing replacement of 50 and 70% of SM protein by protein CDDGS. An increase (P<0.05) in hematocrit and hemoglobin fish fed diet with replacement of 30% and total plasmatic protein and albumin in receiving diet with 50% replacement. It was observed leucopenia, lymphopenia and neutrophilia increase in plasma glucose concentrations for all fish after stress. The protein CDDGS can replace the SM protein up to 70% without impair growth performance and health, and improve the integrity of the intestinal mucosa of Nile tilapia juvenile.

Key words: DDGS, digestibility, nutrition and health, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

O farelo de soja, por possuir preço inferior as farinhas de origem animal, qualidade consistente, disponibilidade e alto valor nutritivo, é o ingrediente proteico de origem vegetal mais utilizado em rações para peixes. No entanto, o preço pago por esse ingrediente quase dobrou desde 2005 (ERS, 2013), o que resultou em elevação do custo das rações e dessa forma estimulando a utilização de alimentos proteicos alternativos.

Os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) são o resíduo seco resultante após a fermentação do amido de grãos de cereais por leveduras para a produção de etanol e sua disponibilidade como ingrediente para alimentação animal está aumentando em virtude do crescimento da indústria de bicomcombustíveis (Li et al., 2011; Brown et al., 2012; Liu, 2012).

Além de possuir teor relativamente elevado de proteína bruta, em média 30%, os DDGS não apresentam os fatores antinutricionais comumente encontrados na maioria dos alimentos proteicos de origem vegetal (Lim et al., 2009). Atualmente, os DDGS são amplamente utilizados como fonte proteica em rações para animais terrestres, mas sua utilização em alimentos para peixes é limitada, devido ao seu baixo teor em aminoácidos essenciais, em especial a lisina, que é cerca de 40% menor que a encontrada no farelo de soja (NRC, 1993; Feedstuffs, 2008).

Os DDGS de milho são ricos em vitamina A, niacina, colina, e fósforo, que é altamente biodisponível e presente em níveis elevados, no entanto, as concentrações de vitaminas e minerais diferem entre as fontes e os lotes que originaram este resíduo (Lim et al., 2011). Destaca-se ainda, que este alimento contém a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e dentre de seus constituintes encontram-se os mananoligossacarídeos (MOS), que são oligossacarídeos compostos por cerca de 40% de β -glucanos, 40% de α -D-manana (Hough, 1990).

Os β -glucanos são objeto de estudos atuando como moduladores da resposta imune em peixes (Lim et al., 2007), melhorando a atividade do sistema imune não específico e a resistência contra determinados patógenos (Elis, 2001; Costas et al., 2011) por meio do aumento da concentração plasmática de lisozima e também pelos componentes do sistema complemento, que elevam a atividade fagocítica de macrófagos (Nikl et al., 1991; Anderson, 1992; Chen e Ainsworth, 1992; Dalmo e

Bøgwald, 2008; Chang et al., 2013). Enquanto que as α -D-mananas, demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica (Křižková et al., 2001).

Os mananoligossacarídeos podem ter efeito prebiótico induzindo a proliferação de bactérias benéficas e melhorando o sistema imune (Savage et al., 1996). Estudos realizados com tilápia do Nilo indicam ainda, que dietas contendo MOS promovem efeito significativo no aumento da altura de vilosidades intestinais e melhora na conversão alimentar (Schwarz et al., 2010; Schwarz et al., 2011).

Algumas destilarias brasileiras têm incluído os cereais, principalmente milho e sorgo, como fontes para produção de etanol, disponibilizando os DDGS em grande quantidade em determinadas regiões do país. No entanto, não há informações acerca do valor nutritivo e o potencial de utilização dos DDGS produzidos no Brasil para tilápia do Nilo. Dessa forma, este estudo foi realizado para avaliar o valor nutritivo e a influência da substituição da proteína do farelo de soja pela do DDGS do milho (DDGSM) em dietas para tilápia do Nilo, sobre a digestibilidade, desempenho produtivo, eficiência de utilização do alimento, morfometria intestinal e hematologia antes e após estresse por classificação.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri. Os procedimentos adotados na condução destes experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 218/2012 CEUA).

2.1 Estudo I - Ensaio de digestibilidade

A dieta referência para o ensaio de digestibilidade foi formulada com base no milho e farelo de soja, para conter 26,81% de proteína digestível e 3036 kcal kg⁻¹ de energia digestível (Tabela 1). Para as dietas teste foram substituídos 30% da dieta referência pelo ingrediente teste, farelo de soja (FS) e grão seco de destilaria com solúveis do milho (DDGSM). As rações foram formuladas para conter 0,1% de óxido de

crômio III como marcador inerte (Bremer Neto et al., 2003). A composição química centesimal, energia bruta, perfil aminoacídico, cálcio, fósforo, % de óxido de crômio recuperado e respectivos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas utilizadas no ensaio de digestibilidade estão apresentados na Tabela 2.

Para confecção das rações, os ingredientes foram moídos (diâmetro geométrico médio menor que 0,7 mm), pesados e homogeneizados. Em seguida, foi adicionado 23% de água (70 °C) e procedeu-se extrusão em equipamento de rosca simples (Extrute[®], Ribeirão Preto, Brasil). A secagem foi realizada em estufa de ventilação forçada (55°C por 24 h), em seguida as dietas foram armazenadas em câmara fria (4°C) até sua utilização.

O ensaio foi realizado em sistema de recirculação de água, dotado de filtro físico e biológico e o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água foi feito utilizando-se sonda multi parâmetros YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA), além de kit para determinação dos valores para amônia tóxica (Labcon[®]). Os valores aferidos para pH ($6,71 \pm 0,06$), oxigênio dissolvido ($6,15 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$), sólidos totais dissolvidos ($0,17 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$), amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000 \text{ ppm}$) e temperatura ($26,22 \pm 1,32 \text{ °C}$) se mantiveram dentro das condições de conforto para a espécie estudada (Boyd, 1996).

Para realização desse estudo foram utilizados seis aquários de alimentação (formato circular e capacidade para 250 L) e três aquários para coleta de fezes (formato cônico e capacidade para 300 L), confeccionados em fibra de vidro. Nos aquários de alimentação dotados em seu interior de gaiola confeccionada em tela plástica foram alojados 60 juvenis de tilápia-do-Nilo com peso médio de 85 g (dez peixes por aquário) e adaptados por 12 dias, neste período os peixes receberam dieta referência quatro vezes ao dia. Em seguida os peixes foram adaptados recebendo as dietas denominadas referência e testes (FS e DDGSM), em intervalos de tempo de 3 h, tendo início às 8 h: 30 min, pelo período de sete dias. Durante o experimento os peixes foram alimentados com maior frequência no período vespertino. Ao final do dia as gaiolas foram transferidas para os aquários de coleta de fezes permanecendo até a manhã do dia subsequente, momento em que foi realizada a coleta. Posteriormente, as gaiolas retornaram aos aquários de alimentação e se deu início à nova fase de coleta.

As fezes coletadas foram congeladas e armazenadas a -20 °C e, posteriormente secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 48 h. Em seguida as fezes foram moídas e armazenadas em freezer para posteriores análises químicas.

Os CDA da proteína, aminoácidos, matéria seca, energia e fósforo nas rações foram determinados com base na seguinte fórmula:

$$CDA_{dieta} = [1 - (Cr_2O_3 \text{ na dieta} \times \text{nutriente ou energia das fezes} / Cr_2O_3 \text{ nas fezes} \times \text{nutriente ou energia das dietas})] \times 100$$

Os CDA do FS assim como do DDGSM foram calculados de acordo com Bureau et al. (1999) da seguinte maneira:

$$CDA_{ingrediente} = CDA_{dieta \text{ teste}} + [(CDA_{dieta \text{ teste}} - CDA_{dieta \text{ referência}}) \times (0,7 \times D_{ref.} / 0,3 \times D_{ingr.})]$$

Em que $D_{ref.}$ é a % do nutriente (ou kcal kg⁻¹) da dieta referência (base na matéria seca) e $D_{ingr.}$ é a % do nutriente (ou kcal kg⁻¹) da dieta teste (base na matéria seca).

2.2 Estudo II – Desempenho produtivo

Para o experimento de desempenho produtivo, cinco dietas isoproteicas (26,81% de proteína digestível) e isoenergéticas (3036 kcal kg⁻¹ de energia digestível) foram formuladas para conter os níveis de substituição da proteína do FS pela proteína do DDGSM de 10, 30, 50, 70%, mais uma dieta sem substituição (Tabela 3), tendo como base os valores obtidos por meio do ensaio de digestibilidade para o FS e DDGSM e os valores de exigência para a espécie e composição dos demais ingredientes descritos por Furuya et al. (2010). Dessa forma, os ingredientes foram moídos (diâmetro geométrico médio menor que 0,7 mm), pesados e homogeneizados para confecção das rações, em seguida foi adicionado 23% de água (70 °C) e procedeu-se extrusão em equipamento de rosca simples (Extrutech[®], Ribeirão Preto, Brasil). Após o processamento as rações foram secas em estufa de ventilação forçada (55°C por 24 h) e em seguida armazenadas em câmara fria (4°C) até sua utilização.

Foram recebidos alevinos de tilápia-do-Nilo, provenientes da Piscicultura Trifish (Botucatu, São Paulo). Os peixes foram alojados em dois tanques circulares com capacidade de 1000 L cada, onde permaneceram por 14 dias para período de adaptação e posterior distribuição nos aquários experimentais.

Após a adaptação, 220 juvenis com peso médio de $32,89 \pm 1,05$ g foram distribuídos aleatoriamente em 20 aquários de formato circular com capacidade para 250 L (11 peixes por aquário), em sistema de recirculação de água, dotado de filtro físico e biológico, aquecimento controlado por termostato digital e aeração. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições.

O arraçoamento foi realizado até saciedade aparente quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h: 30 min. Semanalmente foi realizado monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água utilizando sonda multi parâmetros YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA) além de kit para determinação dos valores para amônia tóxica (Labcon[®]). Os valores aferidos para pH ($6,67 \pm 0,08$), oxigênio dissolvido ($6,13 \pm 0,22$ mg L⁻¹), sólidos totais dissolvidos ($0,19 \pm 0,03$ g L⁻¹), amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000$ ppm) e temperatura ($26,49 \pm 1,28$ °C) se encontraram dentro das condições de conforto para a espécie (Boyd, 1996).

Ao final do período experimental de 90 dias, os peixes foram mantidos em jejum por 12 h, em seguida anestesiados com benzocaína (67 mg L⁻¹) e retirados aleatoriamente, oito peixes por tratamento (dois peixes por aquário) para determinação do perfil hematológico anterior ao estresse. Posteriormente foram utilizados mais dez peixes por tratamento provenientes de nova amostragem para serem desafiados pelo estresse por classificação, após isso foi determinado o peso final de todos os animais para posterior cálculo dos índices zootécnicos.

Para coleta e pesagem da gordura visceral, foram abatidos 12 peixes por tratamento sendo que de seis animais foram coletados também a porção proximal do intestino (três centímetros a partir do piloro) para posterior análise de morfometria. Para isso, as amostras foram presas em uma base de cartolina retangular e fixadas individualmente em solução de formol (10%) por 24 h e a conservação foi feita em álcool 70° até o momento da realização do procedimento histológico. Para análise de composição centesimal da carcaça foram amostrados cinco peixes por tratamento.

2.3 Parâmetros de crescimento e de utilização do alimento

Ao final do ensaio de desempenho foram analisados os seguintes parâmetros de crescimento e utilização do alimento:

Ganho de peso (g):

$$GP = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)};$$

Consumo de ração (g):

$$CR = \text{quantidade de alimento ingerido na matéria seca (g)};$$

Conversão alimentar:

$$CA = \text{alimento ingerido na matéria seca (g)} / GP \text{ (g)};$$

Taxa de eficiência proteica:

$$TEP = [GP \text{ (g)} / \text{consumo de proteína bruta na matéria seca (g)}]$$

Retenção de Nitrogênio (%):

$$RN = [((\text{peso final} \times \text{proteína na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína na carcaça inicial (\%)})) / 6,25 \times 1000] / (\text{peso médio} \times \text{número de dias});$$

Retenção de Energia (%):

$$RE = [((\text{peso final} \times \text{energia na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial} \times \text{energia na carcaça inicial (\%)})) \times 1000] / (\text{peso médio} \times \text{número de dias});$$

Gordura visceral (%):

$$GV = (\text{peso da gordura (g)} / \text{peso final (g)}) \times 100;$$

Sobrevivência (%):

$$SOB = (\text{número de animais final} / \text{número de peixes inicial}) \times 100;$$

2.4 Morfometria intestinal

Para as análises morfométricas foi utilizada a porção proximal do intestino de seis peixes por tratamento. O procedimento histológico foi realizado para obtenção de cortes seriados em parafina, com 5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE). As análises foram realizadas em microscopia de luz utilizando sistema analisador de imagem Leica Qwin 3.0 (Copyright © Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK) foram tomadas às medidas de altura de vilosidades e profundidade das

criptas de 30 vilosidades por lâmina. Em seguida foi realizado cálculo para obtenção da relação vilo:cripta (V:C) por meio da seguinte fórmula:

$$V:C = \text{altura da vilosidade } (\mu\text{m}) / \text{profundidade da cripta } (\mu\text{m})$$

2.5 Análises químicas

As análises químico-bromatológicas foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu e Laboratório de Química do IBB-UNESP/Botucatu segundo as metodologias descritas pela AOAC (2000). A determinação do perfil aminoacídico foi realizado no laboratório de análise bromatológicas LABTEC seguindo os protocolos determinados pela AOAC (2000).

Para o ensaio de digestibilidade foi determinado no FS, DDGSM, nas rações e nas fezes os teores de matéria seca, proteína bruta, perfil de aminoácidos, matéria mineral, fibra bruta, extrato etéreo e energia bem como as concentrações de cálcio, fósforo e Cr_2O_3 . No experimento de desempenho produtivo foram realizadas análises da composição centesimal do peixe inteiro inicial e nos diferentes tratamentos ao término do período experimental, quanto aos teores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo e energia, bem como das dietas incluindo a determinação dos teores de fibra bruta, cálcio e fósforo.

2.6 Estresse por classificação

No ensaio de estresse por classificação de tamanho, os animais (10 peixes por tratamento) foram alojados em cinco aquários (250 L) dotados em seu interior de gaiola confeccionada em tela plástica, para posterior simulação do estímulo estressor. Após período de 24 h, as gaiolas foram suspensas durante 15 minutos, porém permanecendo os animais ainda na água, para simulação de adensamento que ocorre durante a execução deste manejo em campo. Em seguida, as gaiolas foram retiradas dos aquários e os peixes foram mantidos sobre uma mesa, separados por tamanho e após um minuto retornaram aos aquários. Logo após foram retirados, aleatoriamente, oito peixes de cada tratamento para coleta de amostras de sangue para determinação do perfil hematológico.

Os peixes foram mantidos e alimentados com as dietas experimentais por mais 14 dias após serem submetidos a situação de estresse para verificação da mortalidade.

2.7 Análises Hematológicas

Os animais foram anestesiados com benzocaína (67 mg L^{-1}) e o sangue foi coletado por punção caudal utilizando seringas de 1 mL banhadas com anticoagulante (EDTA 3,0%, Ttec, Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ).

O número de eritrócitos foi determinado por meio do método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Toluidina Merck[®] a 0,01% em pipeta automática, na proporção de 1:200. A porcentagem de hematócrito (HTC) foi obtida utilizando o método de microhematócrito, de acordo com metodologia descrita por Goldenfarb et al. (1971). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) para determinação colorimétrica, conforme Collier (1944).

Com base nos resultados obtidos nessas análises foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio [$\text{VCM} = (\text{HTC} \times 10)/\text{eritrócitos}$] e concentração de hemoglobina corpuscular média [$\text{CHCM} = (\text{Taxa de hemoglobina} \times \text{HTC}) \times 100$], segundo Wintrobe (1934).

A diferenciação de leucócitos foi realizada por meio de extensões em lâminas, coradas com May-Grünwald Giensa (duas lâminas por peixe). A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando aumento de 100 vezes. Para isso, foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (linfócito, neutrófilo e monócito). A contagem total de leucócitos foi realizada nas mesmas extensões, e determinada por meio da relação eritrócito:leucócito. Em cada extensão foi realizada contagem de 2000 células e marcados o número de leucócitos (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Para a determinação da proteína plasmática total (PPT) foi utilizado refratômetro manual de Goldberg, por meio da quebra do capilar de microhematócrito acima da camada de leucócitos, após a leitura do HTC. A albumina (ALB) foi determinada em amostras de sangue coletadas sem a utilização de anticoagulante. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção

do soro. Os valores de ALB foram determinados pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG), para determinação colorimétrica. Com base na determinação da ALB e da PPT foi calculado os valores de globulina (GLOB) no soro e, posteriormente, a relação albumina:globulina (A:G) (Jain, 1986). A análise de glicose foi realizada no plasma com a utilização de kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG).

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos ($P < 0,05$) foi aplicado teste de comparação de médias de Tukey. Para os dados hematológicos foi realizado teste t, para comparação entre os momentos (antes e após estresse por classificação).

3. Resultados

A composição química centesimal, energia bruta, perfil aminoacídico, cálcio e fósforo e respectivos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) contidos no FS e no DDGSM estão apresentados na Tabela 4.

O desempenho produtivo, assim como a composição corporal não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos níveis de substituição da proteína do FS pela proteína do DDGS (Tabelas 5 e 6). Para as variáveis de morfometria intestinal (Tabela 7), altura de vilo e profundidade de cripta não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Contudo, houve diferença ($P < 0,05$) para a relação altura de vilo:profundidade de cripta, sendo que os níveis de substituição de 50 e 70% da proteína do FS pela do DDGS determinaram maior relação quando comparados aos demais tratamentos (0, 10 e 30% de substituição).

As variáveis hematológicas e bioquímicas dos peixes não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos ao final do período de 90 dias e após estresse por classificação (Tabela 8). No entanto, comparando-se o valor anterior e posterior ao estresse observou-se aumento ($P < 0,05$) para os valores de HTC e Hb nos peixes que receberam dietas com substituição de 30% e, nos valores de PPT e Alb nos peixes que

receberam dieta com 50% de substituição (Tabela 8). Houve aumento ($P<0,05$) nas concentrações de glicose plasmática dentro de todos os tratamentos após estresse (Tabela 8).

Comparando-se os peixes antes e após o estresse, foi determinada linfopenia, leucopenia e neutrofilia para os peixes em todos os tratamentos (Tabela 9). O estresse provocou ainda aumento ($P<0,05$) para o número total de neutrófilos nos peixes que receberam dieta sem substituição e redução no número total de monócitos nos peixes que receberam dieta contendo 70% de substituição (Tabela 9). Não foi observada durante 14 dias, mortalidade dos peixes após o desafio por classificação para nenhum dos tratamentos.

4. Discussão

Em função do grão de origem, os DDGS podem se apresentar deficientes em lisina, treonina e triptofano, em relação às exigências nutricionais da tilápia-do-Nilo, quando comparado ao FS (Lim et al., 2011) e, se tratando de lisina, as deficiências são substanciais (Lim e Yildirim-Aksoy, 2008). Este fato pôde ser observado no ensaio de digestibilidade realizado no presente estudo e que serviu de base para a formulação das dietas utilizadas no estudo de desempenho produtivo. Os valores obtidos para lisina foram 74% inferiores no DDGSM em comparação ao FS, contudo, os valores para metionina foram 14% superiores, o que reduziu a suplementação deste aminoácido nas dietas que continham este alimento. Dessa forma, a adição de outras fontes de proteína com perfil complementar de aminoácidos essenciais, além da suplementação com aminoácidos cristalinos nas rações, pode ser utilizada com eficiência para suprir essa deficiência (Welker et al., 2014).

As dietas do presente estudo foram formuladas para atender todas as exigências nutricionais estabelecidas para espécie estudada, com base nos valores digestíveis de cada alimento no intuito de verificar possíveis efeitos negativos ou positivos do DDGSM sobre as variáveis de desempenho produtivo e parâmetros de saúde da tilápia-do-Nilo. Desse modo a ausência de diferença significativa nesses parâmetros observadas neste estudo sugere que a inclusão do DDGSM em substituição parcial a proteína do farelo de soja considerando a mesma base proteica nas dietas é viável para a

espécie estudada. Outros autores recomendaram níveis de inclusão do DDGS em dietas para tilápia-do-Nilo e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) que variam de 30 a 40%, quando realizada a suplementação somente com lisina ou quando há utilização de outros ingredientes ricos neste aminoácido para suprir a deficiência deste ingrediente (Lovell, 1980; Tidwell et al., 1990; Webster et al., 1991; Webster et al., 1993; Lim et al., 2007).

No entanto, para atender as exigências dos outros aminoácidos essenciais como, metionina, treonina e triptofano, além de possibilitar a substituição da proteína do FS no nível de 70%, o limite de inclusão do DDGS para este estudo pôde ser estabelecido em 32,40%.

A síntese proteica pode ser negativamente afetada quando da deficiência de aminoácidos essenciais na dieta. Alguns autores observaram este efeito na composição corporal dos peixes alimentados com dietas contendo elevados níveis de inclusão de DDGS sem a suplementação de lisina, de forma que estes apresentaram conteúdo em proteína na carcaça inferior aos peixes que receberam a dieta controle (Webster et al., 1992; Lim et al., 2007). No entanto, com o atendimento das exigências em aminoácidos essenciais, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis de composição corporal analisadas neste estudo. Dessa forma, outros autores relataram a ausência de efeitos negativos sobre a composição corporal de peixes alimentados com dietas contendo níveis elevados de DDGS (30 a 40%) quando suplementadas com lisina ou em conjunto com alimentos ricos neste aminoácido (Webster et al., 1993; Lim et al., 2007).

O desenvolvimento da mucosa intestinal consiste no aumento da altura e densidade dos vilos, processo que decorre de dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas nas criptas e perdas de células que ocorrem normalmente no ápice dos vilos (Uni et al., 1998; Maiorka et al., 2002). O equilíbrio entre esses dois processos implica em renovação constante (proliferação - migração - extrusão), mantendo o tamanho dos vilos. Se algum agente estressor provocar reação da mucosa intestinal e desbalanço nesse equilíbrio ocorrem modificações na altura dos vilos. Contudo, se houver aumento na taxa de proliferação (mitose) com diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, haverá aumento no número de células e, conseqüentemente, aumento na altura dos vilos. Se o estímulo levar ao aumento na taxa

de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, o intestino deverá responder com a redução na altura dos vilos (Maiorka et al., 2002).

A melhor integridade da mucosa intestinal nos peixes que receberam as dietas contendo 50 e 70% de substituição da proteína do FS pela do DDGSM, pode ser atribuída à ausência de fatores antinutricionais comumente encontrados na maioria dos alimentos proteicos de origem vegetal como inibidores de tripsina, lectinas, gossipol, glucosinolatos, ácido erúico, além de conter baixos níveis de fitato (Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000; Lim et al., 2011; Brown et al., 2012; Overland et al., 2013). No entanto, a presença da levedura como componente do DDGSM também pode ter exercido influência.

A concentração de levedura existente nos DDGS pode chegar a representar 3,9% de sua biomassa total e contribuir com aproximadamente 5,3% de seu teor em proteína (Ingledew, 1999) e, dentre os componentes da levedura estão os mananoligossacarídeos (MOS). As lectinas específicas de manose predominam em muitas bactérias patogênicas intestinais e, por meio de ligações na superfície do epitélio do intestino, conferem aderência e, conseqüentemente, colonização e infecção (Baumler et al., 1997).

As α -D-mananas compreendem aproximadamente 40% da composição de MOS presente na levedura e exercem função de ligação nos receptores lecitinas específicos de manose das bactérias enteropatogênicas, servindo como atrativos e prevenindo a adesão às glicoproteínas da superfície do vilo, conseqüentemente reduzindo o risco de colonização e disseminação dos patógenos bacterianos (Firon et al., 1983). Outros autores também destacam que o MOS pode exercer efeitos benéficos à morfologia intestinal (Yilmaz et al., 2007; Salze et al., 2008; Schwarz et al., 2010; Refstie et al., 2010). Entretanto, os nucleotídeos também podem ter contribuído para melhor integridade da mucosa intestinal nos peixes.

Os nucleotídeos presentes na levedura podem modificar o tipo e crescimento da microflora intestinal, beneficiando as bifidobactérias que atuam reduzindo o pH intestinal por meio da capacidade de hidrolisar açúcar para ácido lático, desse modo suprimindo a proliferação de bactérias patogênicas (Uauy et al., 1994).

Os β -glucanos são outro componente presente na composição da levedura em grandes quantidades e, estudos apontam sua ação como imuno estimulante nos peixes

(Chen e Ainsworth, 1992; Robertson et al., 1994; Barros et al., 2014). Lim et al. (2007) encontraram valor para concentração de β -glucanos no DDGS de $5,7 \text{ g kg}^{-1}$. Porém, neste estudo, não houve efeitos significativos entre os tratamentos para a maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados, antes e após estresse por classificação, sendo que estes se mantiveram dentro do intervalo de referência estabelecido para a espécie e ao obtido para tilápias hípidas sob condições experimentais semelhantes (Ferrari et al., 2004; Hrubec e Smith, 2010; Tachibana et al., 2010).

Os resultados obtidos quanto a possíveis respostas imunomodulatórias proporcionadas pelos DDGS se mostram inconsistentes. Estudos realizados com tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo DDGS buscando avaliar a saúde por meio de análises hematológicas e imunológicas não encontraram efeito significativo sobre esses parâmetros (Lim et al., 2007; Welker et al., 2014). Contudo, estudo realizado com bagre do canal verificou influência positiva sobre estes mesmos parâmetros nos peixes alimentados com rações contendo DDGS em sua composição quando submetidos a desafio bacteriano (Lim et al., 2009). Dessa forma mais estudos devem ser direcionados para avaliar os possíveis efeitos dos DDGS sobre a saúde dos peixes.

A elevação dos níveis de glicose plasmática obtidos no presente estudo para os peixes de todos os tratamentos após estresse por classificação de tamanho configura-se como resposta fisiológica de ajuste para restauração da homeostase sugerindo possível ativação da glicogenólise e glicogênese, atribuída as catecolaminas e ao cortisol, buscando atender a maior demanda de energia devido ao estímulo imposto (Costas et al., 2011, 2012; El-Khaldi, 2010; Jun et al., 2015). Além das alterações osmóticas e iônicas, o cortisol pode exercer efeitos negativos sobre o sistema imune. Dessa forma foi observado também neste estudo, linfopenia, leucopenia e neutrofilia nos peixes em todos os tratamentos após o estresse. Estas alterações são frequentemente reportadas em situações de exposição ao estresse (Falcon et al., 2008; Fernandes Junior et al., 2010; Barros et al., 2014).

Houve melhora significativa para os valores de HTC, Hb, PPT e Alb em tratamentos diferentes que receberam dieta contendo DDGSM, assim como ocorreu para o número total de neutrófilos e redução no número de monócitos. Contudo, há variação na contagem total das células do sistema imunológico, podendo ser a causa de

não ter revelado diferenças significativas para os demais tratamentos. Pesquisas são necessárias para verificar nos DDGS compostos que tenham influência sobre a higidez dos peixes e possíveis variáveis que possam ser afetadas.

O presente estudo avaliou o valor nutritivo e o potencial de utilização do DDGSM como fonte proteica alternativa ao FS em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo obtendo o mesmo desempenho produtivo, higidez e melhora na estrutura intestinal. As características deste alimento conferem potencial para utilização em dietas pela indústria aquícola. Novos estudos devem ser desenvolvidos em cultivo intensivo para validar os resultados obtidos no laboratório, buscando efeito sobre o desempenho produtivo correlacionado a melhor integridade da mucosa intestinal e saúde dos animais submetidos a este sistema de produção.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo até 70% da proteína do FS pode ser substituída pela do DDGSM quando atendidas as exigências em aminoácidos essenciais, sem prejuízos no desempenho produtivo e saúde, além de melhorar a integridade da mucosa intestinal em juvenis de tilápia-do-Nilo.

5. Referências

- Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, and vaccine carries in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 281-307.
- AOAC, 2000. *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists*. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi, R.O., Pezzato, L.E., Fernandes Jr., Guimarães, I.G., Fernades Jr., A.; Padovani, C.R., Sartori, M.M.P., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun.*, 39, 188-195.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1997. Fimbrial adhesions of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 412, 149–158.
- Boyd C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., Cantelmo, O.A., 2003. Reduction in chromium (III) oxide level as an external marker. *R. Bras. Zootec.*, 32, 249-255.

- Brown, M.L., Schaeffer, T.W., Rosentrater, K.A., Barnes, M.E., Muthukumarappan, K., 2012. Feeding DDGS to Finfish. In: Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization (Liu, K., Rosentrater, A.), pp. 341 - 390. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout. *Aquaculture*, 180, 345-358.
- Chang, C.S.; Huang, S.L.; Chen, S.; Chen, S.N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MGB) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* aquaculture. *Fish Shellfish Immun.*, 35, 115-125.
- Chen, D., Ainsworth, A. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15, 295-304.
- Chen, D.; Ainsworth, A.J., 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15, 295-304.
- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.*, 50, 550-552.
- Costas, B., Aragão, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2012. Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino Acids*, 43, 327-335.
- Costas, B., Conceição, L.E.C., Aragão, C., Martos, J.A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Afonso, A., 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316, 68-76.
- Dalmo, R.A.; Bøgwald, J., 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immun.*, 25, 384-396.
- Elis, A.E., 2001. Innate host defense mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 827-839.
- El-Khaldi, A., 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi J. Biol. Sci.*, 17, 241-246.
- ERS (USDA Economic Research Service). 2015. Oil crops yearbook. United States Department of Agriculture, Economic Research Service, Beltsville, MD, USA. Accessed June 22, 2015, at <http://usda.mannlib.cornell.edu/mannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1290>.

- Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Solarte, W.V.N., Guimarães, I.G., 2008. Differential leucocyte counts of Nile tilapia fed diets supplemented vitamin C and lipid and submitted to low temperature stress. *Ci. Anim. Bras.*, 9, 543-551.
- Feedstuffs, 2008. Feedstuffs ingredient analysis table, 79, n38.
- Ferrari, J.E.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Gonçalves, G.S., Hisano, H., Kleeman, G.K., 2004. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. *Acta Sci.*, 26, 429-436.
- Fernandes Junior, A.C., Pezzato, L.E., Guimarães, I.G., Teixeira, C.P., Koch, J.F.A., Barros, M.M., 2010. Hematic response of Nile tilapia fed diets supplemented with choline and submitted to stimulus by low temperature. *Rev. Bras. Zootec.*, 39, 1619-1625.
- Firon, N.; Ofek, I.; Sharon, N., 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydr. Res.*, 120, 235-249.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.B., Feiden, A., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Path.*, 56, 35-39.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2000, 138p.
- Hough, J.S., 1990. Biotecnologia de la cerveza y de malta. Zaragoza: Acribia, 1990, 194p.
- Hrubec, T.C., Smith, S., 2010. Hematology of fishes. In: Schalm's veterinary hematology (Weiss, D.J., Wardrop, K.J.), pp. 994 – 1003. Wiley-Blackwell, USA.
- Inglede W. M. 1999. Yeast – could you base business on this bug? Pages 27–47 in T. P. Lyons and K. A. Jacques, editors. Under the microscope – focal points for the new millennium – biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Jain, N.C., 1986. Schalm's veterinary hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1221p.
- Jun, Q., Hong, Y., Hui, W., Didlyn, K.M., Jie, H., Pao, X., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. *Aquac. Res.*, 46, 335-345.

- Kriscová, L., Duracková, Z., Sandula, J., Sasinková, V., Krajcovic, J., 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Research*, 497, 213-222.
- Li, M.H., Oberle, D.F., Lucas, P.M., 2011. Evaluation of corn distillers dried grains with solubles and brewers yeast in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquac. Res.* 42, 1424–1430.
- Lim, C., Garcia, J.C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., Evans, J.J. 2007. Growth response and resistance to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing distiller's dried grains with solubles. *J. World Aquac. Soc.*, 38, 231-237.
- Lim, C., Li, E., Klesius, P.H., 2011. Distiller's dried grains with solubles as an alternative protein source in diets of tilapia. *Rev. Aquacult.*, 3, 172-178.
- Lim, C., Yildirim-aksoy, M., 2008. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. Pages 67-82 in *Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, October 12–14, 2008, Cairo, Egypt.
- Lim, C., Yildirim-aksoy, M., Klesius, P.H., 2009. Growth response and resistance to *Edwardsiella ictaluri* of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing distiller's dried grains with solubles. *J. World Aquac. Soc.*, 40, 182-193.
- Liu, K., 2012. Chemical Composition of DDGS, Distillers Grains. In: Liu, K., Rosentrater, A. (Eds.), *Production, Properties, and Utilization*, pp. 143–178. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Lovell, R. T. 1980. Nutritional value of solid by-products from ethanol production from corn. Auburn Technical Assistance Center, Auburn University, Auburn, Alabama, USA.
- Maiorka, A., Boleli, I.C., Macari, M., 2002. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte* (Macari, M., Furlan, R.L., Gonzales, E.), pp.113-123. Funep., Jaboticabal.
- Nikl, L.; Albright, L. J.; Evelyn, T. P. T., 1991. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 12, 7-12.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, D.C., USA.
- Øverland, M., M., Krogdahl, A., Shurson, G., Skrede, A., Denstadli, V., 2013. Evaluation of distiller's dried grains with solubles (DDGS) and high protein distiller's dried grains (HPDDG) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 416–417, 201–208.

- Ranzini-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 140p.
- Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R.R., Elvebø, O., 2010. Effects of dietary yeasty cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*, 305, 109-116.
- Robertson, B., R. E. Engstand, and J. B. Jorgensen. 1994. β -Glucan as immunostimulants. Pages 83–99 in: *Modulators of fish immune responses* (J. Stolen and T. C. Fletcher). SOS, Fair Haven, New Jersey, USA.
- Salze, G., Mclean, E., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*, 274, 148-152.
- Savage, T.F., Cotter, P.F., Zakrzewska, E.I., 1996. The effects of feeding mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of wrolstad MW male turkeys. *Poultry Science*, 75, 143.
- Schwarz, K.K., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Gualdezi, M.C., Lima, P.A.G., 2011. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Rev. Bras. Zootec*, 40, 2634-2640.
- Schwarz, K.K., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Michelato, M., Gualdezi, M.C., 2010. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. *Acta Sci.*, 32, 197-203.
- Tachibana, L., Gonçalves, G.S., Guimarães, I.G., Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., 2010. Substituição do milho pelo tritcale na alimentação de tilápias-do-nilo. *Rev. Bras. Zootec*, 39, 241-246.
- Tidwell, J.H., Webster, C.D., Yancey, D.H., 1990. Evaluation of distillers grains with solubles in prepared channel catfish diets. *Trans. Kentucky Acad. Sci.*, 52, 135-138.
- Uauy, R., 1994. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J. Nutr.*, 124, 157S-159.
- Uni, Z., Platin, R., Sklan, D. 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J. Comp. Physiol.*, 168, 241-247.
- Webster C.J., Tidwell, J.H., Goodgame, L.S., Johnsen P.B., 1993. Growth, body composition, and organoleptic evaluation of channel catfish fed diets containing different percentages of distiller's grain with solubles. *Prog. Fish Cult.*, 55, 95-100.
- Webster C.J., Tidwell, J.H., Goodgame, L.S., Clark, J.A., Yancey, D.H., 1992. Winter feeding and growth of channel catfish fed diets containing varying percentages of distiller's grains with solubles as a total replacement of fish meal. *J. Appl. Aquacult.*, 1, 1–4.

- Webster, C.J.; Tidwell, J.H.; Yancey, D.H., 1991. Evaluation of distiller's grains with solubles as a protein source in diets for channel catfish. *Aquaculture*, 96, 179-190.
- Welker, T.L., Lim, C., Klesius, P.H., Liu, K., 2014. Evaluation of Distiller's Dried Grains with Solubles from Different Grain Sources as Dietary Protein for Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* (♀)×*Oreochromis aureus* (♂). *J. World Aquac. Soc*, 45, 625-637.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, 51, 32-49.
- Yilmaz, E., Genc, M.A., Genc, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Isr. J. Aquacult.*, 59, 182-188.

Table 1. Formulation (%) and calculated composition of reference diet.

<i>Ingredients</i>	<i>(%)</i>
Soybean meal	48.10
Corn gluten - 60	4.50
Wheat middling	10.00
Corn	33.96
Soybean oil	0.19
L-lysine	0.22
DL-methionine	0.31
L-threonine	0.33
Dicalcium phosphate	1.63
Antioxidant (BHT) ¹	0.02
Salt	0.10
Vitamin and mineral premix ²	0.50
Vitamin C ³	0.04
Chromium oxide-III	0.10
<i>Calculated composition</i>	
<i>(wet weight basis)</i>	
Digestible energy (kcal kg ⁻¹)	3036
Digestible protein	26.81
Crude fiber	4.50
Calcium	0.57
Available phosphorus	0.51
Lysine	1.53
Methionine	0.58
Methionine +Cystine	0.92
Threonine	1.18
Tryptophan	0.30

¹Butylated hydroxytoluene; ²Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ³Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland.

Table 2. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %)¹ of nutrients and energy of the experimental diets (% dry matter)².

	Diets		
	Ref. ³	70%-Ref. + 30%-CDDGS ⁴	70%-Ref. + 30%-SB ⁵
<i>Proximate composition</i>			
Dry matter	96.42 (77.92)	96.28 (67.99)	96.26 (73.71)
Crude protein	30.91 (94.23)	30.93 (92.93)	37.06 (94.36)
Crude fat	1.30 (75.81)	2.34 (82.79)	1.77 (82.66)
Crude fiber	3.63	6.02	4.56
Ash	4.93 (43.92)	5.21 (40.94)	5.69 (44.17)
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	4478 (80.36)	4659 (71.52)	4567 (76.93)
<i>Amino acids</i>			
Alanine	1.45 (93.77)	1.69 (94.29)	1.58 (94.98)
Arginine	1.78 (98.51)	1.60 (97.63)	2.19 (98.75)
Aspartic acid	2.62 (97.67)	2.33 (96.74)	3.27 (98.32)
Glycine	1.16 (92.67)	1.12 (91.41)	1.40 (93.47)
Isoleucine	1.28 (95.83)	1.21 (95.17)	1.52 (96.39)
Leucine	2.59 (96.20)	3.01 (95.87)	2.85 (96.58)
Glutamic acid	5.39 (98.32)	5.45 (97.79)	6.15 (98.51)
Lysine	1.87 (97.01)	1.55 (95.34)	2.24 (97.41)
Cystine	0.26 (99.97)	0.32 (99.02)	0.31 (99.21)
Methionine	0.50 (99.41)	0.47 (98.53)	0.45 (98.64)
Phenylalanine	1.47 (96.75)	1.48 (96.03)	1.70 (97.31)
Tyrosine	0.80 (99.02)	0.84 (95.87)	0.97 (97.17)
Threonine	1.34 (95.23)	1.24 (93.03)	1.41 (95.24)
Tryptophan	0.11 (81.34)	0.10 (67.50)	0.14 (85.00)
Proline	1.75 (96.20)	2.03 (95.58)	1.90 (96.15)
Valine	1.32 (94.55)	1.34 (94.07)	1.54 (95.26)
Histidine	0.76 (97.19)	0.78 (96.89)	0.88 (97.58)
Serine	1.42 (96.07)	1.43 (95.42)	1.63 (96.63)
<i>Calcium and Phosphorus</i>			
Total calcium	0.49	0.39	0.42
Total phosphorus	0.52 (44.54)	0.39 (43.66)	0.50 (27.28)
<i>Marker⁶</i>			
Cr ₂ O ₃	0.090	0.093	0.102

¹ADCS = apparent digestibility coefficients; ²Values are means (n=3); ³Ref. = Reference diet; ⁴CDDGS = Corn distillers dry grains with solubles; ⁵SB = Soybean meal; ⁶Marker Cr₂O₃ = Chromium oxide-III percentage of recovered in diets.

Table 3. Formulation (%), calculated and analyzed composition of experimental diets.

Ingredients	Levels of replacement (%) ¹				
	0	10	30	50	70
Soybean meal	28.60	25.69	20.00	14.30	8.60
CDDGS	-	4.50	13.80	23.10	32.40
Poultry viscera meal	12.00	12.30	12.78	12.92	13.78
Corn gluten - 60	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Corn	42.31	40.61	36.71	33.02	28.40
Soybean oil	0.02	0.11	0.50	0.99	1.44
L-lysine	-	0.10	0.20	0.28	0.38
DL-methionine	0.13	0.13	0.10	0.08	0.06
L-threonine	0.30	0.30	0.30	0.28	0.28
L-tryptophan	0.04	0.06	0.09	0.12	0.15
Dicalcium phosphate	3.80	3.78	3.76	3.78	3.70
CMC ²	2.00	1.61	0.97	0.32	-
Vitamin and mineral premix ³	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Vitamin C ⁴	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Antioxidant (BHT) ⁵	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Calculated composition (% original matter)</i>					
Digestible energy (kcal kg ⁻¹)	3036	3036	3036	3036	3036
Digestible protein	26.81	26.81	26.81	26.65	26.79
Crude fiber	4.07	4.00	4.00	4.00	4.29
Crude fat	4.74	5.04	5.82	6.65	7.53
Total calcium	1.85	1.85	1.86	1.87	1.87
Phosphorus available	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52
Lysine	1.54	1.58	1.57	1.53	1.53
Methionine	0.54	0.54	0.52	0.52	0.52
Methionine + Cystine	0.92	0.93	0.93	0.94	0.96
Threonine	1.18	1.21	1.21	1.18	1.18
Tryptophan	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>Proximate composition (% dry matter)</i>					
Dry matter	96.88	96.12	95.44	95.26	94.67
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	4014	4058	4146	4221	4312
Crude protein	29.60	30.48	30.22	30.44	31.01
GE: CP ⁶	135.62	133.14	137.20	138.71	139.04
Crude fiber	3.63	3.75	3.71	4.00	4.15
Crude fat	4.67	5.87	5.57	6.52	7.78
Total calcium	1.84	1.97	1.81	1.88	1.86
Total phosphorus	1.01	0.97	1.07	1.00	1.12

¹Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS; ²CMC = Carboxy methyl cellulose; ³Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ⁴Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland; ⁵Butylated hydroxytoluene; ⁶GE:CP = energy:protein ratio.

Table 4. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %)¹ of nutrients and energy of the test ingredients (% dry matter)².

	Ingredients	
	CDDGS	Farelo de soja
<i>Proximate composition</i>		
Dry matter	88.20 (42.64)	85.80 (63.34)
Crude protein	32.46 (90.04)	51.70 (94.42)
Crude fat	7.71 (85.53)	3.50 (85.22)
Crude fiber	11.58	6.01
Ash	5.01 (34.09)	6.24 (42.56)
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	5090 (53.36)	4751 (69.77)
<i>Amino acids</i>		
Alanine	2.45 (95.02)	2.10 (96.93)
Arginine	1.30 (94.81)	3.53 (99.03)
Aspartic acid	1.84 (93.64)	5.36 (99.07)
Glycine	1.15 (88.43)	2.21 (94.46)
Isoleucine	1.17 (93.49)	2.34 (97.10)
Leucine	4.33 (95.41)	3.87 (97.16)
Glutamic acid	6.09 (96.68)	8.87 (98.78)
Lysine	0.90 (87.23)	3.47 (97.92)
Cystine	0.51 (99.60)	0.49 (99.54)
Methionine	0.42 (94.45)	0.36 (94.28)
Phenylalanine	1.63 (94.51)	2.52 (98.08)
Tyrosine	1.00 (88.15)	1.53 (93.71)
Threonine	1.10 (86.78)	1.77 (95.25)
Tryptophan	0.05 (nd ³)	0.22 (89.39)
Proline	2.93 (94.71)	2.53 (96.06)
Valine	1.51 (93.11)	2.32 (96.21)
Histidine	0.90 (96.29)	1.32 (98.10)
Serine	1.58 (94.05)	2.37 (97.42)
<i>Calcium and Phosphorus</i>		
Total calcium	0.17	0.24
Total phosphorus	0.27 (47.87)	0.47 (26.05)

¹ADCS = apparent digestibility coefficients; ²Values are means (n=3); ³nd = no detected.

Table 5. Growth performance and feed utilization of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

Levels of replacement (%) ²	0	10	30	50	70	<i>P-value</i>
Weight gain (g) ^a	177.60 ± 4.69	172.86 ± 6.24	170.76 ± 9.25	175.69 ± 4.77	179.70 ± 1.38	0.252
Feed intake (g) ^b	171.05 ± 0.58	171.31 ± 1.14	170.91 ± 2.45	170.89 ± 1.31	172.00 ± 1.45	0.829
Feed conversion ratio ^c	0.94 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.05	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.01	0.601
Protein efficiency ratio (%) ^d	3.63 ± 0.09	3.47 ± 0.12	3.44 ± 0.17	3.50 ± 0.09	3.43 ± 0.09	0.152
Nitrogen retention (%) ^e	53.80 ± 2.90	48.57 ± 2.79	51.85 ± 4.66	50.60 ± 2.62	49.57 ± 2.68	0.227
Energy retention (%) ^f	38.04 ± 7.07	36.34 ± 2.95	36.42 ± 4.36	32.67 ± 2.29	37.675 ± 1.696	0.413
Visceral fat (%) ^g	2.47 ± 0.65	2.44 ± 0.52	2.45 ± 0.39	2.46 ± 0.63	2.45 ± 0.54	0.981
Survival (%) ^h	100.00 ± 0	97.72 ± 4.55	97.72 ± 4.55	95.45 ± 5.25	97.72 ± 4.55	0.684

¹Values presented as means ± standard deviation. Means in the same row with different letters differ ($P < 0.05$) by Tukey test. $n = 4$. ²Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS; ^aWeight gain: [final weight (g) - initial weight (g)]; ^bFeed intake: dry matter ingested feed (g); ^cFeed conversion: [dry matter feed intake (g)/weight gain (g)]; ^dProtein efficiency ratio: [weight gain (g)/(dry matter crude protein intake (g))]; ^eNitrogen retention (% Nitrogen intake): (Nitrogen retention/Nitrogen intake)*100; ^fEnergy retention (% Energy intake): (Energy retention/Energy intake)*100; ^gVisceral fat (VF) = (visceral fat weight/body weight) × 100; ^hSurvival: [(number of final fish/number of initial fish)]*100.

Table 6. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

	Initial	Levels of replacement (%) ²					<i>P-value</i>
		0	10	30	50	70	
Moisture (%)	70.94 ± 7.88	70.57 ± 2.06	70.94 ± 1.09	70.39 ± 1.50	70.92 ± 0.94	69.04 ± 0.51	0.185
Protein (%)	14.65 ± 4.17	15.14 ± 0.34	15.52 ± 0.81	15.63 ± 0.47	15.88 ± 0.43	15.54 ± 0.65	0.387
Lipid (%)	9.91 ± 2.25	10.15 ± 2.44	8.30 ± 1.73	9.05 ± 2.07	8.01 ± 0.58	9.97 ± 1.66	0.265
Gross energy (kcal kg ⁻¹)	1681 ± 444	1663 ± 189	1663 ± 102	1758 ± 130	1644 ± 89	1825 ± 88	0.143
Ash (%)	4.20 ± 1.35	4.19 ± 0.28	3.98 ± 0.47	4.10 ± 0.21	4.66 ± 0.33	4.52 ± 0.78	0.137

¹Values presented as means ± standard deviation (n = 5). Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test; ²Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS.

Table 7. Villus height (VH), crypt depth (CD) and villus:crypt ratio (V:C) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

Levels of replacement (%) ²	0	10	30	50	70	<i>P-value</i>
VH (μm)	288.10 ± 37.70	310.93 ± 15.53	303.50 ± 61.00	322.00 ± 40.30	313.50 ± 26.30	0.643
CD (μm)	23.07 ± 2.65	25.55 ± 1.29	25.00 ± 3.71	22.81 ± 3.07	21.83 ± 1.92	0.116
V:C	12.54 ± 1.38b	12.19 ± 0.88b	12.13 ± 1.63b	14.19 ± 1.57a	14.40 ± 1.18a	0.011

¹Values presented as means ± standard. Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test. n= 180.

Table 8. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the CDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress¹.

	Group	Levels of replacement (%) ²				
		0	10	30	50	70
RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)	No stress	1.66 ± 0.18	1.75 ± 0.15	1.73 ± 0.29	1.72 ± 0.15	1.74 ± 0.19
	Stressed	1.71 ± 0.22	1.78 ± 0.15	1.82 ± 0.15	1.79 ± 0.19	1.77 ± 0.18
HTC (%)	No stress	26.18 ± 2.88	27.78 ± 2.16	26.38 ± 1.81b	26.38 ± 3.20	26.66 ± 2.72
	Stressed	27.50 ± 3.18	28.09 ± 1.35	29.16 ± 2.32a	28.00 ± 2.38	27.78 ± 3.79
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.81 ± 0.84	6.89 ± 0.59	6.62 ± 0.63b	6.70 ± 0.73	6.66 ± 0.74
	Stressed	7.18 ± 0.77	7.27 ± 0.53	7.66 ± 0.75a	7.23 ± 0.83	7.09 ± 0.85
MCV (fL)	No stress	157.70 ± 10.95	159.06 ± 13.69	154.68 ± 15.22	154.16 ± 18.86	154.54 ± 17.36
	Stressed	161.31 ± 14.64	159.19 ± 15.43	160.47 ± 11.28	156.76 ± 10.75	157.42 ± 16.67
MCHC (%)	No stress	26.01 ± 1.05	24.83 ± 1.55	25.10 ± 1.73	25.49 ± 2.16	25.01 ± 1.48
	Stressed	26.14 ± 1.10	25.87 ± 1.23	26.27 ± 1.51	25.78 ± 1.60	25.69 ± 2.45
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	2.86 ± 0.54	2.84 ± 0.48	2.91 ± 0.18	2.64 ± 0.20b	2.78 ± 0.36
	Stressed	2.89 ± 0.30	2.85 ± 0.34	3.04 ± 0.21	3.06 ± 0.31a	3.06 ± 0.32
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	0.99 ± 0.25	0.94 ± 0.25	1.00 ± 0.14	0.96 ± 0.13b	0.97 ± 0.18
	Stressed	1.05 ± 0.25	0.98 ± 0.27	0.94 ± 0.08	1.11 ± 0.12a	1.14 ± 0.20
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.87 ± 0.34	1.90 ± 0.38	1.92 ± 0.21	1.68 ± 0.25	1.18 ± 0.38
	Stressed	1.84 ± 0.28	1.87 ± 0.23	2.10 ± 0.27	1.95 ± 0.30	1.92 ± 0.22
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.53 ± 0.10	0.51 ± 0.19	0.53 ± 0.12	0.59 ± 0.19	0.57 ± 0.23
	Stressed	0.59 ± 0.19	0.53 ± 0.16	0.45 ± 0.08	0.59 ± 0.15	0.60 ± 0.12
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	54.07 ± 19.47b	55.23 ± 7.75b	57.65 ± 12.10b	65.62 ± 18.75b	56.38 ± 11.69b
	Stressed	113.56 ± 24.35a	101.45 ± 37.97a	114.37 ± 39.02a	94.67 ± 15.38a	95.58 ± 16.48a

¹Values are means ± standard deviation of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Means followed by different letters differ statistically (t test; P<0.05). ²Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS; RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose.

Table 9. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the CDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress¹.

	Group	Levels of replacement (%) ²				
		0	10	30	50	70
Lymphocyte (%)	No stress	80.38 ± 14.02a	78.44 ± 16.15a	80.31 ± 22.55a	73.06 ± 23.08a	76.13 ± 19.90a
	Stressed	48.00 ± 18.26b	52.19 ± 14.92b	52.00 ± 17.19b	50.06 ± 13.61b	49.50 ± 13.74b
Neutrophil (%)	No stress	13.44 ± 10.20b	14.88 ± 13.50b	13.25 ± 17.57b	19.75 ± 18.80b	17.75 ± 17.06b
	Stressed	45.88 ± 15.58a	41.13 ± 12.53a	42.31 ± 14.61a	41.75 ± 13.09a	44.63 ± 11.06a
Monocyte (%)	No stress	6.19 ± 4.91	6.69 ± 3.24	6.44 ± 5.15	7.19 ± 5.12	6.13 ± 3.27
	Stressed	6.13 ± 3.69	6.69 ± 3.71	5.69 ± 4.17	8.19 ± 3.98	5.88 ± 3.69
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	51544 ± 8632a	55029 ± 5271a	56275 ± 4686a	51304 ± 9794a	54195 ± 5038a
	Stressed	27844 ± 5612b	27959 ± 3821b	26253 ± 9973b	25686 ± 6716b	25731 ± 8895b
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	42149 ± 13353a	43269 ± 10673a	45564 ± 13492a	36989 ± 13797a	41174 ± 10886a
	Stressed	13183 ± 5575b	14745 ± 5025b	13459 ± 7045b	12556 ± 4407b	12820 ± 5753b
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	6272 ± 4571b	8044 ± 7504	7075 ± 8661	10474 ± 11046	9598 ± 9158
	Stressed	12985 ± 5516a	11378 ± 3166	11114 ± 6322	10931 ± 5567	11501 ± 5108
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	3084 ± 2302	3650 ± 1822a	3565 ± 2625	3772 ± 3160	3355 ± 1826a
	Stressed	1653 ± 1089	1798 ± 971b	1655 ± 1667	2159 ± 1166	1370 ± 827b

¹Values are means ± standard deviation of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Means followed by different letters differ statistically (t test; P<0.05). ²Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS.

CAPÍTULO III

Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína dos grãos secos de destilaria com solúveis do sorgo em dietas para tilápia-do-Nilo, sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse

Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína dos grãos secos de destilaria com solúveis do sorgo em dietas para tilápia-do-Nilo, sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal e respostas fisiológicas em condição de estresse

Resumo: Os grãos secos de destilaria com solúveis do sorgo (DDGSS) foram avaliados com objetivo de determinar seu valor nutritivo e os efeitos da substituição da proteína do farelo de soja (FS) pela do DDGSS em dietas para tilápia do Nilo. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia do FS e DDGSS foram determinados pelo método indireto (0,1% de Cr_2O_3 como indicador inerte) com base na substituição de 30% de uma dieta referência (26,81 PD e 3036 kcal kg^{-1} de ED) pelos ingredientes teste (FS e DDGSS). Para o ensaio de desempenho produtivo, cinco dietas isoproteicas e isocalóricas foram formuladas com base nos valores digestíveis dos alimentos para conter: 10, 30, 50 e 70% de substituição da proteína do FS pela proteína do DDGSS, além de dieta sem substituição. 220 juvenis de tilápia do Nilo (peso médio de $32,89 \pm 1,05$ g) foram distribuídos aleatoriamente em 20 aquários de 250 L. Após 90 dias, dez peixes por tratamento receberam o estímulo de estresse por classificação de tamanho, para determinação do perfil hematológico. O desempenho produtivo e utilização do alimento, assim como o perfil hematológico antes e após o estresse não foram influenciados pelos tratamentos. Observou-se aumento ($P < 0,05$) na relação vilo:cripta nos peixes alimentados com dieta contendo 70% de substituição da proteína do FS pela do DDGSS. Houve aumento ($P < 0,05$) para hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média nos peixes que receberam dieta com 30 e 70% de substituição, respectivamente. Foi determinada leucopenia, linfopenia e neutrofilia, assim como, aumento nas concentrações de glicose plasmática para todos os peixes após o estresse por classificação. Dessa forma, o DDGSS se apresenta como fonte proteica alternativa e pode substituir 70% da proteína do FS, sem afetar os parâmetros de crescimento, eficiência de utilização do alimento e saúde dos animais, além de melhorar a integridade da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: DDGS, digestibilidade, nutrição e saúde, *Oreochromis niloticus*

Replacing the soybean meal protein by sorghum distillery dry grain with soluble protein in diets for Nile tilapia, on performance, intestinal morphology and physiological responses under stress conditions

Abstract: Sorghum distillery dry grain with soluble (SDDGS) was evaluated in order to determine the nutritional value and the effect of this food protein replacement by protein soybean meal (SBM) in diets for Nile tilapia. Apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients and energy from the SM and SDDGS were determined using the indirect method (0.1% Cr₂O₃ as an inert indicator) based on replacement of 30% of a reference diet (26.81 DP and 3036 kcal kg⁻¹ DE) by test ingredients (SM and SDDGS). For the growth performance, five isoprotein and isocaloric diets were formulated based on the values of digestible food to contain: 10, 30, 50 and 70% replacement of SM protein by protein SDDGS, in addition to diet without replacement. 220 juvenile of Nile tilapia (average weight of 32.89 ± 1.05 g) were randomly divided into 20 aquariums (250 L). After 90 days 10 fish per treatment received the grading-induced, for the determination of new hematology profile. The growth performance and feed utilization, as well as the hematology profile before and also after the stress were not affected by treatments. A increase (P<0.05) in villus: crypt ratio in fish fed diet containing 70% protein replacement of SM by the SDDGS. A increase (P<0.05) to hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration in fish fed diet with replacement of 30 and 70%, respectively. It was determined leukopenia, lymphopenia and neutrophilia, as well as increase in plasma glucose concentrations for all fish after stress rating. Thus, the SDDGS is an alternative protein source and can replace 70% of the SM protein without affecting the growth performance, feed utilization and animal health, and improve the integrity of the intestinal mucosa in juvenile of Nile tilapia.

Key-words: DDGS, digestibility, nutrition and health, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

A tilápia-do-Nilo está entre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo em sistema intensivo de produção, sendo que dietas formuladas para esta espécie podem conter mais de 40% de farelo de soja (Lim, 1989). Este ingrediente é uma das fontes alternativas de proteína mais utilizada com êxito em dietas para esta e outras espécies de peixes (Gatlin et al., 2007; Ayadi et al., 2011).

No entanto, a utilização de commodities em rações para peixes está diminuindo (Karapanagiotidis, 2014) devido o crescimento da produção aquícola para garantir a demanda do consumo, aumento na procura por produtos derivados da pesca, disponibilidade mundial limitada, flutuações no abastecimento do mercado e, conseqüentemente, elevações nos preços (Magalhães et al., 2015). Desse modo as investigações sobre a utilização de alimentos alternativos sustentáveis estão sendo estimuladas (Gatlin et al., 2007).

Nos últimos anos, a demanda por etanol para utilização como combustível vem aumentado em detrimento ao uso de combustíveis fósseis, o que resultou em elevado aumento na produção de etanol a partir de grãos de cereais (milho, trigo, sorgo, centeio) (Liu e Han, 2011). Os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) são o resíduo seco que permanece após a fermentação de grãos de cereais por leveduras para a produção de etanol e, sua disponibilidade como ingrediente para alimentação animal está aumentando em virtude do crescimento da indústria de biocombustíveis (Li et al., 2011; Brown et al., 2012; Liu, 2012). Com aumentos na disponibilidade, o preço do DDGS se torna mais competitivo e isso tem reforçado a sua utilização em rações (Renewable Fuels Association, 2013). Os DDGS tem preço mais baixo, tomando por base uma unidade de proteína, do que o valor pago pelo farelo de soja (Lim et al., 2011).

O DDGS tem se mostrado promissora fonte de proteína em dietas para animais terrestres e peixes (Lim e Yildirim-Aksoy, 2008). O teor de proteína bruta dos DDGS pode variar entre 26 a 33% e a gordura de 9 a 14% (Liu, 2012). A composição em nutrientes presentes nos DDGS é cerca de três a quatro vezes maior do que as do grão

de origem, devido ao processo de fermentação e, tem perfil de aminoácidos semelhante ao contido nos grãos integrais (Dong et al., 1987; Stein, 2006; Brown et al, 2012).

Devido ao menor teor de proteína, o conteúdo de aminoácidos essenciais em DDGS é mais baixo do que o encontrado no farelo de soja. As deficiências em vários aminoácidos essenciais pode limitar sua utilização como principal fonte proteica em dietas para tilápia-do-Nilo (Welker et al., 2014). O aminoácido mais limitante em DDGS quando comparadas ao farelo de soja é a lisina (Dong et al., 1987; NRC, 1993; Hancock et al., 1995; Feedstuffs, 2008). Em estudo realizado com tilápia do Nilo, Lim et al. (2007) constataram que a inclusão de 40% de DDGS do milho em substituição ao farelo de soja e milho, pode ser feita sem prejuízo no desempenho produtivo, quando suplementadas as rações com lisina (0,4%).

No Brasil, a principal fonte para produção de etanol tem sido a cana de açúcar. No entanto, com a crescente demanda de combustível, as destilarias têm incluído os cereais neste processo, elevando a disponibilidade dos DDGS. Contudo não há informações acerca do valor nutritivo e o potencial de utilização dos DDGS produzidos no Brasil para tilápia-do-Nilo. Portanto, este estudo foi realizado para avaliar o valor nutritivo e a influência da substituição da proteína do farelo de soja pela do DDGS do sorgo (DDGSS) em dietas para tilápia-do-Nilo, sobre a digestibilidade, desempenho produtivo, eficiência de utilização do alimento, morfometria intestinal e hematologia antes e após estresse por classificação.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri. Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 218/2012 CEUA).

2.1 Ensaio de digestibilidade

Para o experimento de digestibilidade, foi formulada dieta referência a base de milho e farelo de soja, para conter 26,81% de proteína digestível, 3036 kcal kg⁻¹ de energia digestível e 0,1% de óxido de cromo III (Cr₂O₃) como marcador inerte segundo metodologia proposta por Bremer Neto et al., (2003) (Tabela 1). Outras duas dietas foram obtidas por meio da mistura de 70% da dieta referência e 30% do ingrediente teste; farelo de soja e do grão seco de destilaria com solúveis do sorgo (DDGSS). A composição química centesimal, energia bruta, perfil aminoacídico, cálcio, fósforo e % de óxido de cromo recuperado, assim como os respectivos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas utilizadas no ensaio de digestibilidade estão contidos na Tabela 2.

As dietas foram confeccionadas a partir da moagem dos ingredientes para obtenção do diâmetro geométrico médio menor que 0,7 mm, seguido por pesagem, homogeneização e adição de 23% de água (70 °C), procedendo-se extrusão em equipamento de rosca simples (Extrutech[®], Ribeirão Preto, Brasil). As rações foram secas em estufa de ventilação forçada (55°C por 24 h) e em seguida armazenadas em câmara fria (4°C) até a utilização.

O estudo foi realizado em sistema de Guelph modificado segundo metodologia proposta por Pezzato et al. (2001). Para o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água foi utilizada sonda multi parâmetros YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Os valores determinados para pH ($6,71 \pm 0,06$), oxigênio dissolvido ($6,15 \pm 0,32$ mg L⁻¹), sólidos totais dissolvidos ($0,17 \pm 0,03$ g L⁻¹), amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000$ ppm – kit Labcon[®]) e temperatura ($26,22 \pm 1,32$ °C) se mantiveram nas condições de conforto para a espécie estudada (Boyd, 1996).

Os peixes, 60 juvenis de tilápia-do-Nilo com peso médio de 85 g foram alojados nos aquários de alimentação dotados em seu interior de gaiola confeccionada em tela plástica, totalizando dez peixes por aquário. Em seguida foram adaptados ao sistema de digestibilidade por 12 dias, recebendo dieta referência. Logo após este período, os peixes foram novamente adaptados recebendo as dietas denominadas referência e testes

(farelo de soja e DDGSS), em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h: 30 min, pelo período de sete dias. Durante o período experimental os peixes foram alimentados com maior frequência no período vespertino. Ao final de cada dia as gaiolas foram transferidas para os aquários de coleta de fezes, onde permaneceram até a manhã do dia subsequente, em que foi realizada a coleta do material fecal. Após a coleta, as fezes foram desidratadas em estufa com ventilação forçada de ar (55,0 °C/48 horas), moídas e armazenadas a - 20,0 °C para posteriores análises.

Para a determinação dos CDA da proteína, aminoácidos, matéria seca, energia e fósforo nas rações foi empregada a seguinte fórmula:

$$CDA_{dieta} = [1 - (Cr_2O_3 \text{ na dieta} \times \text{nutriente ou energia das fezes} / Cr_2O_3 \text{ nas fezes} \times \text{nutriente ou energia das dietas})] \times 100$$

Para obtenção dos CDA do farelo de soja assim como do DDGSS foi aplicada a seguinte fórmula apresentada por Bureau et al. (1999):

$$CDA_{ingrediente} = CDA_{dieta \text{ teste}} + [(CDA_{dieta \text{ teste}} - CDA_{dieta \text{ referência}}) \times (0,7 \times D_{ref.} / 0,3 \times D_{ingr.})]$$

Em que $D_{ref.}$ é a % do nutriente (ou kcal kg⁻¹) da dieta referência (base na matéria seca) e $D_{ingr.}$ é a % do nutriente (ou kcal kg⁻¹) da dieta teste (base na matéria seca).

2.2 Ensaio de desempenho produtivo

A partir dos valores digestíveis obtidos para o farelo de soja e DDGSS por meio do ensaio de digestibilidade, cinco dietas isoproteicas (26,81% de proteína digestível) e isoenergéticas (3036 kcal kg⁻¹ de energia digestível) foram formuladas para conter os níveis de substituição da proteína do farelo de soja pela do DDGSS de 10, 30, 50, 70% e

uma dieta sem substituição (Tabela 3). Os valores de exigências nutricionais e composição dos demais ingredientes foram descritos por Furuya et al. (2010). Para a confecção das dietas os ingredientes foram submetidos a moagem para obtenção do diâmetro geométrico médio menor que 0,7 mm, em seguida foram pesados, homogeneizados e adicionados 23% de água (70 °C). A extrusão das rações foi realizada em equipamento de rosca simples (Extrutec[®], Ribeirão Preto, Brasil), secas em estufa de ventilação forçada (55°C por 24 h) e armazenadas em câmara fria (4°C) até a utilização.

O estudo de desempenho foi realizado em sistema composto por 20 aquários de formato circular (250 L), com recirculação de água, dotado de filtro físico e biológico, aquecimento controlado por termostato digital e aeração. Semanalmente foi realizado monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água utilizando sonda multi probe YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Os valores aferidos para pH ($6,67 \pm 0,08$), oxigênio dissolvido ($6,13 \pm 0,22 \text{ mg L}^{-1}$), sólidos totais dissolvidos ($0,19 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$), amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000 \text{ ppm}$ – kit Labcon[®]) e temperatura ($26,49 \pm 1,28 \text{ °C}$) se encontraram dentro das condições de conforto para a espécie (Boyd, 1996).

Foram recebidos alevinos de tilápia-do-Nilo, provenientes da Piscicultura Trifish (Botucatu, São Paulo) e, inicialmente alojados em dois tanques circulares onde permaneceram por 14 dias (1000 L cada) recebendo dieta comercial com 32% de proteína bruta três vezes ao dia, para adaptação e posterior distribuição nos aquários experimentais. Após período de adaptação, 220 juvenis com peso médio de $32,89 \pm 1,05 \text{ g}$ foram distribuídos aleatoriamente nos aquários experimentais (11 peixes por aquário). O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. O arraçoamento foi realizado até saciedade aparente quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h: 30 min.

2.3 Variáveis de crescimento, utilização do alimento e gordura visceral

Com o término do estudo de desempenho produtivo e das análises químico-bromatológicas foram calculados os seguintes parâmetros:

Ganho de peso (g):

$$GP = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)};$$

Consumo de ração (g):

$$CR = \text{quantidade de alimento ingerido na matéria seca (g)};$$

Conversão alimentar:

$$CA = \text{alimento ingerido na matéria seca (g)} / GP \text{ (g)};$$

Taxa de eficiência proteica:

$$TEP = [GP \text{ (g)} / \text{consumo de proteína bruta na matéria seca (g)}]$$

Retenção de Nitrogênio (%):

$$RN = [((\text{peso final} \times \text{proteína na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína na carcaça inicial (\%)})) / 6,25 \times 1000] / (\text{peso médio} \times \text{número de dias});$$

Retenção de Energia (%):

$$RE = [((\text{peso final} \times \text{energia na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial} \times \text{energia na carcaça inicial (\%)})) \times 1000] / (\text{peso médio} \times \text{número de dias});$$

Gordura visceral (%):

$$GV = (\text{peso da gordura (g)} / \text{peso final (g)}) \times 100;$$

Sobrevivência (%):

$$SOB = (\text{número de animais final} / \text{número de peixes inicial}) \times 100;$$

2.4 Coleta das amostras e dados

Ao final do período experimental de 12 semanas, os peixes foram mantidos em jejum por 12 h. Para a determinação do perfil hematológico anterior ao estresse, foram retirados aleatoriamente, oito peixes por tratamento (dois peixes por aquário) e, em

seguida, foram capturados mais dez peixes por tratamento provenientes de nova amostragem para serem desafiados pelo estresse por classificação de tamanho.

Para determinação do peso final e posterior cálculo dos índices zootécnicos todos os peixes foram anestesiados com benzocaína (67 mg L^{-1}). Para coleta e pesagem da gordura visceral, foram abatidos 12 peixes por tratamento sendo que de seis animais foram coletados também a porção proximal do intestino (três centímetros a partir do piloro) de seis peixes por tratamento, para posterior análise de morfometria. Para isso, as amostras foram presas em uma base de cartolina retangular e fixadas individualmente em solução de formol (10%) por 24 h e a conservação foi feita em álcool 70° até o momento da realização do procedimento histológico. Para análise de composição centesimal da carcaça foram amostrados cinco peixes por tratamento.

2.5 Análises das amostras

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu e Laboratório de Química do IBB-UNESP/Botucatu segundo as metodologias descritas pela AOAC (2000). Para determinação do perfil aminoacídico as amostras foram enviadas para o laboratório de análise bromatológicas LABTEC e realizadas seguindo os protocolos determinados pela AOAC (2000).

No ensaio de digestibilidade foram determinados no FS, DDGSS, nas rações e nas fezes os teores de matéria seca, proteína bruta, perfil de aminoácidos, matéria mineral, fibra bruta, extrato etéreo e energia bem como as concentrações de cálcio, fósforo e Cr_2O_3 . Para o experimento de desempenho produtivo foram realizadas análises da composição centesimal do peixe inteiro no início e ao término do período experimental bem como análises das dietas quanto aos teores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo, energia, fibra bruta, cálcio e fósforo.

Para a análise de morfometria intestinal, foi realizado procedimento histológico para obtenção de cortes seriados em parafina, com $5 \mu\text{m}$ de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE). As análises foram realizadas em microscopia de luz,

utilizando sistema analisador de imagem Leica Qwin 3.0 (Copyright[©] Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK). Foram tomadas às medidas de altura de vilosidades, profundidade das criptas de 30 vilosidades por lâmina. Em seguida para obtenção da relação vilo:cripta (V:C) foi empregada a seguinte fórmula:

$$V:C = \text{Altura da vilosidade } (\mu\text{m}) / \text{Profundidade da cripta } (\mu\text{m})$$

2.6 Estresse por classificação

Para a realização do ensaio de estresse por classificação de tamanho, foram utilizados 10 peixes por tratamento, alojados em cinco aquários (250 L) dotados em seu interior de gaiola confeccionada em tela plástica. Após período de 24 h, as gaiolas foram suspensas durante 15 minutos, porém permanecendo com os animais ainda na água, para simulação de adensamento decorrente da execução deste manejo no campo. Logo após a simulação de adensamento as gaiolas foram retiradas dos aquários e os peixes foram mantidos sobre uma mesa, separados por tamanho e após um minuto retornaram aos aquários. Em seguida foram retirados aleatoriamente oito peixes de cada tratamento para coleta de amostras de sangue para determinação do perfil hematológico.

2.7 Hematologia

Para a coleta de sangue, os peixes foram anestesiados com benzocaína (67 mg L⁻¹) e o sangue foi retirado via punção caudal utilizando seringas de 1 mL banhadas com anticoagulante (EDTA 3,0%, Ttec, Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ).

Para o número de eritrócitos foi aplicado o método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Toluidina Merck[®] a 0,01% em pipeta automática, na proporção de 1:200. A porcentagem de hematócrito (HTC) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Goldenfarb et al. (1971). A taxa

de hemoglobina (Hb) foi determinada por meio de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG), segundo metodologia descrita por Collier (1944).

A partir dos resultados obtidos nessas análises foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio $[VCM = (HTC \times 10)/\text{eritrócitos}]$ e concentração de hemoglobina corpuscular média $[CHCM = (\text{Taxa de hemoglobina} \times HTC) \times 100]$ (Wintrobe, 1934).

Para a diferenciação e contagem total de leucócitos foram realizadas extensões em lâminas, coradas com May-Grünwald Giensa, no número de duas lâminas por peixe, de acordo com metodologia proposta por Ranzani-Paiva et al. (2013).

A determinação da proteína plasmática total (PPT) foi realizada com auxílio de refratômetro manual de Goldberg, por meio da quebra do capilar de microhematócrito acima da camada de leucócitos, após a leitura do HTC. Os valores de ALB foram determinados utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG), para determinação colorimétrica. Com a determinação da ALB e da PPT foi possível realizar os cálculos dos valores de globulina (GLOB) no soro e, posteriormente, a relação albumina:globulina (A:G), segundo Jain (1986). Para determinação da concentração de glicose no plasma foi utilizado kit (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG).

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos ($P < 0,05$) foi aplicado teste de comparação de médias de Tukey. Para os dados hematológicos foi realizado teste t, para comparação entre os momentos (antes e após estresse por classificação).

3. Resultados

Os valores obtidos para composição centesimal e respectivos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, nutrientes e energia contidos no DDGSS e farelo de soja estão apresentados na Tabela 4.

As médias para as variáveis de desempenho produtivo, utilização do alimento e sobrevivência após 90 dias de alimentação com dietas contendo níveis de substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do DDGSS estão presentes na Tabela 5. Não houve influência ($P>0,05$) dos níveis de substituição sobre essas variáveis. A composição corporal dos peixes também não foi influenciada ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 6).

Para as variáveis de morfometria intestinal (Tabela 7), altura de vilo e profundidade de cripta não houve diferenças ($P>0,05$) entre tratamentos. No entanto, houve influência ($P<0,05$) na substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do DDGSS sobre a relação vilo:cripta (V:C). O nível de substituição de 70% determinou maior V:C quando comparado aos tratamentos com 10% e sem a substituição da proteína do FS pela proteína do DDGSS.

Não houve influência significativa dos tratamentos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela 8), assim como para os valores obtidos para percentual de linfócitos, neutrófilos, monócitos e, número de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos (Tabela 9) nos peixes após serem alimentados por 90 dias com as dietas experimentais. Na comparação entre os peixes nos momentos antes e após estresse por classificação houve diferenças ($P<0,05$) para o CHCM nos peixes que receberam dieta com 30% de substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do DDGSS e nos valores de Hb para os que receberam dieta contendo 70% de substituição. Houve, ainda, aumento ($P<0,05$) nos valores de glicose (GLU) nos peixes de todos os tratamentos após o estresse por classificação (Tabela 8).

Para os valores de percentual de linfócitos e neutrófilos, assim como para o número de leucócitos e linfócitos, houve influência ($P<0,05$) quando comparados os momentos antes e após estresse por classificação para todos os tratamentos (Tabela 9).

4. Discussão

O DDGS se apresenta como alimento proteico disponível e sua incorporação em dietas para animais terrestres e aquáticos têm sido realizada com sucesso (Welker et al., 2014). No entanto, existem restrições que devem ser levadas em consideração quanto à inclusão de níveis elevados de DDGS em dietas para tilápia do Nilo, como demonstrado no presente estudo de digestibilidade que serviu de base para formulação das dietas utilizadas no estudo de crescimento. O DDGSS apresenta elevado teor em fibra e, apesar de apresentar bom conteúdo proteico, mostrou-se deficiente em aminoácidos essenciais, principalmente lisina, treonina e triptofano, além de CDA inferior para esses nutrientes quando comparado ao farelo de soja. Desse modo, a adição de outras fontes proteicas com perfil complementar em aminoácidos essenciais, assim como a suplementação com aminoácidos cristalinos nas rações, podem ser utilizadas com eficiência para suprir essas deficiências (Welker et al., 2014).

O teor proteico encontrado no presente estudo para o DDGSS se assemelha ao verificado por Lodge et al. (1997) de 31,4%. Entretanto, esses valores são superiores aos apresentados por Hancock (1995), que encontrou em DDGS de duas variedades de sorgo teores de proteína bruta de 26,6 e 25,6%. O conteúdo em lisina do DDGSS no presente estudo também foi superior ao relatado por estes autores (0,60 e 0,55%, respectivamente). As variações que ocorrem na composição dos DDGS podem ser atribuídas a diferentes fatores, tais como tempo e eficiência da fermentação, bem como pelo processo de secagem (Lim e Yildirim-Aksoy, 2008).

A incorporação de 30% de DDGS, obtidos a partir do milho e trigo, em dietas sem a suplementação com aminoácidos cristalinos foi realizada com sucesso para diferentes espécies de peixes como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tilápia híbrida, tilápia-do-Nilo e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), no entanto foi observado que em níveis de inclusão superiores a este as dietas apresentam deficiência em aminoácidos essenciais, necessitando as dietas de suplementação (Cheng e Hardy, 2004; Coyle et al., 2004; Lim et al., 2009; Li et al., 2011; Li et al., 2012).

Pesquisa realizada por Welker et al. (2014) mostrou deficiência em metionina de 30% com relação às exigências para tilápia-do-Nilo em dieta contendo 24,2% de DDGSS, quando não suplementada com esse aminoácido. Desse modo, para obtenção

de dietas com mesma base proteica, que atendam todas as exigências nutricionais estabelecidas para esta espécie, considerando os valores digestíveis dos alimentos, a inclusão de níveis elevados de DDGSS realizada neste estudo implicou na necessidade de suplementação das dietas com aminoácidos essenciais. O correto balanceamento das dietas do presente estudo, portanto, pode ter sido a causa da ausência de efeitos significativos nas variáveis de desempenho analisadas.

Assim, como no desempenho produtivo, a composição corporal dos peixes não foi influenciada pelos níveis de substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do DDGSS. Estudos realizados com a mesma espécie encontraram redução significativa no teor de proteína da carcaça dos peixes alimentados com dietas contendo de 36,11 a 40% de DDGS do milho sem a suplementação de lisina, sugerindo que a deficiência deste e de outros aminoácidos essenciais possa ter influenciado na síntese proteica (Lim et al., 2007; Salama et al., 2011). No entanto, quando realizada suplementação com lisina, a inclusão de 40% do DDGS do milho pôde ser realizada em dieta sem influências sobre os parâmetros de composição corporal da tilápia-do-Nilo quando comparada a dieta controle (Lim et al., 2007).

A mucosa intestinal foi influenciada pelos níveis de substituição da proteína do farelo de soja pela do DDGSS. O desenvolvimento da mucosa intestinal é explicado por dois eventos citológicos associados, o primeiro consiste em renovação celular, resultante das divisões mitóticas realizadas por células totipotentes que se localizam nas criptas e, o segundo, se caracteriza pelas perdas celulares que ocorrem naturalmente no ápice dos vilos (Uni et al., 1998; Maiorka et al., 2002). Para que haja equilíbrio entre esses dois processos mantendo o tamanho dos vilos, é preciso que haja renovação celular constante (proliferação – migração – extrusão). No caso de desbalanço neste equilíbrio, provocado por algum agente estressor, haverá modificações na altura dos vilos (Maiorka et al., 2002).

Dessa forma, vários fatores podem agir como agentes estressantes à mucosa intestinal, dentre eles a presença de fatores antinutricionais comumente presentes nos alimentos de origem vegetal tais como inibidores de tripsina, lectinas e oxalatos (Krause e Mahan, 2005; Zang et al., 2006), bem como a presença de bactérias patogênicas intestinais que se aderem, por meio de lectinas específicas de manose, na superfície do

epitélio intestinal, consequentemente realizando colonização e infecção (Baumler et al., 1997).

Os DDGS não possuem os fatores antinutricionais comumente encontrados na maioria dos alimentos proteicos de origem vegetal (Hertrampf e Piedad-Pascual., 2000; Lim et al., 2011; Brown et al., 2012; Overland et al., 2013), além de possuir em sua composição a levedura, que pode representar 3,9% de sua biomassa total (Ingledew, 1999) e, dentre seus componentes estão os mananoligossacarídeos (MOS) e os nucleotídeos.

Os mananoligossacarídeos possuem em sua composição aproximadamente 40% de α -D-mananas, que exercem função de ligação nos receptores lecitinas específicos de manose das bactérias enteropatogênicas, servindo como atrativos e prevenindo a adesão às glicoproteínas da superfície do vilo, reduzindo o risco de colonização e disseminação dos patógenos bacterianos (Firon et al., 1983), enquanto os nucleotídeos podem modificar o tipo e crescimento da microflora intestinal, beneficiando as bifidobactérias que atuam reduzindo o pH intestinal por meio da capacidade de hidrolisar açúcar para ácido lático, reduzindo a proliferação de bactérias patogênicas (Uauy et al., 1994). Outros estudos sugerem que o MOS e os nucleotídeos podem exercer efeitos melhoradores da saúde intestinal (Devresse, 2001; Burrels et al., 2001; Yilmaz et al., 2007; Salze et al., 2008; Refstie et al., 2010). Desse modo, esses fatores podem ter contribuído para o aumento na relação vilo: cripta, indicando melhor integridade da mucosa intestinal nos peixes que receberam dietas contendo DDGSS.

As leveduras são ricas em vitaminas do complexo B e β -glucanos, que podem exercer função imunomodulatória e têm sido associadas a melhorias no que diz respeito à resistência a doenças (Sakai, 1999). Os β -glucanos podem ser encontrados em concentrações de até 5,7 g kg⁻¹ nos DDGS obtidos do milho, contudo, podem existir variações no teor de β -glucanos dependendo da fonte utilizada em que se obteve este alimento. Por exemplo, em DDGS provenientes do trigo as concentrações podem ser três vezes maiores do que em DDGS do milho (Lim et al., 2007; Lim et al., 2011). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como para o leucograma ao final dos 90 dias de alimentação e, após o estresse por classificação. Os parâmetros hematológicos observados no presente estudo mantiveram-se dentro do intervalo de

referência estabelecido para a espécie, assim como para os valores determinados em condições experimentais semelhantes (Ferrari et al., 2004; Hrubec e Smith, 2010; Tachibana et al., 2010).

As respostas dos DDGS quanto a possíveis efeitos como melhoradores da resposta imune tem se mostrado inconsistentes. Estudo realizado com bagre do canal indicou que os peixes alimentados com dietas contendo de 20 a 40% de DDGS de milho apresentaram maior resistência a infecção contra a bactéria *Edwardsiella ictaluri* (Lim et al., 2009). No entanto, outros autores não observaram efeitos significativos sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis semelhantes de DDGS provenientes do milho e trigo (Lim et al., 2007; Shelby et al., 2008).

Alguns fatores podem influenciar as propriedades imunoestimulantes dos ingredientes e aditivos em peixes, como a idade, a espécie, o nível de inclusão, frequência alimentar e tempo de administração (Welker et al., 2012). Dessa forma, houve melhora significativa somente para Hb e CHCM em peixes alimentados com DDGS após o estresse. No entanto, as respostas para essas variáveis foram encontradas em tratamentos com diferentes níveis de substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do DDGS.

Várias respostas fisiológicas podem configurar ajustes para que haja restauração da homeostase. A elevação dos níveis de glicose plasmáticos encontrados no presente estudo, após o estímulo por classificação de tamanho, pode ser considerada uma delas. O aumento da concentração de glicose no plasma por curtos períodos de tempo é exigido para compensar a maior demanda por energia em situações de estresse (Barton, 2000). Essas alterações foram relatadas para tilápia-do-Nilo e podem ser observadas em outras espécies de peixes tropicais, tais como a matrinxã (*Brycon cephalus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidas a diferentes estímulos estressores (Carneiro e Urbinati, 2002; Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004; Falcon et al., 2007; Silva et al., 2012; Barros et al., 2014).

Além das alterações nos níveis plasmáticos de glicose, o sistema imune pode sofrer efeitos negativos sobre situações de estresse. Nesse sentido foi observado no presente estudo linfopenia, leucopenia e neutrofilia nos peixes para todos os tratamentos após o estresse por classificação. A redução no número de linfócitos circulantes pode

representar importante relação entre a resposta ao estresse e doenças devido a níveis elevados de cortisol plasmático (Pickering e Pottinger, 1985). Essas alterações fisiológicas são frequentemente reportadas em muitas espécies de peixes quando submetidos a algum agente estressor e podem conduzir os animais a menor resistência contra agentes patogênicos (Englesma et al., 2003; Urbinati e Carneiro, 2004; Barros et al., 2014).

Este estudo verificou o potencial de utilização do DDGSS em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo como alimento alternativo ao FS, promovendo mesma resposta de crescimento e utilização do alimento assim como a higidez, além de melhorar a integridade da mucosa intestinal dos peixes. Os resultados obtidos permitem ainda afirmar a potencialidade de inclusão deste alimento em dietas pela indústria aquícola. Mais estudos devem ser conduzidos em condições de cultivo intensivo no intuito de promover maior desafio para os peixes, buscando elucidar melhor os efeitos do DDGSS sobre a saúde da mucosa intestinal correlacionada aos parâmetros de desempenho produtivo e, possíveis efeitos sobre a saúde dos animais.

Dessa forma, os resultados do presente estudo possibilitam concluir que a substituição de até 70% da proteína do farelo de soja pela do DDGSS pode ser realizada quando atendidas as exigências em aminoácidos, sem prejuízos no desempenho produtivo e na higidez, além de promover melhor saúde da mucosa intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.

5. Referências

- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.
- Ayadi, F.Y., Muthukumarappan, K., Rosentrater, K.A., Brown, M.L., 2011. Twin screw extrusion processing of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds using various levels of corn-based distillers dried grains with solubles (DDGS). *Cereal Chemistry*, 88, 363–374.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi, R.O., Pezzato, L.E., Fernandes Jr., Guimarães, I.G., Fernandes Jr., A.; Padovani, C.R., Sartori, M.M.P., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun.*, 39, 188-195.

- Barton, B.A., 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North Am. J. Aquacult.*, 62, 12-18.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1997. Fimbrial adhesions of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 412, 149–158.
- Boyd C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., Cantelmo, O.A., 2003. Reduction in chromium (III) oxide level as an external marker. *R. Bras. Zootec.*, 32, 249-255.
- Brown, M.L., Schaeffer, T.W., Rosentrater, K.A., Barnes, M.E., Muthukumarappan, K., 2012. Feeding DDGS to Finfish. In: *Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization* (Liu, K., Rosentrater, A.), pp. 341 - 390. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout. *Aquaculture*, 180, 345-358.
- Burrels, C. Williams, P.D., Southgate, P.J., Wadsworth, S. L., 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 199, 171-184.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., 2004. Nutritional value of diets containing distiller's dried grain with solubles for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Aquac.*, 15, 101-113.
- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.*, 50, 550-552.
- Coyle, S.D., Mengel, G.J., Tidwell, J.H., Webster, C.D., 2004. Evaluation of growth, feed utilization and economics of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, fed diets containing different protein sources in combination with distillers dried grains with solubles. *Aquac. Res.*, 35, 1-6.
- Devresse, B., 2001. Nucleotides - a key nutrient for shrimp immune system. *Feed Mix*, 8, 20-22.
- Dong, F.M., Rasco, B.A., Gazzaz, S.S., 1987. A protein quality assessment of wheat and corn distillers dried grains with solubles. *Cereal Chemistry*, 64, 327-332.
- Englesma, M., Hougee, S., Nap, D., Hofenk, M., Rombout, J.H.W.M., Muiswinkel, W.B., 2003. Multiple acute temperature stress effects leukocyte populations and antibody response in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 15, 397-410.

- Falcon, D.R., Barros, M.B., Pezzato, L.E., Sampaio, F.G., Hisano, H., 2007. Physiological Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fed Vitamin C- and Lipid-Supplemented Diets and Submitted to Low-Temperature Stress. J. World Aquac. Soc., 38, 287-295.
- Feedstuffs, 2008. Feedstuffs ingredient analysis table, 79, n38.
- Ferrari, J.E.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Gonçalves, G.S., Hisano, H., Kleeman, G.K., 2004. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Acta Sci., 26, 429-436.
- Firon, N.; Ofek, I.; Sharon, N., 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. Carbohydr. Res., 120, 235–249.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.B., Feiden, A., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquac. Res. 38, 551–579.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Am. J. Clin. Path., 56, 35-39.
- Gomes, L.C., Araujo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. Pesqui. Agropecu. Bras., 38, 283-290.
- Hancock, J.D., 1995. The value of distillers co-products in swine diets. Proc. Distillers Feed Res. Council, 50, 13-20.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2000, 138p.
- Hrubec, T.C., Smith, S., 2010. Hematology of fishes. In: Schalm's veterinary hematology (Weiss, D.J., Wardrop, K.J.), pp. 994 – 1003. Wiley-Blackwell, USA.
- Ingledeu W. M. 1999. Yeast – could you base business on this bug? Pages 27–47 in T. P. Lyons and K. A. Jacques, editors. Under the microscope – focal points for the new millennium – biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

- Jain, N.C., 1986. Schalm's veterinary hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1221p.
- Karapanagiotidis, I.T., 2014. The Re-Authorization of Non-Ruminant Processed Animal Proteins in European Aqua feeds. Aqua feeds. Fish. Aquac. J. 5, 4.
- Krause, M.V., Mahan, L.K., 2005. Estado nutricional do indivíduo. In: Alimentos, nutrição e dietoterapia (Krause, M.V., Mahan, L.K.), pp. 192-236. Roca, São Paulo.
- Li, E., Lim, C., Kelsius, P., Cai, C., 2012. Enhancement effects of dietary wheat distiller's dried grains with soluble on growth, immunity, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. World Aquac. Soc., 43, 814–827.
- Li, M.H., Oberle, D.F., Lucas, P.M., 2011. Evaluation of corn distillers dried grains with solubles and brewers yeast in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Aquac. Res. 42, 1424–1430.
- Lim, C. 1989. Practical feeding – tilapias. Pages 163–183 in: Nutrition and Feeding of Fish (Lovell, R.T.) Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Lim, C., Garcia, J.C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., Evans, J.J. 2007. Growth response and resistance to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing distiller's dried grains with solubles. J. World Aquac. Soc., 38, 231-237.
- Lim, C., Li, E., Klesius, P.H., 2011. Distiller's dried grains with solubles as an alternative protein source in diets of tilapia. Rev. Aquacult., 3, 172-178.
- Lim, C., Yildirim-aksoy, M., 2008. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. Pages 67-82 in Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, October 12–14, 2008, Cairo, Egypt.
- Lim, C., Yildirim-aksoy, M., Klesius, P.H., 2009. Growth response and resistance to *Edwardsiella ictaluri* of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing distiller's dried grains with solubles. J. World Aquac. Soc., 40, 182-193.
- Liu, K., 2012. Chemical Composition of DDGS, Distillers Grains. In: Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization (Liu, K., Rosentrater, A.), pp. 143–178. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Liu, K.S., Han, J.C., 2011. Changes in mineral concentrations and phosphorus profile during dry-grind process of corn into ethanol. Bioresource Technology, 102, 3110–3118.
- Lodge, S.L., Stock, R.A., Klopfenstein, T.J., Shain, D.H., Herold, D.W., 1997. Evaluation of corn and sorghum distillers byproducts. J. Anim. Sci., 75, 37-43.

- Magalhães, R., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Aires, T., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2015. Corn distiller's dried grains with solubles: Apparent digestibility and digestive enzymes activities in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 443, 90-97.
- Maiorka, A., Boleli, I.C., Macari, M., 2002. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte* (Macari, M., Furlan, R.L., Gonzales, E.), pp.113-123. Funep., Jaboticabal.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, D.C., USA.
- Øverland, M., M., Krogdahl, A., Shurson, G., Skrede, A., Denstadli, V., 2013. Evaluation of distiller's dried grains with solubles (DDGS) and high protein distiller's dried grains (HPDDG) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 416–417, 201–208.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Quintero Pinto, L.G., Furuya, W.M., Pezzato, A.C. et al. 2001. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 31, 1595-1604
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1985. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.*, 27, 611-619.
- Ranzini-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 140p.
- Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R.R., Elvebø, O., 2010. Effects of dietary yeasty cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*, 305, 109-116.
- Renewable Fuels Association, 2013. 2013 Ethanol Industry Outlook. Renewable Fuels Association, Washington, DC, USA.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63–92.
- Salama, F.A., Mahmoud, S.H., 2011. Tonsy, H.D., Hassouna, M.M.E. Effects of radish root extract on improving the utilization of corn distillers grains with solubles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry diets. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 6, 938-946.
- Salze, G., Mclean, E., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*, 274, 148-152.

- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H., 2008. Effect of distiller's dried grains with solubles-incorporated diets on growth, immune function and disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquac. Res.*, 39, 1351-1353.
- Silva, R.D., Rocha, L.O., Fortes, B.D.A., Vieira, D., Fioravanti, M.C.S., 2012. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesqui. Vet. Bras.*, 32, 99-107.
- Stein, H., 2006. DDGS: energy and nutrient content and digestibility. *Midwest Swine Nutrition Conference*, pp. 58–65.
- Tachibana, L., Gonçalves, G.S., Guimarães, I.G., Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., 2010. Substituição do milho pelo tritcale na alimentação de tilápias-do-nilo. *Rev. Bras. Zootec.*, 39, 241-246.
- Uauy, R., 1994. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J. Nutr.*, 124, 157S-159.
- Uni, Z., Platin, R., Sklan, D. 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J. Comp. Physiol.*, 168, 241-247.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Landines, M.A., 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229, 389-400.
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C.F., 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva* (Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N.). TecArt, São Paulo. PP. 171-193.
- Welker, T.L., Lim, C.E, Aksoy, M., Klesius, P.H. 2012. Use of diet crossover to determine the effects of β -glucan supplementation on immunity and growth of Nile tilapia. *J. World Aquac. Soc.*, 43, 335–348.
- Welker, T.L., Lim, C., Klesius, P.H., Liu, K., 2014. Evaluation of Distiller's Dried Grains with Solubles from Different Grain Sources as Dietary Protein for Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* (♀)×*Oreochromis aureus* (♂). *J. World Aquac. Soc.*, 45, 625-637.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, 51, 32-49.
- Yilmaz, E., Genc, M.A., Genc, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Isr. J. Aquacult.*, 59, 182-188.
- Zang, J., Li, D., Piao X., Tang, S., 2006. Effects of soybean agglutinin on body composition and organ weights in rats. *Arch Anim Nutr.*, 3, 245-53.

Table 1. Formulation (%) and calculated composition of reference diet.

<i>Ingredients</i>	<i>(%)</i>
Soybean meal	48.10
Corn gluten - 60	4.50
Wheat middling	10.00
Corn	33.96
Soybean oil	0.19
L-lysine	0.22
DL-methionine	0.31
L-threonine	0.33
Dicalcium phosphate	1.63
Antioxidant (BHT) ¹	0.02
Salt	0.10
Vitamin and mineral premix ²	0.50
Vitamin C ³	0.04
Chromium oxide-III	0.10
<i>Calculated composition</i>	
<i>(wet weight basis)</i>	
Digestible energy (kcal kg ⁻¹)	3036
Digestible protein	26.81
Crude fiber	4.50
Calcium	0.57
Available phosphorus	0.51
Lysine	1.53
Methionine	0.58
Methionine +Cystine	0.92
Threonine	1.18
Tryptophan	0.30

¹Butylated hydroxytoluene; ²Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate= 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid= 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ³Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland.

Table 2. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %)¹ of nutrients and energy of the experimental diets (% dry matter)².

	Diets		
	Ref. ³	70%-Ref. + 30%-DDGSS ⁴	70%-Ref. + 30%-SB ⁵
<i>Proximate composition</i>			
Dry matter	96.42 (77.92)	96.62 (65.74)	96.26 (73.71)
Crude protein	30.91 (94.23)	33.03 (86.30)	37.06 (94.36)
Crude fat	1.30 (75.81)	2.43 (84.35)	1.77 (82.66)
Crude fiber	3.63	5.58	4.56
Ash	4.93 (43.92)	4.31 (45.39)	5.69 (44.17)
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	4478 (80.36)	4773 (67.63)	4567 (76.93)
<i>Amino acids</i>			
Alanine	1.45 (93.77)	1.91 (85.81)	1.58 (94.98)
Arginine	1.78 (98.51)	1.58 (94.60)	2.19 (98.75)
Aspartic acid	2.62 (97.67)	2.42 (94.01)	3.27 (98.32)
Glycine	1.16 (92.67)	1.12 (85.06)	1.40 (93.47)
Isoleucine	1.28 (95.83)	1.32 (89.05)	1.52 (96.39)
Leucine	2.59 (96.20)	3.21 (87.94)	2.85 (96.58)
Glutamic acid	5.39 (98.32)	5.75 (94.12)	6.15 (98.51)
Lysine	1.87 (97.01)	1.53 (92.94)	2.24 (97.41)
Cystine	0.26 (99.97)	0.27 (99.64)	0.31 (99.21)
Methionine	0.50 (99.41)	0.48 (95.31)	0.45 (98.64)
Phenylalanine	1.47 (96.75)	1.55 (90.41)	1.70 (97.31)
Tyrosine	0.80 (99.02)	0.87 (89.30)	0.97 (97.17)
Threonine	1.34 (95.23)	1.23 (88.80)	1.41 (95.24)
Tryptophan	0.11 (81.34)	0.13 (41.07)	0.14 (85.00)
Proline	1.75 (96.20)	2.06 (90.97)	1.90 (96.15)
Valine	1.32 (94.55)	1.42 (85.83)	1.54 (95.26)
Histidine	0.76 (97.19)	0.76 (91.65)	0.88 (97.58)
Serine	1.42 (96.07)	1.40 (92.54)	1.63 (96.63)
<i>Calcium and Phosphorus</i>			
Total calcium	0.49	0.35	0.42
Total phosphorus	0.52 (44.54)	0.43 (50.55)	0.50 (27.28)
<i>Marker⁶</i>			
Cr ₂ O ₃	0.090	0.096	0.102

¹ADCS = apparent digestibility coefficients; ²Values are means (n=3); ³Ref. = Reference diet; ⁴SDDGS = Sorghum distillers dry grains with solubles; ⁵SB = Soybean meal; ⁶Marker Cr₂O₃ = Chromium oxide-III percentage of recovered in diets.

Table 3. Formulation (%), calculated and analyzed composition of experimental diets.

Ingredients	Levels of replacement (%) ¹				
	0	10	30	50	70
Soybean meal	28.60	25.60	20.00	14.30	8.44
SDDGS	-	3.80	14.56	24.39	34.10
Poultry viscera meal	12.00	12.80	13.10	13.80	14.70
Corn gluten - 60	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Corn	42.31	40.76	34.37	28.89	23.27
Soybean oil	0.02	0.25	1.68	2.85	4.03
L-lysine	-	0.02	0.19	0.29	0.41
DL-methionine	0.13	0.13	0.12	0.09	0.06
L-threonine	0.30	0.29	0.30	0.31	0.33
L-tryptophan	0.04	0.08	0.09	0.12	0.15
Dicalcium phosphate	3.80	3.74	3.77	3.75	3.71
CMC ²	2.00	1.72	1.03	0.42	-
Vitamin and mineral premix ³	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Vitamin C ⁴	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Antioxidant (BHT) ⁵	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Calculated composition (% original matter)</i>					
Digestible energy (kcal kg ⁻¹)	3036	3036	3036	3036	3036
Digestible protein	26.81	26.81	26.81	26.81	26.81
Crude fiber	4.07	4.02	4.00	4.00	4.15
Crude fat	4.74	5.25	7.05	8.66	10.29
Total calcium	1.85	1.85	1.85	1.86	1.86
Phosphorus available	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52
Lysine	1.54	1.53	1.55	1.53	1.53
Methionine	0.54	0.54	0.54	0.53	0.52
Methionine + Cystine	0.92	0.93	0.93	0.92	0.92
Threonine	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18
Tryptophan	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>Proximate composition (% dry matter)</i>					
Dry matter	96.88	95.19	94.88	94.09	94.02
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	4014	4098	4230	4380	4474
Crude protein	29.60	30.32	31.43	30.90	31.58
GE: CP ⁶	135.62	135.14	134.56	141.73	141.66
Crude fiber	3.63	3.71	3.59	3.71	3.86
Crude fat	4.67	5.60	5.70	8.63	9.80
Total calcium	1.84	1.95	1.83	2.03	1.87
Total phosphorus	1.01	1.12	1.04	1.00	1.08

¹Replacement levels of protein soybean meal for the SDDGS; ²CMC = Carboxy methyl cellulose; ³Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ⁴Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland; ⁵Butylated hydroxytoluene; ⁶GE:CP = energy:protein ratio.

Table 4. Proximate composition and apparent digestibility coefficients (ADCS %)¹ of nutrients and energy of the test ingredients (% dry matter)².

	Ingredients	
	SDDGS	Farelo de soja
<i>Proximate composition</i>		
Dry matter	89.15 (38.41)	85.80 (63.34)
Crude protein	38.70 (66.41)	51.70 (94.42)
Crude fat	7.96 (87.70)	3.50 (85.22)
Crude fiber	10.70	6.01
Ash	2.18 (48.77)	6.24 (42.56)
Gross energy, kcal/kg ⁻¹	5349 (41.49)	4751 (69.77)
<i>Amino acids</i>		
Alanine	3.25 (77.53)	2.10 (96.93)
Arginine	1.23 (81.40)	3.53 (99.03)
Aspartic acid	2.13 (83.50)	5.36 (99.07)
Glycine	1.13 (66.86)	2.21 (94.46)
Isoleucine	1.57 (76.19)	2.34 (97.10)
Leucine	5.05 (78.03)	3.87 (97.16)
Glutamic acid	7.18 (86.74)	8.87 (98.78)
Lysine	0.81 (70.98)	3.47 (97.92)
Cystine	0.34 (98.50)	0.49 (99.54)
Methionine	0.45 (83.17)	0.36 (94.28)
Phenylalanine	1.91 (78.99)	2.52 (98.08)
Tyrosine	1.12 (71.53)	1.53 (93.71)
Threonine	1.08 (70.18)	1.77 (95.25)
Tryptophan	0.16 (nd ³)	0.22 (89.39)
Proline	3.03 (83.89)	2.53 (96.06)
Valine	1.79 (70.90)	2.32 (96.21)
Histidine	0.83 (79.87)	1.32 (98.10)
Serine	1.46 (84.53)	2.37 (97.42)
<i>Calcium and Phosphorus</i>		
Total calcium	0.12	0.24
Total phosphorus	0.21 (49.39)	0.47 (26.05)

¹ADCS = apparent digestibility coefficients; ²Values are means (n=3); ³nd = no detected.

Table 5. Growth performance and feed utilization of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

Levels of replacement (%) ²	0	10	30	50	70	<i>P-value</i>
Weight gain (g) ^a	177.60 ± 4.69	178.86 ± 5.44	185.41 ± 7.73	183.53 ± 6.36	182.88 ± 11.95	0.581
Feed intake (g) ^b	171.05 ± 0.58	172.94 ± 1.46	172.32 ± 1.00	173.25 ± 0.66	172.81 ± 1.07	0.056
Feed conversion ratio ^c	0.94 ± 0.03	0.97 ± 0.02	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.06	0.614
Protein efficiency ratio (%) ^d	3.63 ± 0.09	3.51 ± 0.09	3.54 ± 0.14	3.55 ± 0.12	3.42 ± 0.21	0.351
Nitrogen retention (%) ^e	53.80 ± 2.90	52.95 ± 1.84	55.02 ± 1.47	54.96 ± 3.45	52.28 ± 3.41	0.552
Energy retention (%) ^f	38.04 ± 7.07	40.88 ± 3.72	41.64 ± 2.41	39.28 ± 5.44	44.68 ± 4.04	0.389
Visceral fat (%) ^g	2.47 ± 0.65	2.45 ± 0.45	2.46 ± 0.58	2.46 ± 0.56	2.46 ± 0.65	0.998
Survival (%) ^h	100.00 ± 0	95.45 ± 5.25	97.72 ± 4.55	100.00 ± 0	95.45 ± 5.25	0.293

¹Values presented as means ± standard deviation. Means in the same row with different letters differ ($P < 0.05$) by Tukey test. $n = 4$. ²Replacement levels of protein soybean meal for the CDDGS; ^aWeight gain: [final weight (g) - initial weight (g)]; ^bFeed intake: dry matter ingested feed (g); ^cFeed conversion: [dry matter feed intake (g)/weight gain (g)]; ^dProtein efficiency ratio: [weight gain (g)/(dry matter crude protein intake (g))]; ^eNitrogen retention (% Nitrogen intake): (Nitrogen retention/Nitrogen intake)*100; ^fEnergy retention (% Energy intake): (Energy retention/Energy intake)*100; ^gVisceral fat (VF) = (visceral fat weight/body weight) x 100; ^hSurvival: [(number of final fish/number of initial fish)]*100.

Table 6. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

	Initial	Levels of replacement (%) ²					<i>P-value</i>
		0	10	30	50	70	
Moisture (%)	70.94 ± 7.88	70.57 ± 2.06	68.93 ± 1.06	69.46 ± 0.92	69.68 ± 1.72	67.75 ± 1.34	0.079
Protein (%)	14.65 ± 4.17	15.14 ± 0.34	15.71 ± 0.66	15.98 ± 0.39	15.41 ± 0.64	15.94 ± 0.60	0.111
Lipid (%)	9.91 ± 2.25	10.15 ± 2.44	11.77 ± 1.30	11.22 ± 1.15	10.84 ± 2.00	12.23 ± 1.37	0.098
Gross energy (kcal kg ⁻¹)	1681 ± 444	1663 ± 189	1844 ± 139	1823 ± 112	1767 ± 185	1916 ± 45	0.112
Ash (%)	4.20 ± 1.35	4.19 ± 0.28	4.29 ± 0.40	4.04 ± 0.17	4.45 ± 0.39	4.18 ± 0.44	0.485

¹Values presented as means ± standard deviation (n = 5). Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test; ²Replacement levels of protein soybean meal for the SDDGS.

Table 7. Villus height (VH), crypt depth (CD) and villus: crypt ratio (V:C) of Nile tilapia fed experimental diets for 90 days¹.

Levels of replacement (%) ²	0	10	30	50	70	<i>P-value</i>
VH (μm)	288.10 ± 37.70	302.61 ± 33.49	305.35 ± 54.88	343.44 ± 41.82	361.89 ± 54.50	0.093
CD (μm)	23.07 ± 2.65	22.78 ± 1.85	22.96 ± 1.74	23.03 ± 2.00	22.11 ± 2.29	0.401
V:C	12.54 ± 1.38b	13.28 ± 0.83b	13.29 ± 2.16ba	15.02 ± 2.41ba	16.44 ± 2.62a	0.037

¹Values presented as means ± standard. Means in the same row with different letters differ ($P < 0.05$) by Tukey test. n= 180. ²Replacement levels of protein soybean meal for the SDDGS.

Table 8. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the SDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress¹.

		Levels of replacement (%) ²				
		0	10	30	50	70
RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)	No stress	1.66 ± 0.18	1.79 ± 0.19	1.71 ± 0.19	1.72 ± 0.17	1.76 ± 0.18
	Stressed	1.71 ± 0.22	1.79 ± 0.20	1.82 ± 0.24	1.75 ± 0.19	1.79 ± 0.21
HTC (%)	No stress	26.18 ± 2.88	29.06 ± 2.82	29.06 ± 2.09	26.63 ± 2.00	26.88 ± 2.70
	Stressed	27.50 ± 3.18	29.38 ± 3.59	27.84 ± 2.37	27.25 ± 3.09	28.53 ± 2.93
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.81 ± 0.84	7.18 ± 0.74	7.04 ± 0.64	6.76 ± 0.49	6.71 ± 0.63b
	Stressed	7.18 ± 0.77	7.54 ± 1.03	7.36 ± 0.51	7.13 ± 1.12	7.52 ± 0.28a
MCV (fL)	No stress	157.70 ± 10.95	162.84 ± 9.70	171.93 ± 19.90	156.71 ± 19.86	153.88 ± 17.41
	Stressed	161.31 ± 14.64	164.57 ± 7.87	154.20 ± 15.55	155.86 ± 8.00	160.82 ± 18.88
MCHC (%)	No stress	26.01 ± 1.05	24.74 ± 1.55	24.28 ± 2.03b	25.43 ± 1.72	25.04 ± 1.68
	Stressed	26.14 ± 1.10	25.66 ± 1.52	26.51 ± 1.40a	26.04 ± 2.36	26.34 ± 1.09
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	2.86 ± 0.54	3.06 ± 0.46	2.81 ± 0.38	2.81 ± 0.33	2.86 ± 0.39
	Stressed	2.89 ± 0.30	3.08 ± 0.20	3.10 ± 0.29	2.81 ± 0.22	3.00 ± 0.17
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	0.99 ± 0.25	0.97 ± 0.19	1.01 ± 0.19	1.03 ± 0.14	1.14 ± 0.25
	Stressed	1.05 ± 0.25	1.02 ± 0.16	1.11 ± 0.31	1.02 ± 0.22	1.22 ± 0.36
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.87 ± 0.34	2.09 ± 0.53	1.95 ± 0.50	1.78 ± 0.31	1.71 ± 0.40
	Stressed	1.84 ± 0.28	2.05 ± 0.13	1.99 ± 0.21	1.79 ± 0.24	1.78 ± 0.31
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.53 ± 0.10	0.50 ± 0.19	0.48 ± 0.23	0.60 ± 0.15	0.71 ± 0.28
	Stressed	0.59 ± 0.19	0.50 ± 0.08	0.57 ± 0.19	0.59 ± 0.20	0.74 ± 0.37
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	54.07 ± 19.47b	57.26 ± 12.58b	61.04 ± 11.63b	69.37 ± 16.80b	55.07 ± 13.76b
	Stressed	113.56 ± 24.35a	118.48 ± 25.20a	142.68 ± 42.26a	124.81 ± 47.72a	127.60 ± 46.93a

¹Values are means ± standard deviation of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Means followed by different letters differ statistically (t test; P<0.05). ²Replacement levels of protein soybean meal for the SDDGS; RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose.

Table 9. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of replacement protein soybean meal by the SDDGS for 90 days and subjected to grading-induced stress¹.

		Levels of replacement (%) ²				
		0	10	30	50	70
Lymphocyte (%)	No stress	80.38 ± 14.02a	75.75 ± 21.60a	75.69 ± 23.33a	78.19 ± 17.19a	75.31 ± 21.65a
	Stressed	48.00 ± 18.26b	49.94 ± 14.47b	48.94 ± 19.81b	53.38 ± 16.12b	53.13 ± 11.82b
Neutrophil (%)	No stress	13.44 ± 10.20b	16.06 ± 15.81b	17.19 ± 18.34b	14.69 ± 13.49b	17.56 ± 19.46b
	Stressed	45.88 ± 15.58a	41.31 ± 12.49a	44.00 ± 16.92a	40.19 ± 13.89a	39.44 ± 9.45a
Monocyte (%)	No stress	6.19 ± 4.91	8.19 ± 6.99	7.13 ± 5.32	7.13 ± 4.74	7.13 ± 3.29
	Stressed	6.13 ± 3.69	8.75 ± 4.97	7.06 ± 4.71	6.44 ± 4.52	7.44 ± 3.85
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	51544 ± 8632a	52819 ± 3369a	51180 ± 6182a	54074 ± 6592a	55019 ± 7309a
	Stressed	27844 ± 5612b	29968 ± 4128b	32096 ± 10006b	30313 ± 11601b	22839 ± 9008b
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	42149 ± 13353a	40458 ± 13112a	38186 ± 11481a	42557 ± 11701a	40871 ± 11145a
	Stressed	13183 ± 5575b	14997 ± 5012b	18613 ± 8466b	15660 ± 7185b	12377 ± 6373b
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	6272 ± 4571	8215 ± 7770	9242 ± 10298	7660 ± 7200	10134 ± 11603
	Stressed	12985 ± 6516	12457 ± 4353	17310 ± 8486	12723 ± 8682	8953 ± 4115
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	3084 ± 2302	4145 ± 3379	3688 ± 3155	3782 ± 2564	3943 ± 2070
	Stressed	1653 ± 1089	2514 ± 1308	2776 ± 2019	1884 ± 1453	1470 ± 1240

¹Values are means ± standard deviation of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Means followed by different letters differ statistically (t test; $P < 0.05$). ²Replacement levels of protein soybean meal for the SDDGS.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

No presente estudo foi possível evidenciar o potencial de utilização dos DDGS como alimentos proteicos alternativos ao farelo de soja, além de fornecer subsídios para inclusão destes como ingredientes em formulações de dietas.

As deficiências dos DDGS em termos de composição aminoacídica, indicam a necessidade de suplementação de aminoácidos na forma cristalina ou a utilização em conjunto com ingredientes que disponham de perfil de aminoácido que possam complementar e, desse modo, atender as exigências nutricionais estabelecidas para tilápia-do-Nilo. O elevado teor em fibra é outro fator que limita a inclusão de níveis elevados dos DDGS em dietas para peixes.

A melhor integridade da mucosa intestinal nos peixes alimentados com dietas contendo DDGS sugere que, além da utilização deste alimento como substituto parcial a proteína do farelo de soja sua inclusão em rações, pode ainda, exercer efeitos positivos sobre as características morfológicas intestinais da tilápia-do-Nilo.

Os DDGS contêm substâncias como os β -glucanos que possuem ação conhecida sobre a melhor resposta do sistema imune e outros estudos detectaram efeitos positivos deste alimento em diferentes espécies de peixes, dessa forma, futuras pesquisas devem ser conduzidas para verificar possíveis efeitos deste alimento sobre a saúde dos peixes.

A abordagem realizada neste estudo demonstra relevância do ponto de vista prático, fornecendo informações para o desenvolvimento de formulações com ingredientes proteicos alternativos e de custo relativamente baixo que irão beneficiar toda a cadeia produtiva.