



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

VANESSA BEZERRA DA SILVA ROXO

GLICERINA BRUTA EM DIETAS DE JUVENIS DO HÍBRIDO “PINTADO-DA-AMAZÔNIA” (fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*)

ARAGUAÍNA - TO

2018

VANESSA BEZERRA DA SILVA ROXO

GLICERINA BRUTA EM DIETAS DE JUVENIS DO HÍBRIDO “PINTADO-DA-AMAZÔNIA” (fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito para obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Estevan Moron.
Coorientadora: Profa. Dra. Deborah Alves Ferreira

ARAGUAÍNA - TO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- R887g Rôxo, Vanessa Bezerra da Silva.
Glicerina bruta em dietas de juvenis do híbrido “pintado-da-Amazônia”
(fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*). / Vanessa
Bezerra da Silva Rôxo. – Araguaína, TO, 2018.
74 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.
Orientador: Sandro Estevan Moron
Coorientadora : Deborah Alves Ferreira
1. Desempenho. 2. Perfil metabólico. 3. Histopatologia. 4.
Microorganismos. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

VANESSA BEZERRA DA SILVA ROXO

GLICERINA BRUTA EM DIETAS DE JUVENIS DO HÍBRIDO “PINTADO-DA-AMAZÔNIA” (fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins foi avaliada para a obtenção do grau de mestre e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação

09/03/2018

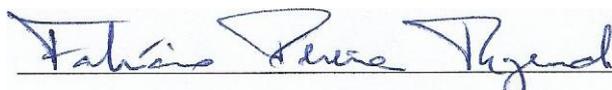
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron (Orientador)
Universidade Federal do Tocantins



Prof. Dr. Deborah Alves Ferreira (Coorientadora)
Universidade Federal do Tocantins



Prof. Dr. Fabrício Pereira Rezende (Membro externo)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Ao Senhor Deus pela oportunidade a mim concedida.

Aos meus pais (Ribamar e Lucilene) pela educação e valores pela qual fui moldada. A minha irmã e meu cunhado (Daniela e Eduardo) pelo apoio e confiança.

Ao meu esposo (Marcelo) e a nossa pequena Lara Sophia (ainda no meu ventre) pelo companheirismo, paciência e pela generosidade.

A minha amiga-irmã (Bárbara Cristina) pela amizade e parceria.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela minha existência e por essa conquista;

Aos meus pais (Lucilene Bezerra & José de Ribamar), pelo dom da vida;

A meu esposo (Marcelo) e nossa querida filha (ainda no meu ventre) pelo amor, companheirismo e compreensão nas dificuldades;

A minha querida irmã (Daniela) e meu cunhado (Eduardo) pelas palavras de incentivo;

Aos demais familiares pelo apoio incondicional;

A minha amiga-irmã (Bárbara Cristina) por todo o seu carinho e parceria;

A Nádia Stefanine, Pamyliuk Matos e Marcela Santuci pelo carinho e ajuda na conclusão deste trabalho;

Aos amigos de laboratório (Maria Paula Balduino, Gilzelle Maria, Liana Bezerra, Laiza Pereira, Eduardo Libanio, Deyvid Miranda e Jonas Oliveira), pelo companheirismo e auxílio;

À Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína;

Ao Prof. Dr. Sandro Estevan Moron, pela orientação deste trabalho;

A minha coorientadora Prof^a. Dra. Deborah Alves Ferreira por toda a colaboração nesta pesquisa;

Aos demais professores pelas orientações nos momentos de dúvidas;

A CAPES pela bolsa de estudos;

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho;

Aos demais colegas que de alguma forma contribuíram para com o trabalho;

MUITO OBRIGADA A TODOS!

Mas em todas estas coisas somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou.

Romanos 8:37

RESUMO

A produção de biodiesel tem sido acompanhada pelo incremento de subprodutos, dentre os quais a glicerina bruta, que vem sendo objeto de inúmeras pesquisas em que se destaca seu uso como fonte energética para alimentação de animais de produção. No presente estudo objetivou-se estabelecer os valores de desempenho zootécnico, composição corporal, parâmetros hematológicos, bioquímicos e análise histopatológica de juvenis de “pintado-da-Amazônia” após alimentação com ração contendo níveis crescentes de glicerina bruta. O experimento foi executado no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, utilizou-se 150 juvenis de pintado-da-Amazônia, com peso inicial de $6,83 \pm 1,11$ (g) e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições (10 animais em cada repetição). Os animais foram alimentados com cinco dietas contendo níveis crescentes de glicerina (0%; 5%; 7,5%; 10% e 12,5%) e arraçoados por um período de 90 dias (30 dias de adaptação e 60 dias experimental). Ao final desse período os animais foram contidos para mensuração dos valores de desempenho zootécnico (comprimento e peso final, sobrevivência, taxa de crescimento específico, índice hepatossomático, fator de condição, ganho de peso, conversão e eficiência alimentar) e posteriormente, os animais foram insensibilizados no gelo para realização da análise de composição corporal dos peixes, conforme a metodologia padrão descrita pela INCT (2012). Foram determinados os parâmetros hematológicos: hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos e os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) e para a análise bioquímica: concentração de proteínas totais, colesterol total, triglicérides, Enzima Aspartato Amino Transferase (AST) e Enzima Alanina Amino Transferase (ALT), glicogênio hepático, muscular e glicose sanguínea. Também foram realizadas as análises histopatológicas do fígado e rim dos animais. Dos índices avaliados (parâmetros zootécnicos, hematológicos, bioquímicos), a taxa de crescimento específico apresentou um comportamento linear crescente moderado e o glicogênio muscular no nível de 12,5% apresentou uma menor concentração em relação a dieta controle (0,0%). Quanto a histologia, a glicerina bruta não causou alterações hepáticas e renais significativas na espécie estudada, pois as alterações encontradas nos dois tecidos foram consideradas lesões que não comprometem o funcionamento do órgão ou lesões reversíveis. Por fim, os juvenis de pintado-da-Amazônia são capazes de metabolizar a glicerina bruta até o nível de 10,0%. Visto que, até esse nível não foram observadas alterações significativas nos parâmetros zootécnicos, composição corporal, hematológicos, bioquímicos e histológicos do animal.

Palavras-chave: biodiesel, piscicultura, desempenho, hematologia, metabolismo.

ABSTRACT

The production of biodiesel has been accompanied by the increase of by-products, among which crude glycerin, which has been the subject of numerous researches in which its use as an energy source for feed of production animals is highlighted. The present study aimed to establish the values of zootechnical performance, body composition, hematological parameters, biochemical parameters and histopathological analysis of juveniles of "Painted-of-Amazonia" after feeding with rations containing increasing levels of crude glycerin. The experiment was carried out at the Neotropical Fish Morphophysiology and Biochemistry Laboratory of the Federal University of Tocantins, 150 juveniles of Amazonian Paints, with initial weight of 6.83 ± 1.11 (g) and length of $10,06 \pm 0.57$ cm distributed in a completely randomized design (DIC), with 3 replicates (10 animals in each replicate). The animals were fed five diets with increasing levels of glycerol (0%, 5%, 7.5%, 10% and 12.5%) and fed for a period of 90 days (30 days of adaptation and 60 experimental days). At the end of this period, the animals were used to measure their performance (length and final weight, survival, specific growth rate, hepatosomatic index, condition factor, weight gain, conversion and feed efficiency). de-sensitized in the ice to perform the analysis of fish body composition, according to the standard methodology described by INCT (2012). Hematological parameters were determined: hematocrit, hemoglobin, erythrocyte count, and hematocrit indices: VCM (mean corpuscular volume), HCM (mean corpuscular hemoglobin) and CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration) and for biochemical analysis: total protein concentration, total cholesterol, triglycerides, Aspartate Amino Transferase (AST) and Enzyme Alanine Amino Transferase (ALT), hepatic, muscle glycogen and blood glucose. Histopathological analyzes of the liver and kidney of the animals were also performed. The specific growth rate showed moderate linear behavior and muscle glycogen at the level of 12.5% presented a lower concentration in relation to the control diet (0.0%). As for histology, crude glycerin did not cause significant hepatic and renal changes in the studied species, since the alterations found in the two tissues were considered lesions that did not compromise the functioning of the organ or reversible lesions. Finally, the juveniles of Painted Amazonian are able to metabolize the crude glycerin up to the level of 10.0%. Since, until this level, no significant changes were observed in the zootechnical, body composition, hematological, biochemical and histological parameters of the animal.

Keywords: biodiesel, fish farming, performance, hematology, metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

CAPITULO I

Figura 1 Exemplares de <i>Pseudoplatystoma tigrinum</i> (acima) e <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (abaixo).....	16
Figura 2 <i>Leiarius marmoratus</i> (macho)	17
Figura 3 Híbrido Pintado da Amazônia.....	18
Figura 4 Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.....	19
Figura 5 Ilustração de uma molécula de glicerol.....	21

CAPITULO II

Figura 1 Híbrido “Pintado-da-Amazônia”.....	32
Gráfico1 Taxa de crescimento específico.....	32

CAPITULO IV

Figura 1 Alterações histopatológicas no fígado de pintado-da-Amazônia.....	69
Figura 2 Valores médios de VMA e IAH no fígado de pintado-da-Amazônia nos diferentes níveis de glicerol bruto na dieta. Dados são médias \pm desvio padrão ($p>0,05$).	70
Figura 3 Alterações histopatológicas no rim de pintado-da-Amazônia.....	71
Figura 4 Valores médios de VMA e IAH no rim de pintado-da-Amazônia nos diferentes níveis de glicerina bruta na dieta. Dados são média \pm desvio padrão ($p >0,05$).	72

LISTA DE TABELA

CAPITULO II

Tabela 1 Composição percentual e química das rações experimentais com diferentes níveis de glicerina bruta para juvenis de “pintado-da-Amazônia”.	33
Tabela 2 Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental.....	36
Tabela 3 Parâmetros zootécnicos do híbrido “pintado-da Amazônia”, alimentados com inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na ração.....	36
Tabela 4 Composição corporal do híbrido “pintado-da Amazônia”, alimentados com inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na ração.....	39

CAPITULO III

Tabela 1 Parâmetros hematimétricos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.	50
Tabela 2 Contagem total e diferencial de leucócitos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.....	52
Tabela 3 Parâmetros bioquímicos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. (P>0,05) em relação ao controle.	53
Tabela 4 Glicogênio hepático e muscular dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicérol. (P > 0,05) em relação ao controle.	56
Tabela 5 Glicogênio hepático dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, analisado pelo programa Image J.....	56

CAPITULO IV

Tabela 1 Classificação das alterações histológicas do fígado quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, adaptado de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994).	66
Tabela 2 Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksic & Mitrovic-Tutundžic (1994).	67
Tabela 3 Ocorrência de alterações no tecido hepático de juvenis Pintado-da-Amazônia alimentados com diferentes níveis de adição de glicerina bruta à ração.	68
Tabela 4 Ocorrência de alterações no tecido renal de juvenis Pintado-da-Amazônia alimentados com diferentes níveis de adição de glicerina bruta à ração.	71

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CCA	Conversão alimentar aparente
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EA	Eficiência alimentar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FC	Fator de condição
FDA	Food and Drug Administration
GP	Ganho de peso
Hb	Hemoglobina.
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hct	Hematócrito
IAH	Índice de alteração histológica
IH	Índice hepatossomático
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal
LG-PAS	Leucócito granular-PAS positivo
Na ⁺	Sódio
RBC	Número de eritrócitos
SO	Sobrevivência
TCE	Taxa de crescimento específico
VCM	Volume corpuscular médio
VMA	Valor médio de alteração
Ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Ordem siluriformes, família pimelodidae	15
2.1.1 <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	15
2.1.2 <i>Leiarius marmoratus</i>	17
2.1.3 Híbrido <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (fêmea) e <i>Leiarius marmoratus</i> (macho).....	18
2.2 Produção do biodiesel	19
2.3 Glicerol	20
2.4 Metabolismo e transporte do glicerol	22
2.5 Glicerol como fonte de energia	23
REFERÊNCIAS	25

CAPITULO II

RESUMO	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Composição corporal	34
2.2 Desempenhos zootécnicos avaliados	34
2.3 Análises estatísticas	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	40

CAPITULO III

RESUMO	44
ABSTRACT	45
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Parâmetros hematológicos	47
2.2 Análises dos parâmetros bioquímicos	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Avaliação da série vermelha	49
3.2 Avaliação da série branca	51

3.3 Avaliação bioquímica	53
3.4 Análises de glicogênio hepático e muscular.....	56
4 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58

CAPITULO IV

RESUMO.....	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1 Análises histopatológicas.....	67
3.1.1 Fígado	67
3.1.2 Rim.....	70
4 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O elevado crescimento da população mundial traz consigo implicações como o aumento pela demanda por insumos básicos inerentes à sobrevivência. Razão pelo qual a comunidade científica tem concentrado suas atenções a questões que promovam a perpetuação da humanidade e a sustentabilidade do planeta, tais como o desenvolvimento de fontes renováveis de energia e o aumento da produção de alimentos.

Assim, a produção do biodiesel tem se destacado como uma alternativa aos combustíveis fósseis, que são considerados os principais responsáveis pela emissão de gases de efeito estufa, como é o caso do dióxido de carbono. Em cenário nacional o biodiesel passou a se destacar com maior veemência a partir do ano de 2010, após a ratificação da obrigatoriedade de sua utilização junto ao diesel de origem fóssil, conforme a legislação nacional vigente.

Porém, a produção de biodiesel gera consideravelmente uma quantidade de subproduto conhecido como glicerina bruta e que possui um alto potencial poluidor quando não descartado de forma correta. Uma possível solução para este problema está na utilização desta glicerina como alimento alternativo para animais de produção, pois além das vantagens atreladas a sua biodisponibilidade, a glicerina possui baixo custo.

A atividade de piscicultura tem sido uma das áreas de pesquisas em que se tem testado esse subproduto como alimento alternativo. Pois, mesmo sendo um setor que tem contribuído para a produção mundial de alimentos, o mesmo enfrenta alguns entraves que dificultam sua expansão, como a dependência de ingredientes dietéticos que são poucos abundantes e que oneram a produção, já que a alimentação representa entre 70 a 90% dos custos de produção do pescado em cativeiro.

A existência de trabalhos que tenham investigado a utilização da glicerina bruta em dietas para peixes ainda é considerada incipiente. Assim, diante do atual cenário de crescimento da aquicultura e da produção de biodiesel, a busca por informações aliado à experimentação animal sobre a utilização deste subproduto como ingrediente energético na dieta de peixes é imprescindível para avaliar a substituição de fontes de energia dietéticas convencionalmente usadas e para o embasamento de estudos posteriores com a glicerina na nutrição de peixe.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar o melhor nível de inclusão de glicerol, na dieta do híbrido “pintado - da - Amazônia” pela avaliação dos índices zootécnicos, composição corporal, perfil metabólico e histopatologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem siluriformes, família pimelodidae

Esta ordem siluriforme é caracterizada por incluir peixes de couro, que possuem o corpo roliço e alongado e a cabeça achatada. Possuem também três pares de barbilhões próximos à boca, além de terem suas nadadeiras dorsais e peitorais constituídas de um acúleo forte e pungente (CAMPOS, 2005).

A família Pimelodidae se destaca dentre os siluriformes por suas características morfológicas distintas (nadadeiras peitorais, ventrais, dorsal, anal e caudal raiadas, nadadeira adiposa bem desenvolvida e barbilhões sensitivos na mandíbula e no maxilar) e seu valor comercial (geralmente são peixes de grande porte e de carne saborosa) (DUTRA et al., 2014).

A família Pimelodidae possui 30 gêneros, 87 espécies conhecidas e 112 estimadas. Dentre as espécies que se destacam nesta ordem incluem-se o jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*), e os chamados Surubins (*Pseudoplatystoma spp.*), que juntos deram origem recentemente a um híbrido conhecido como pintado amazônico (GOMIDES, 2012)

O gênero *Pseudoplatystoma* inclui os maiores peixes da família Pimelodidae encontrados nas principais bacias hidrográficas sul-americanas (ROMAGOSA et al., 2003). Este gênero era associado a apenas três espécies, o surubim (*P. fasciatum*), o surubim tigre (*P. tigrinum*) e o pintado (*P. coruscans*). No entanto, recentemente tem se incluído a este gênero cinco espécies: *P. punctifer*, *P. reticulatum*, *P. orinocoense n. sp.*, *P. metaense n. sp.* e *P. magdalenia tumn. sp* (LUCA et al., 2012).

Os surubins costumam ser classificados como pintado e cachara. São peixes de água doce que possuem alto valor comercial no mercado brasileiro, pois possui carne nobre e saborosa, tendo baixo teor de gordura e espinhos intramusculares ausentes, o que aumenta as possibilidades de preparo deste peixe. Tais características visam suprir as exigências atuais e futuras do mercado de carne de peixe, o que destaca o surubim como produto para exportação (ROMAGOSA et al., 2003).

2.1.1 *Pseudoplatystoma punctifer*

Conhecido popularmente por cachara (figura 1) é uma espécie distribuída pela bacia Amazônica abrangendo os estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Norte de Mato Grosso e parte da região Nordeste nos estados do Maranhão e Piauí (LUCA et al., 2012; ARAGÃO et al., 2008).

Figura 1 Exemplos de *Pseudoplatystoma tigrinum* (acima) e *Pseudoplatystoma punctifer* (abaixo)



Foto: © Mark Sabaj Pérez

É uma espécie de hábito noturno e piscívoro, que pode alcançar o peso de 100 kg, as fêmeas costumam serem maiores que os machos (PORTALETE et al., 2015). Possui a região anterior da cabeça apontada, formando um tipo de linha reta na região ventral do corpo. Apresenta uma pigmentação escura na região dorsal que se estende para a linha lateral. Na porção ventral à linha lateral, a coloração varia de esbranquiçado a amarelado (BUITRAGO-SUÁREZ, 2007).

Acredita-se que esta espécie siga algumas características comuns às outras espécies do gênero, que possuem hábitos de migração, curto período reprodutivo realizado em leitos de rios durante a estação chuvosa, desova total ou única, ausência de cuidado parental, ovos livres, de coloração amarelada e embriogênese rápida, com duração de aproximadamente 16 horas e temperatura média de $23,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ (LUCA et al., 2012).

Taxonomia de acordo com a FISHBASE (2017):

Reino Animália

Filo Chordata

Classe Actinopterygii

Ordem Siluriforme

Família Pimelodidae

Gênero *Pseudoplatystoma*

Espécie *Pseudoplatystoma punctifer*

2.1.2 *Leiarius marmoratus*

O Jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) (figura 2) é uma espécie amazônica conhecida popularmente por bagre, jundiá do Norte, bagre negro ou yaque. É caracterizado por ser um peixe de grande porte, podendo alcançar cerca de 100 cm de comprimento. A nadadeira dorsal possui raios ramificados (nove ou dez). O corpo e as nadadeiras são marcados por um padrão colorido peculiar consistindo em manchas escuras sobre um fundo marrom-amarelado (CAÚPER, 2006; GOMIDES, 2012; FISHBASE, 2017).

Figura 2 *Leiarius marmoratus* (macho)

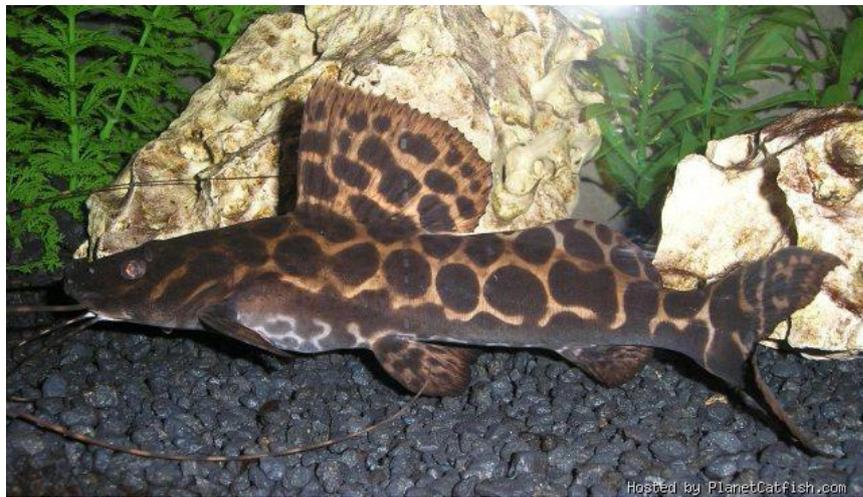


Foto: © Terry Lecyk

L. marmoratus é uma espécie onívora, característica que é vista como meio de minimizar as taxas de canibalismo nas fases iniciais de vida das espécies carnívoras como as pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma* (MATEO, 2008).

É classificado como peixe de couro, que costuma habitar os leitos, lagos e poços profundos. Tanto na fase jovem, quanto na adulta podem se organizar em grandes cardumes. Possui hábito de se abrigar durante o dia sobre rochas e troncos de árvores que ficam próximos aos leitos dos rios, sendo mais ativos ao amanhecer, entardecer e a noite. São animais de clima tropical com temperatura que varia entre 24°C – 26°C (PORTALETE et al., 2015).

Segundo FISHBASE, (2017), ocupam a seguinte posição sistemática:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: *Leiarius*

Espécie *Leiarius marmoratus*

Sánchez et al. (2009) comparou parâmetros de crescimento de *L. marmoratus* com outras espécies de bagres, e concluíram que seu crescimento foi maior do que “bagrid” (*Mystus nemurus*), similar ao bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e ficou abaixo do apresentado pelo bagre Jundiá (*Rhamdia quelen*) e pintado (*Pseudoplatystoma*).

2.1.3 Híbrido *Pseudoplatystoma punctifer* (fêmea) e *Leiarius marmoratus* (macho)

O híbrido “pintado-da-amazônia” (figura 3), obtido através do cruzamento entre cachara (*Pseudoplatystoma spp.*) e jundiá da amazônia (*Leiarius marmoratus*), é caracterizado por ser um peixe de crescimento rápido de manejo produtivo simples na fase de alevinagem. É uma espécie que tolera bem o cultivo intensivo, resiste a baixas concentrações de oxigênio, é organoléptico e possui ótimo rendimento de carcaça; o que é bastante favorável ao atendimento do mercado consumidor (BARBOSA et al, 2015).

Figura 3 Híbrido Pintado da Amazônia.



Fonte: Silva et al. (2015).

Nos últimos anos, os híbridos pintados da Amazônia ou pintadiá adquiriram maior atenção, forma que passaram a ser mais expressivo em produção do que o híbrido conhecido popularmente como ponto e vírgula. Visto que, é um peixe que permite flexibilidade em relação

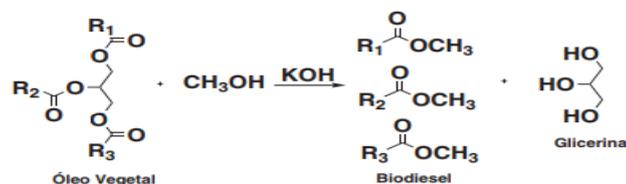
ao manejo alimentar por ser onívoro, abatimento dos custos de produção, menor taxa de canibalismo na larvicultura e, conseqüentemente, favorece o aumento da produtividade de alevinos (ALVES et al., 2014).

2.2 Produção do biodiesel

As mudanças climáticas se tornaram um desafio para a sustentabilidade global. Os gases de efeito estufa são considerados os principais responsáveis por essas alterações ambientais, visto que a emissão do gás carbônico corresponde a aproximadamente 84% desses gases, que são em sua maioria provenientes das atividades humanas, sendo que 82% dele oriundo da queima de combustíveis fósseis. Neste contexto, é imperativa a busca por soluções energéticas mais sustentáveis, onde a produção de biodiesel representa uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis e tornou-se uma alternativa em destaque (DIAS et al., 2009).

O biodiesel é produzido através de óleo vegetal ou gordura animal resultantes da reação química de lipídios com álcool, especialmente metanol. A transesterificação, que quebra lipídios, principalmente triglicérides, em ésteres metílicos (biodiesel) e glicerina (Figura 4) na presença de um catalisador base, como o sódio ou o potássio é a principal reação química durante este processo (JUNG; BATAL, 2011).

Figura 4 Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.



Fonte: Adaptado de Mota et al., (2009).

A região Amazônica apresenta grande potencial para produção de biodiesel a partir da exploração manejada e sustentada de espécies oleaginosas nativas oriundas da biodiversidade local (BARBOSA et al., 2009). Esta produção pode ser destinada para uso em motores de caminhões, tratores e automóveis, mas também para geração de energia elétrica (geradores elétricos a diesel) em comunidades isoladas, contribuindo para aumentar o desenvolvimento humano nestas localidades.

No Brasil, o Governo Federal por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, instituiu a partir de 2004 que este biocombustível fosse adicionado ao diesel fóssil.

Já em 2008, o diesel comercializado no território nacional passou a conter, compulsoriamente, 3% de biodiesel (MOTA, et. al. 2009).

No entanto, de acordo com Agência Nacional do Petróleo - ANP esses valores foram revistos e a quantidade de biodiesel adicionada ao óleo diesel passou a ser de 6% a partir de agosto e de 7% a partir de novembro de 2014, conforme a Lei nº 13.033/2014 (BRASIL, 2016).

Ainda de acordo com ANP, no ano de 2015, a capacidade nominal referente à produção de biodiesel brasileiro era de cerca de 7,4 milhões de m³ (20,4 mil m³/dia). Entretanto, a produção nacional foi de 3,9 milhões de m³, correspondendo a 53,3% da capacidade total.

Se, por um lado, estas ações favoreceram ao Brasil a vanguarda do uso de combustíveis alternativos no planeta, elas também reforçaram a necessidade de se encontrar aplicações comerciais para os subprodutos de produção do biodiesel, como o glicerol (MOTA, et al., 2009).

O glicerol representa uma substância potencialmente poluidora quando não destinado de forma correta (NEU et al., 2012). Para cada 90m³ de biodiesel produzidos, são gerados 10m³ de glicerol bruto, podendo se tornar um problema econômico e ambiental se não for lido devida utilização (APOLINÁRIO et al., 2012).

2.3 Glicerol

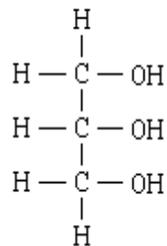
Segundo a IUPAC (1997), o glicerol, também conhecido por 1, 2, 3 propanotriol é um álcool de fórmula molecular C₃H₈O₃. Os produtos ditos comerciais costumam apresentar em sua composição menos que 95% de glicerol, sendo denominado por essa característica como glicerina.

Tal substância é gerada pelo processo de transesterificação e possui em sua composição aproximadamente 80% de glicerol, álcool (metanol ou etanol), água e um pouco de biodiesel (MOTA, et al., 2009). Parte desse material possui cerca de 30% de impurezas em sua composição (catalisadores, álcoois, ácidos graxos e sais). Estas impurezas estão relacionadas com a natureza do óleo vegetal ou da gordura animal utilizado e do tipo de catalisador (ácido, básico ou biológico) empregado na preparação deste biocombustível. Ainda assim a glicerina bruta é considerada um subproduto de valor agregado no mercado (PEITER et al., 2016).

Possui uma energia bruta na faixa de 3600 a 3750 kcal/kg e, dependendo do processo de purificação da glicerina, o valor energético pode ser de 4305 kcal/kg de energia bruta (HOLTKAMP et al., 2007).

O glicerol é um álcool, líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (KARAM et al., 2016). A sua forma estrutural está representada na (figura 5).

Figura 5 Ilustração de uma molécula de glicerol.



Fonte: Apolinário et al., (2012).

Na natureza, o glicerol está presente nos vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais em combinações de glicerina com ácidos graxos (RIVALDI et al., 2007).

De acordo com Donkin (2008), a glicerina é considerada como sendo um alimento seguro para os animais. No entanto, existem preocupações no que se refere a níveis de contaminantes provenientes da produção de biodiesel. Sendo que o teor de metanol em glicerol bruto deve ser inferior a 0,5%. A Food and Drug Administration-FDA (2006) agência responsável por proteger e promover a saúde pública através do controle e supervisão da segurança alimentar nos Estados Unidos indica teores de metanol superiores a 150 ppm podem ser considerados impróprios para a alimentação animal.

A metabolização do metanol nos mamíferos que ocorre principalmente no fígado resulta na oxidação em formaldeído e em seguida em ácido fórmico, além da formação de radicais livres. Nos animais de modo geral essa oxidação ocorre de forma lenta, porém é semelhante aos dos mamíferos. Tanto o formaldeído quanto os radicais livres podem provocar alterações no funcionamento dos componentes celulares de todas as espécies animais, principalmente em proteínas e lipídios. A atividade e a concentração de parâmetros enzimáticos antioxidantes e não-enzimáticos por exemplo, podem ser reduzidas em decorrência da intoxicação por metanol, provocando uma maior peroxidação de membrana de fosfolípidos (SKRZYDLEWSKA, 2003).

Porém, estudos de Lammers et al. (2008a) e Kijora et al. (1995) não verificaram frequência de lesões histológicas no rim, fígado, olhos de suínos decorrentes da toxicidade do

metanol presente na glicerina. Além disso, pesquisas constataram que o metanol possui um baixo ponto de evaporação (65°C) e que o processo de peletização das rações pode minimizar a presença deste álcool (DOPPENBERG e VAN DER AAR, 2007).

2.4 Metabolismo e transporte do glicerol

O glicerol costuma estar presente na corrente sanguínea e nas células dos animais, sendo oriunda da lipólise ocorrida no tecido adiposo, triglicérides em lipoproteínas plasmáticas ou através da dieta. Dentre as suas funções, pode citar-se a constituição do esqueleto de triacilgliceróis, transporte de equivalentes redutores (glicerol-3-fosfato) a partir das mitocôndrias do citoplasma para a fosforilação oxidativa e precursor da gluconeogênese, como o esqueleto de carbono (ALVARENGA et al., 2012).

Por serem incipientes trabalhos que dizem respeito ao metabolismo e transporte do glicerol em peixes foi necessário incluir neste estudo, informações a respeito do metabolismo do glicerol, baseadas em outras espécies.

Em relação ao transporte de glicerol em aves sabe-se que este por ser uma molécula de baixo peso molecular, é facilmente absorvido nos enterócitos por difusão. Após a absorção, ele é transportado até ao fígado, onde será metabolizado pela presença da enzima glicerol quinase, que é responsável pela fosforilação deste, transformando-o em glicerol-3-fosfato, e podendo ser utilizado em três rotas metabólicas distintas: glicólise; biossíntese de glicerofosfolípídeos e de triglicérides (BERNARDINO et al., 2013).

Quando ocorre uma redução do nível de glicemia logo em seguida a absorção dos nutrientes oriundos da dieta, inicia-se o período pós-absortivo. Neste fase, a ação do glucagon passa a prevalecer sobre a atividade da insulina. Uma vez, estimulado pelo glucagon, o fígado promove a glicogenólise e a gliconeogênese, com finalidade de fornecer glicose para o organismo (BERNARDINO et al., 2013).

Em ratos, há relatos de que o glicerol seja absorvido via transportador dependente de sódio (Na⁺) e por meio de transporte ativo secundário mediado por carreador no intestino delgado (KATO et al., 2005).

Em eperlano-arco-iris (*Osmerus mordax*) espécie de peixe nativa dos rios e águas costeiras da América do Norte o glicerol é transportado via difusão passiva no coração e pelo transporte facilitado nos eritrócitos (CLOW; DRIEDZIC, 2012).

Em mamíferos, pesquisas apontaram o fígado como sendo responsável por aproximadamente 1/4 do total da capacidade de metabolização de glicerol no organismo. Enquanto que rim é responsável por cerca de 1/5 desta capacidade de metabolização e pela

importante reabsorção do glicerol, que evita excessos de perdas pela urina. Entretanto, o glicerol, algo entorno de 1 mM de concentração sérica, pode ser totalmente excretado pelos rins (LIN,1977).

Nos ruminantes, a absorção do glicerol ocorre diretamente pelo epitélio ruminal, que passa pelo processo de metabolização no fígado e é direcionado para a gliconeogênese pela ação da enzima glicerol quinase, que o converte em glicose. Parte do glicerol pode sofrer ainda a fermentação a propionato, no rúmen, sendo então metabolizado a oxaloacetato, por meio do ciclo de Krebs, no fígado, e em seguida ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica (RODRIGUES, et al., 2013).

2.5 Glicerol como fonte de energia

O uso de glicerina bruta na alimentação animal não se restringe somente aos dias atuais, no passado foi alvo de estudos, especialmente na Europa. Portanto, a produção do biodiesel e consequentemente a disponibilidade de grande quantidade de glicerina bruta, estimulou interesse por novos estudos sobre a inclusão desse ingrediente na produção de rações (MENTEN et al., 2008).

Além de compor parte da energia da dieta animal, a glicerina pode favorecer a vida útil dos peletes, facilitando o uso do moinho e peletizadora, minimizando o gasto energético dos maquinários ao processar as dietas (COSTA et al., 2015).

O glicerol foi indicado como fonte energética para suínos (LAMMERS et al., 2008a) e aves (LAMMERS et al., 2008b), esse alimento possui alta absorção (KERR, DOZIER, 2008), já que ocorre de forma passiva, ao contrário de quando se utiliza outras fontes energéticas de ácidos graxos de cadeia longa que requerem a formação de micelas (DOZIER et al., 2008).

Lammers et al. (2007) realizaram experimento com suínos (machos e fêmeas) de 7,9 Kg alimentados com dietas contendo 0, 5 e 10% de glicerina bruta e concluíram que a glicerina bruta pode ser utilizada na alimentação de suínos, sem alterações no seu desempenho. Doppenberg e Van Der Aar (2007) propuseram que a glicerina acrescentada à dieta de terminação, aumentou a capacidade dos suínos em reter umidade da carne na carcaça.

Cerrate et al. (2006) incluíram níveis crescentes (0; 2,5; 5 e 10%) de glicerina bruta na dieta de frangos da linhagem Cobb 500 e verificaram que até 10% de inclusão não afetou o desempenho desses frangos até aos 14 dias de idade. Porém, após os 14 dias promoveu redução no rendimento de carcaça (peso do peito, da asa e da coxa), quando comparado aos outros níveis de testados.

O glicerol por possuir um nível energético muito alto e ter grande disponibilidade torna-se uma alternativa alimentar energética, podendo substituir o milho e o óleo de soja para peixes (DONKIN, DOANE, 2007).

A utilização de alimentos alternativos para peixes vem apresentando resultados significativos, pois eles têm demonstrado baixo custo e bons valores nutricionais, permitindo que os animais não tenham o seu desenvolvimento afetado (RAMOS et al., 2010). O conhecimento sobre a inclusão do glicerol nas dietas de peixes ainda são consideradas incipientes. Contudo já foram descritos a utilização do glicerol para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (LI et al., 2010), tilápias do Nilo (NEU et al., 2012) e mais recentemente para juvenis de tambaqui (MATOS et al., 2016).

Li et al, (2010) observaram que o consumo de ração, ganho de peso, índice de eficiência alimentar e no nível de lipídios do fígado do bagre do canal não foram influenciados pelos níveis de 0,0%, 5,0% e 10,0 % de glicerol. No entanto, nas dietas contendo 15,0 e 20,0 % de glicerol houve uma redução de peso, eficiência alimentar, e conteúdo de lipídios no fígado.

Neu et al. (2012) não identificaram diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com (0,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0 %) de glicerol, entretanto a sobrevivência dos peixes que foram alimentados sem a inclusão do glicerol na dieta foi superior aos demais.

Matos et al. (2016) relatam que juvenis de tambaqui alimentados com (0%; 7,5%; 10%; 12,5% e 15%) de glicerol não apresentaram taxa de mortalidade, e que de todos os índices avaliados apenas o fator de condição do animal apresentou diferença estatística, quando se comparado ao período inicial e o final do experimento.

REFERÊNCIAS

- APOLINÁRIO, F. D. B.; PEREIRA, G. F. P; FERREIRA, G. F. Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 141-146, 2012.
- ARAGÃO, D. G.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. Caracterização genética de *Pseudoplatystoma punctifer* de bacias da região nordeste, Brasil baseado em sequências do DNA mitocondrial, Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, **Anais...Salvador, BA**. v 1. 2008.
- ALVARENGA, R. R. et al. Use of glycerine in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 68, n. 4, p. 637-644, 2012.
- ALVES, A. L.; VARELA, E. S.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G. **Riscos Genéticos da Produção de Híbridos de Peixes Nativos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, (Documentos / Embrapa Pesca e Aquicultura) 60 p, 2014.
- BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F; BARRETO, A.C.; SILVA J.D; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M. Aproveitamento do Óleo das Amêndoas de Tucumã do Amazonas na Produção de Biodiesel. **Acta Amaz. [online]**. v.39, n.2, p.371-376, 2009.
- BARBOSA, P. T. L; PEREIRA, G.P; MENDES, B.V; PORTO, E. P. J; PIRES, T. B. Sistema de Produção de Pintado amazônico: caracterização das variáveis químicas da água. **XXV Congresso Brasileiro De Zootecnia Zootec 2015**. Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia, Fortaleza – CE, 2015.
- BERNARDINO, V.M.P.; RODRIGUES, P.B.; ALBINO, L.F.T; NAVES, L.P.; SCOTTÁ, B.A.; PEREIRA, C.M.C. Metabolismo do Glicerol em Aves – Revisão Bibliográfica. **Revista eletrônica nutritime**, v. 10, n. 5, p. 2752 – 2780, 2013.
- BRASIL. **Biodiesel**. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>> Acessado em 16 de abr. de 2017.
- BUITRAGO–SUÁREZ, U. A.; BURR, B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**. 2007.
- CAMPOS, J.L. **O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix e Agassiz, 1829)**. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Cap.14. Santa Maria: UFSM, p. 335-361, 2005.
- CÁUPER, G. C. B. **Biodiversidade Amazônica: Flora Amazônica**. Centro cultural dos povos da Amazônia – CCPA. Manaus, AM. v. 2, 2006.
- CERRATE, S.; YAN, F., WANG, Z.; COTO, C.; SACAKLI, P.; WALDROUP, P.W. Evaluation of Glycerine from Biodiesel Production as a Feed Ingredient for Broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 11, p.1001-1007, 2006.

CLOW, K. A.; DRIEDZIC, W. R. Glycerol uptake is by passive diffusion in the heart but by facilitated transport in RBCs at high glycerol levels in cold acclimated rainbow smelt (*Osmerus mordax*). **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 302, n. 8, p. 1012-1021, 2012.

COSTA, D. V.; PAULO, R. R.; OKAMURA, D.; OLIVEIRA, M. M.; ROSA, P. V. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed glycerol. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.50, n.5, p.347-354, 2015.

DIAS, M.F.P; JUNIOR, S.S; ROSA, N.P.; MENDONÇA, E.; SILVA, T.N. Análise da sustentabilidade da produção de biodiesel de soja no Brasil. **Revista Administração Frederico Westphalen** v. 9 n. 14 p. 13-45 2009.

DONKIN, S. S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Brazilian, v.37, p. 280-286, 2008.

DONKIN, S. S.; DOANE, P. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference, 2007. Ft. Wayne. **Proceedings...** The Ohio State University, Michigan State University, Purdue University, p. 97-103, 2007.

DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P. The nutritional value of biodiesel by-products: Parte 2 Glycerine. **Feed Business Asia**, p. 42-43, 2007.

DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A.; KIDD, M.T.; WEBER, T.E.; BREGENDAHL, K. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. **Journal Poultry Science**, v.87, p.317-322, 2008.

DUTRA, M. A.G.; FREITAS, S. G.; VILELA, M. J. A. Participação da família pimelodidae (pisces: Siluriformes) na pesca profissional do reservatório de Porto Primavera, rio paraná (2006-2008). **X Forum Ambiental da Alta Paulista**, v. 10, n. 3, p. 216-224, 2014.

FDA - **Code of Federal Regulations, Title 21**, v.6, n.21, CFR582.1320, 2006.

FISHBASE. Disponível em:< <http://www.fishbase.org/>>. Acesso em 12 de jan. de 2017.

GOMIDES, P. F. V.; LEANDRO, N.S.M.; PAULA, F. G.; ARAÚJO-SANTOS, J. G.; SENA, M. F.; PINTO, A. P. S.; RODRIGUES, F. S. **Desempenho do híbrido pintado amazônico (*P. tigrinum* fêmea x *Leiarius marmoratus* macho) em diferentes densidades de estocagem em viveiros escavados**. In: 49 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012, Brasília-DF. A produo animal no mundo em transformao. Viçosa-MG: RBZ, 2012.

HOLTKAMP, D.; ROTTO, H.; GARCIA, R. Economic cost of major health challenges in large US swine production systems – Part 2. **Swine News**, North Carolina State University, v. 30, n. 4, 2007.

IUPAC. **Compendium of chemical terminology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.1351, 1997. Disponível:

<<http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

- JUNG, B.; BATAL, A.B. Nutritional and feeding value of crude glycerin for poultry. 2. Evaluation of feeding crude glycerin to broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, p. 514-527, 2011.
- KARAM, R. G.; CURY, F. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A. F. Uso da glicerina para a substituição do formaldeído na conservação de peças anatômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, p. 671-675, 2016.
- KATO, T.; HAYASHI, Y.; INOUE, K.; YUASA, H. Glycerol absorption by Na⁺-dependent carrier-mediated transport in the closed loop of the rat small intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 553-555, 2005.
- KERR, B. J.; DOZIER, W. A. Crude glycerin for monogastrics feeds. **Render Magazine**, v.37, p.10-11, 2008.
- KIJORA, C.; BERGNER, H.; KUPSCH, R.D.; HAGEMAN, L. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, 47(4):345-360, 1995.
- LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; HONEYRNAN, M. S.; STALDER, K.; DOZIER III, W. A.; WEBER, T. E.; KIDD, M. T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal Poultry Science**, v.87, p.104-107, 2008b.
- LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; WEBER, T. E.; BREGENDAHL, K.; LONERGAN, S. M.; PRUSA, K. J.; AHN, D. U.; STOFFEGREN, W. C.; HONEYMAN, M. S. Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin supplemented diets. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2962-2970, 2008a.
- LAMMERS, P.; HONEYMAN, M.; KERR, B. J.; WEBER, T. E.; DOZIER, W. A.; KIDD, M. T.; BREGENDAHL, K. Growth and performance of nursery pigs fed crude glycerol. Ames: **Iowa State University Animal Industry Report**, 2007.
- LI, M.H., MINCHEW, C.D., OBERLE, D.F.; ROBINSON, E.H. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish *Ictalurus punctatus*; **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, 2010.
- LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765- 795, 1977.
- LUCA, A. S.; VERANI, N. F.; VELLUDO, M.; Borges, Guilherme Nogueira. **Dieta de *Pseudoplatystoma punctifer* (CASTELNAU, 1855)**, (Siluriformes, Pimelodidae), na Bacia do Rio Teles Pires, Alta Floresta-MT. In: José Eduardo dos Santos; Carolina Joana da Silva; Luiz Eduardo Moschini. (Org.). "Paisagem, Biodiversidade e Cultura". 1ed.São Carlos, SP: Rima, v. 1, p. 293-317, 2012.
- MATEO, F. J.; DELGADO, N.; LOPÉZ, H. Caracterización Morfométrica del Híbrido Yaque Pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*) y sus Progenitores (Siluriformes: Pimelodidae). **Revista Facultad Ciências Veterinárias** v 49, n° 1, p. 47-60, 2008.

- MATOS, P.R.; RAMOS, A.T.; MORON, S.E. Glicerina bruta em dietas de juvenis de tambaqui. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.6, p.1705-1712, 2016.
- MENTEN, J. F. M.; MIYADA, V. S.; BERENCHTEIN, B. Glicerol na alimentação animal. Campinas: **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 101 p, 2008.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. X.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- NEU, D.H.; FURUYA, W.M.; YAMASHIRO, D.; BITTENCOURT, F. MORO, E. B.; FERNANDES, D. R. A. F.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Glicerol na dieta de alevinos de tilápias do Nilo. **Revista Agrarian**, v.5, p.288-294, 2012.
- PEITER, G. C.; ALVES, H. J.; SEQUINEL, R.; BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.5, n.4, p.519-537, 2016.
- PORTALETE, J.C.; ONO, E. A.; RAMOS, A. T.; HELAYEL, M. A.; MORON, S. A. Aspectos reprodutivos do híbrido de *Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma punctifer*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. 2, p 279-286, 2015.
- RAMOS, A. P. S.; BRAGA, L. G. T.; CARVALHO, J. S. O.; OLIVEIRA, J. R.; AZEVEDO, R. V. Digestibilidade de coprodutos agroindustriais para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de 200g. In: 47º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador. **Resumos**. Salvador: UFBA, 2010.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH. B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano X, n. 37, 2007.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; TALMELLI, E.F, de A.; GODINHO, H.M. **Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, Pseudoplatystoma fasciatum (teleostei, siluriformes, pimelodidae), mantidas em cativeiro**. Boletim Instituto Pesca, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 151 - 159, 2003.
- RODRIGUES, F. V.; RONDINA, D. Alternativas de uso de subprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de ruminantes: glicerina bruta. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.91-99, 2013.
- SÁNCHEZ, J. A. M.; MOYETONES, F.; CERDÁZ M. J. Influencia del contenido proteico enel crecimiento de alevines de bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, alimentados com concentrados comerciales. **Zootecnia Tropical** v.27 n°2, p.187-194, 2009.
- SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. **Toxicology Mechanisms Methods**, 13:277-293, 2003.
- SILVA, A.P.; LIMA, A. F.; LUNDSTEDT, L.M. **A pesca e a aquicultura de surubins no Brasil: Panorama e considerações para a sustentabilidade**. Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015.

CAPÍTULO II

Desempenho zootécnico de juvenis de pintado-da-Amazônia alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta

RESUMO

A produção de biodiesel tem sido acompanhada pelo incremento de subprodutos, dentre os quais a glicerina bruta, que vem sendo objeto de inúmeras pesquisas em que se destaca seu uso como fonte energética na alimentação de animais de produção. Este estudo verificou a influência da substituição parcial do milho nível de glicerina bruta em substituição parcial do milho em dietas de juvenis de pintado-da-Amazônia sem interferir no desempenho zootécnico desses animais. O experimento foi executado no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins. Utilizou-se 150 juvenis de pintado-da-Amazônia, com peso inicial de $6,83 \pm 1,11$ (g) e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições (10 animais em cada repetição). O arraçamento ocorreu por um período de 90 dias (30 dias de adaptação e 60 dias experimental), ao final desse período os animais foram contidos para a mensuração dos valores do desempenho zootécnico dos animais (comprimento e peso final, sobrevivência, taxa de crescimento específico, índice hepatossomático, fator de condição, ganho de peso, conversão e eficiência alimentar) e posteriormente, os animais foram insensibilizados no gelo para realização da análise de composição corporal dos peixes, conforme as metodologia padrão descrita pela INCT (2012), foram feitas análises dos 5 tratamentos testados (0,0; 5,0; 7,5; 10 e 12,5%) de glicerina bruta com 5 repetições (referente a cada peixe utilizado). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis). Os parâmetros de desempenho e composição corporal também foram submetidos à análise de regressão linear utilizando o Programa Instat v 3.0 para Windows. Os animais foram alimentados com cinco dietas contendo níveis crescentes de glicerina (0,0 %; 5,0 %; 7,5%; 10,0 % e 12,5%). Durante o período experimental a taxa de sobrevivência foi acima de 80% em todos os níveis testados. Não houve diferenças estatísticas na composição corporal e nos parâmetros zootécnicos, com exceção da taxa de crescimento específico que apresentou um comportamento linear crescente moderado. Sugere-se que a glicerina bruta pode ser incluída em dietas de pintado-da-Amazônia até o nível de 12,5% sem comprometer o desempenho zootécnico e a composição corporal da espécie estudada.

Palavras-chave: ingrediente alternativo, desempenho, nutrição, peletização.

CAPÍTULO II

Zootechnical performance of juveniles of Painted Amazon fed with increasing levels of crude glycerin

ABSTRACT

The production of biodiesel has been accompanied by the increase of by-products, among which crude glycerin, which has been the object of numerous researches in which its use as an energy source in the feeding of production animals is highlighted. This study verified the influence of the partial substitution of maize level of crude glycerin in partial substitution of corn in diets of juveniles of Painted Amazon without interfering in the zootechnical performance of these animals. The experiment was carried out at the Laboratory of Morphophysiology and Biochemistry of Neotropical Fishes of the Federal University of Tocantins. A total of 150 juveniles were used, with initial weight of 6.83 ± 1.11 (g) and length of 10.06 ± 0.57 cm distributed in a completely randomized design (DIC), with 3 replicates (10 animals in each replicate). The feeding occurred for a period of 90 days (30 days of adaptation and 60 experimental days) at the end of this period animals were restrained for measuring the values of the growth performance of animals (final length and weight, survival, specific growth rate, hepatosomatic index, condition factor, weight gain, conversion and feed efficiency) and later, the animals were desensitized in the ice for the analysis of the body composition of the fish, according to the standard methodology described by INCT (2012) of the 5 tested treatments (0.0, 5.0, 7.5, 10 and 12.5%) of crude glycerin with 5 replicates (referring to each fish used). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey's test ($p > 0.05$) and those without normal distribution were submitted to non-parametric analysis (Kruskall Wallis). The parameters of performance and body composition were also submitted to linear regression analysis using the InStat v 3.0 Program for Windows. The animals were fed five diets containing increasing levels of glycerol (0.0%, 5.0%, 7.5%, 10.0% and 12.5%). During the experimental period the survival rate was above 80% at all levels tested. There were no statistical differences in body composition and zootechnical parameters, except for the specific growth rate, which presented a moderate increasing linear behavior. It is suggested that crude glycerin can be included in Amazonian diets up to 12.5% without compromising the zootechnical performance and body composition of the species studied.

Keywords: alternative ingredient, performance, nutrition, pelleting.

1 INTRODUÇÃO

O “pintado-da-Amazônia” é caracterizado por ser um peixe de crescimento rápido e que possui manejo de produção simples na fase de alevinagem. É uma espécie que tolera bem o cultivo intensivo, resiste a baixas concentrações de oxigênio e possui ótimo rendimento de carcaça, o que é bastante favorável ao atendimento do mercado consumidor (BARBOSA et al., 2015).

A alimentação é uma das partes mais onerosas da aquicultura, geralmente representa de 40 a 80% do custo de produção (KUBTIZA, 2009). Na tentativa de reduzi-lo, intensificaram-se os estudos voltados à avaliação de alimentos alternativos e subprodutos industriais. Portanto, é importante conhecer o valor nutricional dos alimentos que compõe uma dieta balanceada, visando o atendimento das exigências mínimas dos animais quanto ao teor de proteínas, carboidratos e energia (NEU et al., 2012).

Dentre os ingredientes alternativos o glicerol, oriundo da indústria do biodiesel tem sido indicado por sua biodisponibilidade e baixo custo (OOI et al., 2004). Foi proposto como fonte energética potencial para suínos (LAMMERS et al., 2008a), aves (LAMMERS et al., 2008b) e peixes (BALEN et al., 2014; MEURER et al., 2012; NEU et al., 2012).

No entanto, para peixes, o conhecimento sobre a inclusão da glicerina bruta nas dietas ainda é considerado incipiente, com alguns resultados descritos para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Li et al., 2010), tilápias do Nilo (NEU et al., 2012; NEU et al., 2013) e tambaqui (MATOS, 2016). Portanto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o desempenho e a composição corporal de juvenis de “pintado-da-Amazônia” alimentados com rações contendo diferentes níveis de inclusão de glicerol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins – UFT, Campus de Araguaína – TO, no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, no período de janeiro a abril de 2017. Seguindo as normas éticas previstas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, sob o processo de nº (23101.005896/2016-56), da Universidade Federal do Tocantins.

Foram utilizados 150 juvenis de “pintado-da-Amazônia” (Figura 1), peso inicial médio de $6,44 \pm 0,89$ g e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm; distribuídos em 15 caixas de fibra com capacidade de 1000 litros, com fluxo constante de água. Foram testados cinco tratamentos com

três repetições (caixas de fibra) e 10 animais por unidade experimental. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC).

Figura 1 Híbrido “Pintado-da-Amazônia”



Fonte: Acervo pessoal

A dietas foram formuladas para serem isoprotéicas e isoenergéticas e as exigências nutricionais foram atendidas segundo Almeida (2014). Os tratamentos consistiram de cinco rações experimentais; sendo quatro com níveis de inclusão (5,0 %, 7,5 %, 10,0 %, e 12,5%) de glicerina bruta em substituição parcial do milho e um tratamento controle como referência - sem inclusão de glicerina (Tabela 1).

Tabela 1 Composição percentual e química das rações experimentais com diferentes níveis de glicerina bruta para juvenis de “pintado-da-Amazônia”.

INGREDIENTES	Níveis de inclusão				
	0	5%	7,5%	10%	12,5%
Farina de vísceras	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00
Farelo de Soja	21,43	22,45	22,96	23,47	23,98
Farinha de penas	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Farelo de milho	18,56	12,54	9,53	6,52	3,51
Glicerina bruta	0,00	5,00	7,50	10,00	12,50
Núcleo ¹	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Atendimento				
Cálcio (%)	2,69	2,69	2,69	2,69	2,69
Energia bruta (Kcal/kg)	4630	4626	4623	4621	4619
Energia digestível (Kcal/kg)	1,36	1,38	1,39	1,40	1,41
Extrato etéreo (%)	9,02	8,82	8,72	8,62	8,52
Proteína bruta (%)	42,00	42,00	42,00	42,00	42,00
Fibra bruta (%)	2,02	1,96	1,93	1,90	1,87
Fósforo total (%)	1,63	1,62	1,62	1,61	1,61
Lisina total (%)	2,59	2,61	2,62	2,62	2,63
Metionina total (%)	0,80	0,79	0,79	0,79	0,79

¹Níveis de micronutrientes por quilograma do produto: ácido fólico 20,25mg; antioxidante 66,15mg; cobalto 33,75mg; cobre 337,50mg; ferro 337,50mg; iodo 50,62mg; manganês 1350,00mg; metionina 1,20mg; pantotenato decálcio 315,56mg; selênio 10,12mg; sódio 55,58mg; tirosina 810,00mg; vit. A 216.000U.I/kg; vit. B1 45,56mg; vit. B2 135,00mg; vit. B6 67,50 mg; vit. D3 50.625,00UI/kg; vit. E 506.25UI/kg; vit. H 2.70mg; vit. K3 50,62mg; vit. B12 675.00mcg; zinco 3375,00mg.

Os ingredientes foram peletizados em moedor de carne e secas em estufa com circulação e renovação de ar à 55°C. Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia (8h e 17h) até a saciedade aparente por um período de 90 dias de experimento, sendo 30 dias de adaptação.

A sifonação das caixas era realizada todos os dias (15h) e os parâmetros de qualidade da água como pH, oxigênio, temperatura e amônia foram aferidos semanalmente.

Após o período experimental, os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato gastrointestinal. Foram selecionados cinco animais de cada unidade experimental que foram contidos para a realização da biometria de comprimento (através de paquímetro) e peso (balança de alta precisão) para obtenção dos dados de desempenho zootécnico propostos por Fracalossi e Cyrino (2013).

Os índices foram utilizados para verificar se o alimento testado interfere negativamente ou positivamente no desempenho e condições de saúde dos animais.

2.1 Composição corporal

Posteriormente a obtenção dos dados de desempenho zootécnico os animais foram insensibilizados no gelo e em seguida realizou-se a análise de composição corporal dos peixes conforme a metodologia padrão descrita pelo INCT/ Detmann et al. (2012). Foram feitas análises dos 5 tratamentos testados (0,0 %, 5,0 %, 7,5 %, 10,0 %, e 12,5%) de glicerina bruta com 5 repetições (referente a cada peixe utilizado).

2.2 Desempenhos zootécnicos avaliados

A sobrevivência (SOB%) – foi calculada por meio da equação:

$$\text{SOB (\%)} = \text{nf} / \text{ni} \times 100 \quad (1)$$

Onde: nf = Número final de animais

ni = Número inicial de animais

Taxa de Crescimento Específico (TCE) – crescimento diário dos animais, obtido em porcentagem. Para este cálculo, utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{TCE (\% dias)} = (\ln \text{pf} - \ln \text{pi}) / t \times 100 \quad (2)$$

Onde: ln pf = Logaritmo do peso final

ln pi = Logaritmo do peso inicial

t = tempo

Índice Hepatosomático (IH) – É a relação entre o peso total do fígado e o peso total do peixe. Este índice é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IH} = \text{peso do fígado (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100 \quad (3)$$

Ganho de Peso (GP) – É o peso final do animal subtraído pelo peso inicial. Esse cálculo é obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{GP} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)} \quad (4)$$

Fator de condição (FC) – O fator de condição é o parâmetro que mede indiretamente o estado fisiológico do animal, em relação às reservas energéticas armazenadas, tais como glicogênio hepático e gordura corporal. Para sua determinação, usou-se a seguinte fórmula:

$$FC = \text{massa (g)} / \text{comprimento total (cm)} \quad (5)$$

Conversão alimentar aparente (CAA) – equivale à quantidade de ração necessária para o animal ganhar 1 kg de peso vivo:

$$CAA = \text{ração consumida (g)} / (\text{peso final} - \text{peso inicial}) \quad (6)$$

Eficiência alimentar (EA) – trata-se do ganho de peso médio por peixe no grupo, dividido pelo consumo médio de ração por peixe. Ou seja, a eficiência que o animal teve para converter a ração consumida em peso vivo:

$$EA = \text{ganho de massa (g)} / \text{quantidade de ração ingerida (g)} \times 100 \quad (7)$$

2.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), utilizando o Programa Instat v 3.0 para Windows e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os parâmetros de desempenho e composição corporal também foram submetidos à análise de regressão linear (gráficos apresentados no apêndice).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios para os parâmetros de qualidade da água registrados durante o período experimental estão expostos na (Tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros de qualidade da água durante o período experimental.

PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA	GLICERINA BRUTA (%)					CV%
	0%	5%	7,50%	10%	12,50%	
pH	6,2 ± 0,08	6,2 ± 0,09	6,2 ± 0,09	6,2 ± 0,11	6,2 ± 0,01	0,25
O ₂ dissolvido (mg/L)	8,0 ± 1,03	8,0 ± 0,99	8,0 ± 0,78	8,0 ± 0,69	8,0 ± 0,69	1,96
Temperatura (°C)	27,1 ± 0,74	27,0 ± 0,63	27,1 ± 0,67	27,2 ± 0,61	26,8 ± 0,59	0,22
Amônia (mg/L)	0	0	0	0	0	-

Valores seguidos de médias e desvios padrões.

No que se refere às variáveis ambientais quantificadas durante o experimento, não foi identificado diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). Todos os parâmetros analisados mantiveram-se dentro dos padrões que são recomendados para o cultivo de peixes de clima tropical (CAMPOS, 2010; RODRIGUES, 2013), esse resultado provavelmente está estritamente ligado a constante renovação da água. Os parâmetros zootécnicos dos juvenis “pintado-da-Amazônia”, analisados no presente estudo estão demonstrados na (Tabela 3).

Tabela 3 Parâmetros zootécnicos do híbrido “pintado-da Amazônia”, alimentados com inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na ração.

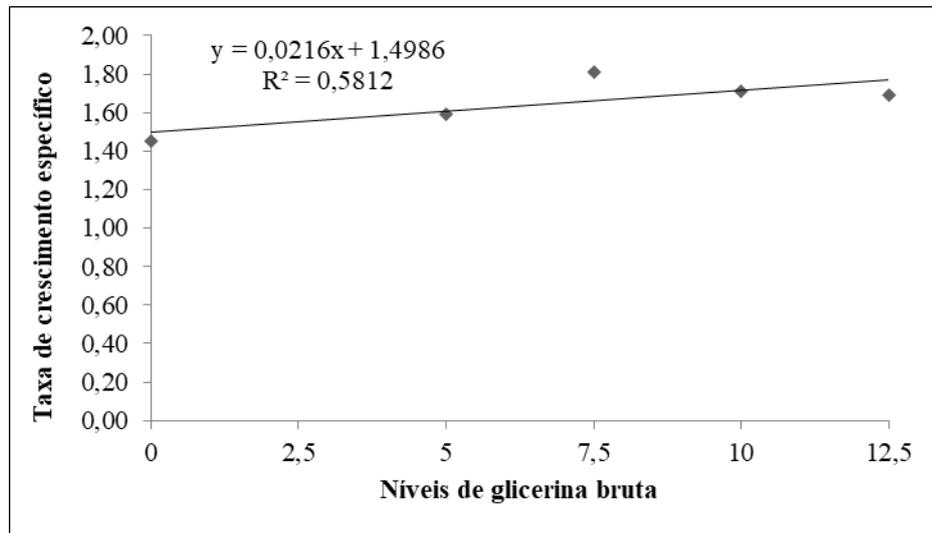
PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	GLICERINA BRUTA (%)					CV%
	0%	5%	7,50%	10%	12,50%	
CF (cm)	16,66 ± 1,35	17,36 ± 1,59	18,23 ± 0,51	15,86 ± 1,41	16,83 ± 1,25	2,46
PF (g)	27,66 ± 7,00	26,66 ± 5,10	35,62 ± 3,26	28,06 ± 7,06	28,73 ± 5,34	4,21
SO (%)	96,66 ± 5,77	93,33 ± 11,54	83,33 ± 28,86	96,66 ± 5,77	96,66 ± 5,77	10,71
TCE (%) ¹	1,45 ± 0,39	1,59 ± 0,16	1,81 ± 0,39	1,71 ± 0,40	1,68 ± 0,37	6,31
IH (%)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03	0,01 ± 0,04	13,06
FC (g/cm)	1,63 ± 0,32	1,62 ± 0,13	2,22 ± 0,08	1,75 ± 0,28	1,69 ± 0,21	5,64
GP (%)	20,20 ± 7,44	21,46 ± 2,21	33,86 ± 2,38	22,06 ± 7,70	22,33 ± 6,42	11,36
CAA	2,58 ± 0,63	3,01 ± 1,26	1,72 ± 0,19	3,50 ± 1,23	2,68 ± 0,53	16,54
EA (%)	4,06 ± 1,13	3,90 ± 2,13	5,84 ± 0,72	3,13 ± 1,24	4,00 ± 1,25	12,29

Valores seguidos de médias e desvios padrões. CF = comprimento final; PF = peso final; SO = sobrevivência; TCE = taxa de crescimento específico; IH= índice hepatossomático; FCI = fator de condição inicial; FCF = fator de condição final; GP = ganho de peso; CAA = conversão alimentar aparente; EA= eficiência alimentar. ¹ Efeito linear $y = 0,0216x + 1,4986$ $R^2 = 0,5812$.

Na comparação dos índices zootécnicos, observou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos para as análises de comprimento final, peso final, sobrevivência, índice hepatossomático, fator de condição, ganho de peso, conversão e eficiência alimentar.

No entanto, a taxa de crescimento específico dos animais foi influenciada pelos níveis de glicerina bruta apresentando um comportamento linear crescente moderado em comparação com a dieta controle (Gráfico 1).

Gráfico 1 Regressão Linear da Taxa de crescimento específico de juvenis de pintado-da Amazônia



Balen et al. (2017) também observaram que a TCE de juvenis de curimatá (*Prochilodus lineatus*) foi influenciado pela glicerina bruta (0, 4, 8,12, 16 e 20%). Neste estudo, a dieta de 4% promoveu os maiores valores, seguida do tratamento sem adição de glicerina, e os menores valores foram obtidos com a dieta 20% de inclusão.

Neu et al. (2013) relataram que não foram observadas nenhuma diferença no desempenho de crescimento de juvenis de tilapia do Nilo alimentadas com diferentes níveis (0, 25, 50, 75 e 100⁻¹ g kg) de glicerol dietético. Li et al. (2010) mostraram que o uso de até 10% de glicerol dietético para peixe-gato de canal (*Ictalurus punctatus*) não causou mudanças no ganho de peso, eficiência de alimentação, índice hepatossomático e sobrevivência. No entanto, a inclusão de 15 e 20% de glicerol na dieta de bagres do canal afetou negativamente seu desempenho de crescimento.

Fernandes et al. (2016), ao testar a inclusão de glicerol (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10%) na alimentação de larvas de carpa comum observou diferença estatística em todos os parâmetros zootécnicos analisados (peso final, comprimento final, sobrevivência, ganho em peso, taxa de crescimento específico e fator de condição) e a inclusão de 10% de glicerol apresentou os melhores resultados zootécnicos, porém o mesmo tratamento apresentou os piores resultados de sobrevivência.

O comprimento dos animais foi relativamente próximo, variando de 15,86 cm a 18,23 cm nos tratamentos com 10% inclusão de glicerol e com 7,5% de adição do produto, respectivamente. Um fator que pode ter influenciado a não diferenciação estatística dos valores

de comprimento e peso final é que os peixes do atual estudo receberam, mesmo com os níveis crescentes de glicerina bruta nas rações, dietas isoprotéicas e isoenergéticas.

No presente estudo a taxa de sobrevivência em todas as dietas testadas foram superiores a 80%. Esses resultados se mantiveram próximos dos valores descritos por Gonçalves et al. (2015) e Moesch et al. (2016) para juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de glicerol.

Em contraste com este resultado Neu et al. (2012) verificaram que a sobrevivência de alevinos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi mais elevada no tratamento que não continha glicerol. As maiores taxas de mortalidade de acordo com o autor foram nos dois menores níveis testados, o de 7,5% seguido pelo de 2,5%. Portanto, as diferenças de espécies e fase de desenvolvimento podem influenciar a resposta do metabolismo animal a adaptação a glicerina na dieta.

Segundo o autor supracitado a fase de desenvolvimento dos animais utilizados na pesquisa pode ter sido preponderante para elevada taxa de mortalidade, no entanto, outros fatores podem ter contribuído para que isso ocorresse, dentre eles a temperatura e a própria fonte alimentar testada.

O índice hepatossomático pode ser alterado dado a grande importância do metabolismo energético no fígado do peixe, uma vez que a deposição hepática de lipídios, bem como de glicogênio, é comum. No entanto, no presente estudo este índice não apresentou alteração nas funções metabólicas do fígado, mesmo diante dos diferentes níveis de glicerina bruta. Moesch et al. (2016) ao testar a influência e o melhor nível de substituição do milho pelo glicerol bruto (0, 20, 40, 60, 80 e 100%) em rações para alevinos de tilápia do Nilo, observou diferença significativa para o índice hepatossomático.

O fator de condição consiste em um importante indicador do grau de hígidez de um indivíduo, onde seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, possibilitando relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies (GOMIERO et al., 2010).

Esse parâmetro não foi influenciado pela dieta testada neste estudo, tendo em vista que não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Neu et al. (2013) também não identificou diferença significativa no fator de condição de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes níveis de glicerol.

O ganho de peso não apresentou variação entre os tratamentos ($P > 0,05$). Esse resultado corrobora com o descrito por Matos et al. (2016) e Neu et al. (2012) que também não verificaram alteração nesta variável para tambaqui e tilápia do Nilo, respectivamente. No

entanto, Balen et al. (2017) observaram influência dos níveis de glicerina na dieta sobre o ganho de peso de juvenis de *P. lineatus*, estes autores relatam que a medida que os níveis de inclusão da glicerina bruta aumentavam, o ganho de peso diminuía para esta espécie.

Assim, como os resultados encontrados por Matos (2016), a conversão e eficiência alimentar analisados neste trabalho não foram influenciados pelas dietas analisadas. Neu et al. (2012) apesar de também não terem verificado diferença estatística para CCA, observou que esses valores foram consideravelmente altos para tilápias na fase larval, e que dependendo das condições ambientais ou da fase fisiológica em que se encontra a espécie esse parâmetro pode ser influenciado.

A glicerina bruta também tem sido estudada em outras espécies de monogástricos e os resultados encontrados nestes trabalhos colaboram com os encontrados no presente estudo. Berenchtein et al. (2010) concluíram que o glicerol pode ser utilizado como ingrediente energético em rações para suínos em crescimento e terminação, em níveis de até 9%, pois não influenciou no desempenho, nas características de carcaça e na qualidade da carne.

Freitas et al. (2017), ao analisar a glicerina na dieta de frangos de corte observou que o a glicerina pode ser adicionada até o nível de 5% sem provocar efeitos sobre o desempenho, a umidade da liteira e o rendimento da carcaça.

Na alimentação de ruminantes, Cruz et al. (2014) ao substituir 160 g de glicerina/ kg de milho na MS da dieta de bovinos, o que corresponde a 16% de utilização, verificou que não houve alterações no desempenho animal, eficiência alimentar e digestibilidade aparente da dieta, quando comparados ao grupo controle (que não recebeu a glicerina na dieta).

Borges et al. (2013) observou que, para caprinos de corte, a inclusão de glicerina bruta em substituição ao milho, em quatro níveis, (0,0, 0,5, 10,0 e 15,0%) na MS da dieta pode ser uma alternativa alimentar, sem prejudicar o consumo animal.

Os resultados referentes a análise de composição corporal de juvenis de pintado-da-Amazônia (teores de umidade, cinzas e proteína bruta) estão apresentados na (Tabela 4).

Tabela 4 Composição corporal do híbrido “pintado-da Amazônia”, alimentados com inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na ração.

COMPOSIÇÃO	GLICERINA BRUTA (%)					CV%
	0%	5%	7,50%	10%	12,50%	
Úmidade (%)	77,39 ± 3,02	73,53 ± 6,5	73,91 ± 4,79	80,68 ± 4,27	73,71 ± 4,10	1,68
Cinzas (% MN)	2,88 ± 0,51	3,85 ± 0,96	3,17 ± 0,78	2,72 ± 0,84	3,48 ± 0,50	6,28
Proteína Bruta (% MN)	14,29 ± 2,33	15,30 ± 4,47	14,74 ± 3,10	12,46 ± 1,68	16,06 ± 2,20	7,44

Valores seguidos de médias e desvios padrões.

A composição corporal dos juvenis de pintado-da-Amazônia não foi influenciada pela substituição parcial do milho pela glicerina bruta. Visto que, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos em nenhum dos índices analisados.

Assim, como no presente estudo Neu et al. (2013) na avaliação corporal de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com glicerol bruto não verificaram diferenças estatísticas ($P>0,05$) para umidade, cinzas e proteína bruta. Porém, a deposição de lipídios foi influenciada pela dieta contendo glicerol, onde apresentaram os valores mais altos em peixes alimentados com 50 g kg^{-1} de glicerol e os mais baixos em peixe alimentado com 100 g kg^{-1} .

Moesch et al. (2016) observaram em alevinos de tilápia do Nilo alimentados com glicerol bruto um aumento da deposição proteica e da umidade do corpo inteiro e a diminuição da matéria mineral e do extrato etéreo, o qual apresentou valor mínimo em 72% de substituição.

Os autores supracitados destacam que a maior deposição de proteína e a menor deposição de lipídios confirma os efeitos do glicerol sobre o metabolismo energético. Onde a utilização de carboidratos e lipídios é intensificada como fonte de energia resultando na economia da proteína dietética, a qual pode se depositar nos tecidos corporais dos peixes. Já a diminuição do teor de matéria mineral, estaria associada ao fato das análises de carcaça terem sido realizadas utilizando o peixe inteiro, influenciando os níveis de matéria mineral da composição corporal. A umidade por sua vez mesmo tendo apresentado uma elevação em seu teor, permaneceu dentro da faixa observada por outros autores.

Em outros monogástricos como suínos em terminação, Melo et al. (2014) verificaram que a glicerina bruta (50, 100, 150 e 200g/kg) também não influenciou os valores de umidade, cinzas, proteína. Em ruminantes, Lage et al. (2009) observou que apesar dos diferentes níveis de glicerina bruta (0, 3, 6, 9 e 12%) na dieta de cordeiro em terminação não influenciaram os teores de umidade e cinzas, os teores de proteína bruta foram reduzidos.

4 CONCLUSÃO

A inclusão da glicerina bruta até o nível de 12,5% em dietas de juvenis pintado-da-Amazônia não prejudica o desempenho zootécnico e a composição corporal da espécie estudada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. R. **Desempenho de juvenis de pintado-da-Amazônia (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Leiarius marmoratus*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína.** 2014. 40 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014.
- BALEN, R. E.; JUNIOR, G. B.; COLPINI, L. M. S.; BOMBARDELLI, R.A.; SILVA, L.C.R.; MEURER, F. Energia digestível e inclusão da glicerina bruta em dietas para juvenis de curimatá. **Boletim do Instituto de Pesca.** São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-357, 2017.
- BALEN, R. E.; TETU, P. N.; BOMBARDELLI, R.A.; POZZA, P.C.; MEURER, F. Digestible energy of crude glycerol for pacu and silver catfish. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1448-1451, 2014.
- BARBOSA, P. T. L.; PEREIRA, G. R.; MENDES, B. V.; PORTO, E. P. J.; PIRES, T. B. **Sistema de Produção de Pintado amazônico: caracterização das variáveis químicas da água.** XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA-ZOOTEC 2015. Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia Fortaleza – CE, 2015.
- BERENCHTEIN, B.; COSTA, D. B. B.; ALMEIDA, V. V.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V.S. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1491-1496, 2010.
- BORGES, G. D. S.; MACEDO, V. P. M.; MAEDA, E. M.; SILVEIRA, F. A. L.; LUZ, P. A. S. Influência da substituição do milho por glicerina bruta no consumo de caprinos de corte. **Synergismus scyentifica**, UTFPR, Pato Branco, v. 08, 2013.
- CAMPOS, J. L. **O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos.** In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2ª ed., p. 335-361, 2010.
- CRUZ, O. T. B.; VALERO, M.; ZAWADZKI, F.D.; CRIVAROLI, R. M.; PRADO, B. S.; LIMA.; PRADO, I. N. Effect of glycerine and essential oils (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*) on animal performance, feed efficiency and carcass characteristics of crossbred bulls finished in a feedlot system. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 4, p. 790-797, 2014.
- DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. **Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal.** Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012.
- FRACALOSS, D. M., A. P.; J. E. P. CYRINO. **Nutriaqua - Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira.** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 1 ed., 375p. 2013.

FERNANDES, D.R.A.; YAMASHIRO, D.; PESSINI, J. E; BITTENCOURT, F. WILSON ROGÉRIO BOSCOLO; NEU, D.H. Glicerol na Dieta de Larvas de Carpa Comum (*Cyprinus carpio*). **UNICIÊNCIAS**, v. 20, n. 1, p. 61-65, 2016.

FREITAS, L. W.; MENTEN, J. F. M.; ZAVARIZE, K. C, PEREIRA, R.; ROMANO, G. G.; LIMA, M. B.; DIAS, C. T. S. Evaluation of Dietary Glycerin Inclusion During Different Broiler Rearing Phases. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 19, p. 91-96, 2017.

GANECO, L. N.; LIMA, A. F.; VARELA, E. S.; ALVES, A. L.; TORATI, L. S.; LUNDSTEDT, L. M. **Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Desenvolvimento embrionário do híbrido “Pintado-da-Amazônia” (fêmea *Pseudoplatystoma punctifer* x macho *Leiarius marmoratus*), 2011.

GOMIERO, L. M.; VILLARES-JUNIOR, G. A.; BRAGA F. M. S. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 101-105. 2010.

GONÇALVES, L. U. et al. Crude glycerin as dietary energy source for Nile tilapia. **Aquaculture, Amsterdam**, v. 437, p. 230-234, 2015.

KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v.19, nº111, 2009.

LAGE, J. F; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; MONNERAT, J. P.I. S.; SOUZA, N. K. P.; FILHO, S.C.V. **Composição química da carne de cordeiros alimentados com glicerina bruta na fase de terminação**. In: 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá-PR, UEM, 2009.

LAMMERS, P. J. et al. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.86, p.602-608, 2008a.

LAMMERS, P.J. et al. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Poultry Science**, v.87, p.104-107, 2008b.

Li, M.H. MINCHEW, C.D.; OBERLE, D.F.; ROBINSON, E.H. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.41, n.1, p.130-136, 2010.

MATOS, P.R.; RAMOS, A.T.; MORON, S.E. Glicerina bruta em dietas de juvenis de tambaqui. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.6, p.1705-1712, 2016.

MELO, D.S.; FARIA, P.B.; CANTARELLI, V.S.; ROCHA, M.F.M.; PINTO, A.M.B.G.; RAMOS, E.M. Qualidade da carne de suínos com uso de glicerina na alimentação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.583-592, 2014.

MEURER, F. *et al.* Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, v.43, p.1734-1737, 2012.

MOESCH, A.; VOLKWEIS, M.I.; CARNEIRO, Z.W. F.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D. Growth, body composition and hepatopancreas morphology of Nile tilapia fingerlings fed crude glycerol as a replacement for maize in diets. **Animal Feed Science and Technology**, Volume 219, 122 – 131, 2016.

NEU, D.H.; FURUYA, W.M.; BOSCOLO, W.R.; POTRICH, F.R.; LUI, T.A.; FEIDEN, A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v.19, p.211-217, 2013.

NEU, D.H.; FURUYA, W.M.; YAMASHIRO, D.; BITTENCOURT, F. MORO, E. B.; FERNANDES, D. R. A. F.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Glicerol na dieta de alevinos de tilápias do Nilo. **Revista Agrarian**, v.5, p.288-294, 2012.

OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue: a rich source of glycerol and medium chain triglycerides. **Journal of Oleo Science.**, v.53, n.1, p.29-33, 2004.

RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Editores Técnicos: Brasília – DF: Embrapa, 440 p, 2013.

CAPÍTULO III

Parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de “pintado-da-Amazônia” alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta.

RESUMO

O presente estudo objetivou estabelecer os valores hematológicos e bioquímicos de juvenis de “pintado-da-Amazônia” após alimentação com ração contendo níveis crescentes de glicerina bruta. O experimento foi executado no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, utilizou-se 150 juvenis de pintado-da-Amazônia, com peso inicial de $6,83 \pm 1,11$ (g) e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições (10 animais em cada repetição). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), utilizando o Programa InStat v 3.0 para Windows. Os animais foram alimentados com cinco dietas experimentais contendo níveis crescentes de glicerina (0%; 5%; 7,5%; 10% e 12,5%). O arraçamento ocorreu por um período de 90 dias (30 dias de adaptação e 60 dias experimental) e ao final desse período, foram selecionados aleatoriamente 15 animais de cada tratamento para a coleta de sangue realizada por punção caudal, utilizando seringas e agulhas banhadas em EDTA, posteriormente os animais foram sacrificados por secção medular. Os parâmetros hematológicos determinados foram: hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos e os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média). Para a análise bioquímica foram coletadas amostras de plasma para determinação da concentração de proteínas totais, colesterol total, triglicérides, enzima aspartato amino transferase (AST) e enzima alanina amino transferase (ALT). Para quantificação da concentração de glicose sanguínea utilizou-se o aparelho de glicosímetro portátil One Touch Ultra2 (leitura entre 20 e 600 mg/dL) com fitas descartáveis e próprias para o aparelho. O glicogênio hepático e muscular foi determinado de acordo com técnica descrita por Bidinotto et al. (1997). De todos os índices avaliados apenas o glicogênio muscular no nível de 12,5% apresentou diferença estatística ($P > 0,05$), apresentando menor concentração quando comparado ao animais alimentado com a dieta controle (0,0%). Por fim, os juvenis de pintado-da-Amazônia são capazes de metabolizar a glicerina bruta até o nível de 10,0%. Visto que, até esse nível não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do animal.

Palavras-chave: aquicultura, hematologia, reserva energética, perfil metabólico.

CAPÍTULO III

Hematological and biochemical parameters of juveniles “painted of Amazon” fed with increasing levels of crude glycerin.

ABSTRACT

The present study aimed to establish the hematological and biochemical values of juveniles of "Painted Amazonia after feeding with rations containing increasing levels of crude glycerin. The experiment was carried out at the Neotropical Fish Morphophysiology and Biochemistry Laboratory of the Federal University of Tocantins, 150 juveniles of Amazonian Paints, with initial weight of 6.83 ± 1.11 (g) and length of $10,06 \pm 0.57$ cm distributed in a completely randomized design (DIC), with 3 replicates (10 animals in each replicate). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey's test ($p > 0.05$) and those without normal distribution were submitted to non-parametric analysis (Kruskal Wallis) using the InStat Program v 3.0 for Windows. The animals were fed five experimental diets containing increasing levels of glycerol (0%, 5%, 7.5%, 10% and 12.5%). The feeding occurred for a period of 90 days (30 days of adaptation and 60 experimental days) and at the end of this period, were randomly selected 15 animals per treatment for blood collection performed by puncturing rate, using syringes and plated needles EDTA, later the animals were sacrificed by medullary section. The haematological parameters were: hematocrit, hemoglobin, erythrocyte count and hematimetric indexes: VCM (mean corpuscular volume), HCM (mean corpuscular hemoglobin) and CHCM (mean corpuscular hemoglobin concentration). For the biochemical analysis, plasma samples were collected to determine the concentration of total proteins, total cholesterol, triglycerides, aspartate amino transferase enzyme (AST) and alanine amino transferase (ALT) enzyme. To quantify the blood glucose concentration was used the apparatus portable glucometer One Touch ULTRA2 (reading between 20 and 600 mg / dL) and to disposable tapes themselves to the machine. The hepatic and muscular glycogen was determined according to a technique described by Bidinotto et al. (1997). Of all the indexes evaluated, only muscle glycogen at the 12.5% level presented a statistical difference ($P > 0.05$), presenting a lower concentration when compared to the nests fed with the control diet (0.0%). Finally, the juveniles of Painted Amazonian are able to metabolize the crude glycerin up to the level of 10.0 %. Thus, up to this level no significant changes were observed in the haematological and biochemical parameters of the animal.

Keywords: aquaculture, hemat ology, energy reserve, metabolic profile.

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem alcançado desenvolvimento proeminente nos últimos anos, diferente do que se tem visto na pesca extrativista (COSTA et al., 2015). O híbrido “pintado-da-Amazônia”, obtido através do cruzamento entre cachara (*Pseudoplatystoma spp.*) e jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*) tem se destacado na piscicultura por apresentar um rápido crescimento e ser um peixe de produção simples na fase de alevinagem (BARBOSA et al., 2015). Além disso, é considerado organoléptico e possui ótimo rendimento de carcaça; característica favorável ao atendimento do mercado consumidor (BARBOSA et al., 2015).

No entanto, sabe-se que a alimentação é uma das partes mais onerosas da aquicultura, representando cerca de 40 a 80% dos custos totais da produção (KUBTIZA, 2009). Estudos sobre a adição de glicerol bruto na alimentação animal são estimulados pela potencialidade de se reduzir os custos da dieta por conta da grande oferta deste subproduto no mercado global (MOESCH et al., 2016).

O glicerol desempenha um papel fundamental no metabolismo como componente estrutural importante dos triglicerídeos e fosfolípidos, proporcionando energia nas vias glicolíticas e ácidos carboxílicos (MOESCH et al., 2016). A determinação da exigência nutricional baseia-se no teste de desempenho, em diferentes períodos ambientais, que uma vez associada ao claro conhecimento da resposta hematológica, para diferentes dietas, pode ser útil para novas formulações (GERHANOVICH; KISELEV, 1993).

A constituição bioquímica do sangue também é uma ferramenta imprescindível na avaliação e monitoramento da condição nutricional e metabólica em grupos de animais, fornecendo importantes informações com relação ao estado clínico, metabólico e produtivo de um animal (GONZÁLEZ et al., 2000).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes níveis de glicerol bruto na dieta sobre os parâmetros eritrocitários (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos e os índices hematimétricos) e bioquímicos (glicose, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, enzima aspartato amino transferase (AST), enzima alanina amino transferase (ALT), glicogênio hepático e muscular do “pintado-da-Amazônia”).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins – UFT, Campus de Araguaína – TO. Conduzido no Laboratório Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, no período de janeiro de 2017 a abril de 2017.

Foram utilizados 150 juvenis de “pintado-da-Amazônia” com peso inicial total médio de $6,83 \pm 1,11$ (g) e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm distribuídos em 15 caixas de fibra com capacidade de 1000 litros (cinco tratamentos e três repetições e 10 animais por caixa d’água), com fluxo constante de água.

O delineamento experimental utilizado foi o casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), utilizando o Programa Instat v 3.0 para Windows. O protocolo para este experimento foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, processo nº (23101.005896/2016-56), da Universidade Federal do Tocantins.

Os tratamentos consistiram de cinco rações experimentais; sendo quatro com níveis de inclusão (5; 7,5; 10 e 12,5%) de glicerina bruta em substituição parcial do milho e um tratamento controle como referência (sem inclusão de glicerina). Todas as dietas foram formuladas de forma a proporcionar uma ingestão diária isoprotéica e isoenergética.

Os ingredientes foram peletizados em moedor de carne e secas em estufa com circulação e renovação de ar à 55°C. Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia (8h00 e 17h00) até a saciedade aparente por um período de 90 dias de experimento, sendo 30 de adaptação. A sifonação das caixas era realizada todos os dias (15h).

2.1 Parâmetros hematológicos

Para as análises hematológicas, foram selecionados aleatoriamente quinze indivíduos de cada tratamento. A coleta do sangue foi realizada por punção caudal, utilizando seringas e agulhas banhadas em Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético - EDTA e, em seguida, foram insensibilizados no gelo.

Sub-amostras de sangue foram utilizadas imediatamente para a determinação do hematócrito - Htc (técnica de microhematócrito, segundo Wintrobe (1929), hemoglobina-Hb (método de cianometahemoglobina, segundo Drabkin (1948) e contagem de eritrócitos - RBC em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente o formol citrato. Os índices

hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), foram também avaliados.

Para os índices hematimétricos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Volume Corpuscular Médio (VCM): o VCM ajuda na observação do volume dos eritrócitos. Para realização de seu cálculo serão utilizados os valores do hematócrito e a contagem de eritrócitos:

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = (\text{Hct} \times 10) / \text{RBC}$$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): o HCM é a concentração da hemoglobina por eritrócitos. Para o cálculo foram utilizados os valores de hemoglobina total e a contagem de eritrócitos:

$$\text{HCM (pg)} = (\text{Hb} \times 10) / \text{RBC}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM): a concentração de hemoglobina dentro do eritrócito é calculada pelo CHCM. Para o cálculo foram utilizados os valores da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e do Volume Corpuscular Médio (VCM):

$$\text{CHCM (d/L}^{-1}\text{)} = (\text{HCM} \times 100) / \text{VCM}$$

Foram confeccionadas lâminas de distensão sanguínea para contagem total e diferencial de leucócitos (Lc) e contagem total de trombócitos (Tr) coradas com kit PANÓTICO, segundo metodologia recomendada por Ranzani-Paiva et al. (2013).

2.2 Análises dos parâmetros bioquímicos

O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do plasma e usado para análises bioquímicas. Analisou-se proteínas totais, colesterol total, triacilglicerol, enzima Aspartato Amino Transferase (AST) e enzima Alanina Amino Transferase (ALT) através do Kit Labtest e leituras realizadas com espectrofotometria. O colesterol total foi lido a uma absorvância de 500 nm, proteínas totais à 545 nm, triglicérides à uma absorvância de 510 nm, AST e ALT a 340 nm em aparelho de espectrofotometria.

Para quantificação da concentração de glicose sanguínea utilizou-se o aparelho de glicosímetro portátil One Touch Ultra2 (leitura entre 20 e 600 mg/dL) com fitas descartáveis e próprias para o aparelho. Cerca de 1 a 5 μ L de sangue foi colocado na fita, após o monitor ligar automaticamente, esperou-se 5 segundos para realização da quantificação da concentração de glicose sanguínea em mg/dL.

Para determinação do glicogênio hepático e muscular utilizou-se a técnica descrita por Bidinotto et al. (1997) As amostras de fígado (100 mg de tecido) e músculo (200 mg de tecido) foram descongeladas e transferidas para um tubo de ensaio com aproximadamente para 1,0 mL de KOH 6,0N e incubado por 2 a 4 minutos em banho-maria a 100°C. Após a dissolução dos tecidos, a solução foi levemente agitada para dissolução completa, em seguida foi transferido 200 μ L deste extrato para um tubo contendo 3 ml de etanol P.A. e então novamente agitado em vórtex por 30 segundos. Posteriormente foi adicionado 100 μ L de K₂SO₄ 10 % e homogeneizado em vórtex por 30 segundos. A amostra foi então centrifugada a 3.000 rpm por 3 minutos e sobrenadante descartado por inversão e o precipitado ressuspendido em 2,5 ml de água destilada. Após isso, adicionou-se 500 μ L de fenol e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A concentração de açúcar foi estimada em uma concentração padrão de glicose 1mM e amostra analisada em espectrofotômetro com absorvância de 480nm.

O glicogênio hepático também foi analisado com o auxílio do programa Image J, para quantificação da área total ocupada por essa reserva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da série vermelha

Os níveis crescentes de glicerina bruta na dieta de pintados não acarretaram alterações nas variáveis eritrocitárias em relação ao controle ($P > 0,05$): hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos e os índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) como apresentado na (Tabela 1).

Tabela 1 Parâmetros hematimétricos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

PARÂMETROS	GLICERINA BRUTA (%)					EFEITO	CV%
	0%	5,0%	7,5%	10,0%	12,5%		
RBC(milhões/mm ³)	0.67 ± 0.25	0.54 ± 0.21	0.48 ± 0.15	0.69 ± 0.28	0.67 ± 0.16	NS	8,96
Hb(g/dL)	7.23 ± 1.19	7.30 ± 1.84	7.32 ± 1.35	7.32 ± 1.48	7.51 ± 1.14	NS	3,8
Hct (%)	23.66 ± 2.82	25.26 ± 3.26	24.93 ± 3.12	24.60 ± 3.52	25.86 ± 3.44	NS	1,12
VCM (fL)	333.58 ± 142.65	389.54 ± 178.59	458.16 ± 101.74	335.73 ± 113.62	355.74 ± 121.80	NS	8,05
HCM (pg)	130.07 ± 57.50	138.59 ± 57.72	140.56 ± 36.67	118.96 ± 57.62	136.09 ± 46.35	NS	7,12
CHCM (%)	28.35 ± 5.03	26.31 ± 4.85	28.35 ± 6.26	25.13 ± 3.75	28.50 ± 4.16	NS	3,51

Valores expressos como média ± desvio padrão. RBC = número de eritrócitos; Hb= hemoglobina; Hct = hematócrito; VCM = Volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Os índices hematimétricos costumam ser utilizados no controle de patologias e estresse, além de poderem demonstrar o estado fisiológico do animal (SILVA et al., 2012).

Segundo Thrall et al. (2012), os eritrócitos maduros de peixes sadios possuem morfologia oval e nucleadas. A concentração de eritrócitos (hemácias) encontrados no presente estudo variou entre 0,48 a 0,69(milhões/mm³) entre os tratamentos. Tais valores foram maiores que os encontrados por Lundstedt (2003) ao testar diferentes níveis de proteína e energia nas dietas de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) medindo 21,8 ± 0,7 cm, onde os eritrócitos variaram de 0,27-0,30 (milhões/mm³). Todavia, há de se considerar que indivíduos que possuem tamanhos diferentes liberam energia em quantidade também diversa de acordo com o seu comprimento, podendo interferir em suas características hematológicas (RANZANI-PAIVA; TAVARES-DIAS, 2002).

Os valores médios de hemoglobina-Hb encontrados (7,23 a 7,51g/dL) se situaram dentro do intervalo estabelecido por Weiss et al. (2010) que é de 5 a 10g/dL, mais baixos quando comparados com a concentração de Hb em mamíferos. Tavares-Dias et al. (2009), ao estudarem peixes híbridos do gênero *Pseudoplatystoma* (*P. fasciatum* X *P. coruscans*) pesando de 568,0 a 1,350 g, encontraram intervalo entre 5,2 e 6,1g/dL de hemoglobina. Enquanto, Fagundes e Urbinati et al. (2008), ao avaliarem a concentração de hemoglobina de *P. coruscans* com peso médio de 14,04, 24,94 e 44,78 g, observaram valores médios de 10,50; 8,01 e 10,10 g/dl, respectivamente.

O hematócrito (volume globular) corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos contidos numa certa quantidade de sangue total, sendo que valores baixos podem indicar anemia. A porcentagem de hematócrito analisado neste trabalho variou entre 23,66 a 25,86% e se mantiveram dentro do intervalo previsto por Weiss et al. (2010) para peixes, que é de 20 a 45%. Os valores referenciados por Razani-Paiva et al. (2000a, 2000b) para *Pseudoplatystoma*

fasciatum de cativeiro (23,0-32,5%) e para *Pseudoplatystoma corruscans* de ambiente natural (26,0%) se mantiveram próximos dos resultados descritos neste trabalho.

O volume corpuscular médio (VCM) está relacionado com a dinâmica cardíaca e com o fluxo sanguíneo (FRIES et al., 2013). O intervalo de VCM para peixes previsto por Weiss et al. (2010), varia de 150 a 350 fL. Apesar deste parâmetro no presente estudo ter distinguido do intervalo do autor supracitado acima, o mesmo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Tavares-Dias et al. (2009), cita intervalo de (159,2-180,3fL) para híbridos do gênero *Pseudoplatystoma* (*P. fasciatum* x *P. coruscans*). Enquanto que Razani-Paiva et al., (2000a) e (2000c) cita os valores de (129,1-189,0 fL) e (165,2 fL); respectivamente.

O HCM varia consideravelmente entre as espécies, no intervalo de 30 e 100 pg (picogramas) devido a diferenças no tamanho dos glóbulos circulantes (WEISS et al., 2010). Neste estudo o HCM (hemoglobina corpuscular média) identificado foram superiores aos referenciados por Weiss et al. (2010), no entanto não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A distinção entre os valores encontrados para o VCM e HCM resulta das peculiaridades dos eritrogramas de peixes, pois os parâmetros hematológicos podem ser influenciados por inúmeros fatores, dentre eles a idade, espécie, estresse, temperatura, fotoperíodo, estado nutricional e a metodologia utilizada para sua determinação (PEDRO et al., 2004), e podem apresentar valores distintos mesmos em animais pertencentes ao mesmo gênero (TAVARES-DIAS, MORAES, 2004).

Além disso, segundo McCarthy et al. (1973), os valores do VCM e HCM de peixes requerem cautela em sua interpretação, pois são calculados a partir da contagem total de eritrócitos, no qual pode apresentar certa margem de variação. Porém, o CHCM é considerado mais preciso, uma vez que é calculado a partir do percentual de hematócrito e da hemoglobina.

Os valores médios de CHCM (25.13 a 28.50 g/dL) permaneceram dentro do intervalo estipulados por Weiss et al. (2010) que é de 18,0 a 30,0g/dL. Tavares-Dias et al., (2009) relata para peixes híbridos (*P. fasciatum* x *P. coruscans*), pesando entre 568 e 1350g intervalo de 16,8-18,8g/dL para CHCM.

3.2 Avaliação da série branca

Os leucócitos são células que exercem importante papel na imunidade não específica e os seus índices são determinantes na avaliação do estado de saúde dos peixes (ISHIKAWA et al., 2008) Alterações na contagem relativa de células sanguíneas de defesa orgânica podem

significar a ocorrência de processos infecciosos, semelhante ao que ocorre com os mamíferos (SILVA et al., 2012)

No entanto, o resultado para contagem total e diferencial de leucócitos não foi alterada pela dieta, ($P > 0,05$). As médias seguidas dos desvios padrões desta contagem estão demonstradas na (Tabela 2).

Tabela 2 Contagem total e diferencial de leucócitos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

PARÂMETROS	GLICERINA BRUTA (%)					EFEITO	CV%
	0%	5%	7,5%	10,0%	12,5%		
Trombócitos (uL)	22.38 ± 29.98	25.19 ± 33.32	24.96 ± 32.57	23.78 ± 28.92	23.04 ± 27.50	NS	10,25
Leucócitos (uL)	122.06 ± 35.94	139.03 ± 73.49	117.78 ± 73.25	120.92 ± 51.05	126.76 ± 54.33	NS	12,75
Linfócitos (%)	97.30 ± 3.02	97.40 ± 2.83	96.60 ± 2.41	97.90 ± 1.66	98.30 ± 1.41	NS	0,72
Neutrófilos (%)	2.20 ± 2.61	2.10 ± 2.68	3.00 ± 2.16	1.50 ± 1.71	1.30 ± 1.25	NS	11,03
Monócitos (%)	0.10 ± 0.31	0.20 ± 0.42	0.10 ± 0.31	0.20 ± 0.42	0.20 ± 0.42	NS	36,08
*LG-PAS (%)	0.20 ± 0.42	0.10 ± 0.31	0.20 ± 0.42	0.20 ± 0.42	0.10 ± 0.31	NS	36,08
Eosinófilos (%)	0,20 ± 0,42	0,20 ± 0,42	0,10 ± 0,31	0,20 ± 0,63	0,10 ± 0,31	NS	80,69

Valores expressos como média ± desvio padrão. NS = não significativo para o Teste de Turkey ($P > 0,05$). * LG-PAS- leucócito granular-PAS positivo.

Os valores médios do número de leucócitos e trombócitos de pintado-da-Amazônia se distinguiram dos valores relatados para surubins híbridos sadios (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) (PÁDUA et al., 2009), no entanto, os linfócitos e os neutrófilos foram os leucócitos mais frequentes em ambas as espécies.

Tomaz e Campos (2011), aos estudarem as células de defesa de machos e fêmeas de *Pseudoplatystoma reticulatum* durante seu período reprodutivo em piscicultura, relataram médias para linfócitos (74,2 ± 12,7- macho e 76,1 ± 9,91-fêmea) menores do que os encontrados no presente estudo. Já as médias para eosinófilos (3,63 ± 3,09 - macho e 2,80 ± 3,09 -fêmea), monócitos (1,75 ± 3,46 - macho e 1,30 ± 0,86 -fêmea), leucócito granular-PAS positivo / LG-PAS (0,68 ± 0,25 0,82 - macho ± 0,52-fêmea) e neutrófilos (14,6 ± 8,30 – macho e 11,8 ± 8,22-fêmea) foram maiores que as relatadas para o pintado-da-Amazônia.

O conhecimento sobre a origem e o desenvolvimento dos trombócitos e leucócitos em peixes é considerado escasso, embora algumas ideias tem sido propostas desde o início do século passado. Porém, os dados adquiridos através dos estudos da hematologia e/ou dos órgãos hematopoéticos ainda são pouco conclusivos. No entanto, as células sanguíneas de defesa orgânica apresentam variação interespecífica (TAVARES-DIAS et al., 2002), o que pode explicar a variação nos valores comparados acima.

Além disso, a contagem diferencial de leucócitos possui alguns entraves que dificultam a comparação de resultados entre diferentes autores, mesmo para estudos que utilizam a mesma espécie. Dentre os problemas enfrentados estão a divergência de terminologia, principalmente envolvendo os granulócitos e a diversidade de técnicas para quantificação e identificação dos leucócitos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Ainda assim, o leucograma é considerado uma ferramenta importante na compreensão de infecções e demais processos de desequilíbrio homeostático (SILVA et al., 2012).

3.3 Avaliação bioquímica

A composição bioquímica do sangue retrata de forma fidedigna a constância entre o ingresso, o egresso e a metabolização dos nutrientes no tecido animal. Este equilíbrio é denominado homeostase, no qual complexos mecanismos metabólico-hormonais estão envolvidos (BOCKOR, 2010). Os parâmetros bioquímicos analisados neste estudo (colesterol total, ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), proteínas totais, glicose e triglicérides) não foram alteradas pelos diferentes níveis de glicerina bruta apresentado na (Tabela 3).

Tabela 3 Parâmetros bioquímicos dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta.

PARÂMETROS	GLICERINA BRUTA (%)					EFEITO	CV%
	0,0%	5,0%	7,5%	10,0%	12,5%		
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	159.64 ± 20.58	153.26 ± 17.46	137.48 ± 19.73	144.16 ± 19.97	157.10 ± 45.99	NS	7,94
ALT (U/L)	9.67 ± 6.59	9.28 ± 9.39	7.21 ± 6.31	9.74 ± 6.12	7.75 ± 4.25	NS	21,09
AST (U/L)	4.63 ± 1.86	4.96 ± 2,46	4.77 ± 2.10	3.07 ± 1.70	3.28 ± 1.78	NS	7,42
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	4.58 ± 0.21	4.53 ± 0.30	4.57 ± 0.25	4.44 ± 0.45	4.53 ± 0.16	NS	10,52
GLICOSE (mg/dL)	145.40 ± 75.50	153.93 ± 88.46	154.46 ± 85.60	156.00 ± 76.67	154.33 ± 67.52	NS	5,5
TRIGLICÉRIDES (mg/dL)	216.43 ± 21.91	205.75 ± 25.94	226.87 ± 25.15	211.35 ± 25.26	223.49 ± 18.09	NS	1,52

Valores expressos como média ± desvio padrão. NS = não significativo para o Teste de Turkey (P>0,05).

Segundo González et al. (2017), a molécula de colesterol possui importante função biológica, sendo precursor dos hormônios esteroidais e dos ácidos biliares, além de fazer parte das membranas plasmáticas das células.

As concentrações de colesterol total não foram afetadas pela inclusão de glicerina bruta na dieta, corroborando com os resultados de Balen (2017) para juvenis de curimatá (*Prochilodus lineatus*) alimentados com dietas contendo glicerina bruta (0, 4, 8, 12, 16 e 20%) e Neu et al. (2013) para juvenis de tilápia-do-Nilo com dietas contendo (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%) glicerol.

As enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que a dieta não alterou as suas atividades. Essas enzimas são consideradas importantes no diagnóstico de lesões hepáticas, visto que o aumento da sua atividade sérica pode estar relacionado a ruptura dos hepatócitos, resultante de processos como necrose celular ou do processo de agressão por agentes tóxicos (HARZER et al., 2015).

As proteínas sanguíneas são responsáveis por múltiplas funções, dentre elas a manutenção da pressão osmótica, viscosidade do sangue, transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, regulação do pH sanguíneo e participação na coagulação sanguínea. A síntese dessas proteínas ocorre principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de formação se relaciona diretamente com o estado nutricional do animal e com a funcionalidade hepática. O aumento na sua concentração pode ser sinal desidratação por hemoconcentração, enquanto que a diminuição pode ser resultado de falhas hepáticas, transtornos intestinais e renais, hemorragia, ou deficiência na alimentação (GONZÁLEZ e SILVA, 2008).

Os valores de proteínas totais encontradas neste trabalho não se distanciaram muito daquelas encontradas por Costa et al. (2015) para Tilápias do Nilo que permaneceram entre 3,93 a 4,13 e que também não apresentaram diferença significativa. De acordo com este mesmo autor, a dieta contendo glicerol protege o catabolismo proteico para fins energéticos na tilápia do Nilo. Corroborando, Menton et al. (1986) também não encontraram diferença significativa na concentração de proteínas plasmáticas de trutas alimentadas com dietas contendo 6 e 12% de glicerol.

A glicose atua como substrato energético armazenado na forma de glicogênio hepático e muscular (por meio da glicogênese) e que pode ser mobilizado para proporcionar suporte energético aos peixes. A glicose plasmática é bastante variável não apenas entre espécies, mas também interespecificamente, em diferentes estágios de vida ou sob certos regimes de alimentação (HEMRE et al., 2002).

Segundo Morgan e Iwama (1997), a glicose é a principal fonte de energia que os peixes utilizam para suportar situações adversas, sendo um importante indicador de distúrbio fisiológico. Os resultados para glicose encontrados nesta pesquisa, não foram alterados com os níveis de inclusão de glicerol bruto nas rações.

Distinguindo dos resultados encontrados neste trabalho para a concentração de glicose, Li et al. (2010) observaram que o nível de glicose no sangue do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) foi influenciado pelos diferentes níveis de glicerol (0, 5, 10, 15 e 20%). Os valores foram significativamente maiores em peixes alimentados com 0% e 5% de glicerol do que em

peixes alimentados com as demais dietas e que nos níveis contendo 10, 15 e 20% de glicerol a glicose geralmente diminuiu.

Para tilápias do Nilo, na fase de crescimento/engorda Moesch et al. (2016) verificaram que os tratamentos contendo glicerol (20, 40, 60, 80 e 100%) apresentaram os menores níveis de glicose sanguínea, fato que o autor associou ao decréscimo do amido (milho) da ração.

Peixes carnívoros utilizam eficientemente os lipídios como fonte de energia devido à capacidade restrita de seu metabolismo em regular a glicemia (CASERAS et al., 2002; HEMRE et al., 2002), onde os triacilgliceróis são a principal forma de armazenamento da energia corporal nestes animais.

Os resultados para concentração de triglicérides observados nesta pesquisa corroboram com os obtidos por Costa et al. (2015) e Neu et al. (2013). Ambos verificam que os níveis de glicerol na dieta não influenciaram a concentração de triglicérides plasmáticos no juvenil de tilápia do Nilo. Costa et al. (2015) afirmaram que não houve alteração nos níveis de triglicérides plasmáticos, por não haver deficiência energética no animal e que, portanto, não houve necessidade de a espécie mobilizar energia e conseqüentemente realizar a lipólise em adipócitos.

A glicerina bruta tem sido testada em dieta de outras espécies monogástricas. Romano et al. (2014) estudaram os efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte. Semelhantemente ao presente trabalho, não verificaram diferença significativa nas concentrações de colesterol total entre o controle e os grupos que receberam dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina (2,5, 5,0, 7,5 e 10,0%).

Gallego et al. (2014) ao testar níveis (0,0, 3,5, 7,0, 10,5 e 14,0%) de glicerina semipurificada neutralizada na dieta suínos, observaram que os valores plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides na fase de crescimento também não sofreram efeito da inclusão da glicerina.

Em animais ruminantes, Maciel et al., (2016) analisaram o desempenho e características de carcaça de leiterias alimentadas com dietas contendo glicerina bruta e observou que ela não alterou as concentrações de glicose no soro, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de alta densidade colesterol e creatinina.

Ribeiro (2015) ao estudar glicerina bruta (0, 7, 14, e 21%) na dieta de cordeiros confinados, não observou diferença significativa para albumina, globulina, triglicérides, alanina aminotransferase(ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase. Porém, as concentrações séricas de uréia, glicose decresceram linearmente com o aumento da inclusão

e o colesterol apresentou comportamento linear crescente, portanto, foram influenciadas pelo glicerol.

3.4 Análises de glicogênio hepático e muscular

Os níveis de glicogênio presentes no tecido hepático são adaptáveis à dieta (SHIAU, 1997; HEMRE et al., 2002). As análises de glicogênio hepático não apresentaram diferença estatística dos tratamentos com inclusão de glicerol em relação ao controle como mostra a (Tabela 4 e 5). Menton et al. (1986) ao examinarem o glicerol (variando de 1 a 12%) na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em substituição de parte de farelo de trigo, observou que em dietas contendo 6 e 12% de glicerol houve aumento do nível de glicose no plasma, mas a concentração de glicogênio hepático não foi alterada.

O glicogênio muscular analisado neste estudo apresentou maior concentração na dieta controle (0% de glicerol) quando se comparada ao tratamento com 12,5% de glicerol como apresentado na (Tabela 4).

Tabela 4 Glicogênio hepático e muscular dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, segundo metodologia de Bidinotto et al. (1997).

PARÂMETROS	GLICERINA BRUTA (%)					EFEITO	CV%
	0%	5%	7,50%	10,00%	12,50%		
GLICOGÊNIO HEPÁTICO (umoles)	33,76 ± 10,32a	33,29 ± 11,00a	32,44 ± 3,28a	41,42 ± 5,44a	35,66 ± 5,82a	NS	9,44
GLICOGÊNIO MUSCULAR (umoles)	31,88 ± 4,86a	35,45 ± 7,24a	24,71 ± 7,00a	25,09 ± 6,78a	18,03 ± 2,73b	S	7,11

Médias na mesma linha seguidas de letra distintas diferem ($P > 0,05$) pelo Teste de Turkey. Valores expressos como média ± desvio padrão. NS = não significativo; S= significativo.

Tabela 5 Glicogênio hepático dos juvenis de Pintado-da-Amazônia, analisado pelo programa Image J.

PARÂMETROS	GLICERINA BRUTA (%)					EFEITO	CV%
	0%	5%	7,5%	10,0%	12,5%		
GLICOGÊNIO HEPÁTICO (%)	33,76 ± 10,32	33,29 ± 11,00	32,44 ± 3,28	41,42 ± 5,44	35,66 ± 5,82	NS	9,44

Valores expressos como média ± desvio padrão. NS = não significativo ($P > 0,05$) pelo Teste de Turkey.

Sabe-se que o glicogênio muscular é imprescindível somente para o músculo e que sua metabolização nesse local fornece energia para a contração muscular, enquanto que o glicogênio hepático regula a glicemia e fornece substrato energético para outros tecidos.

Silva et al. (2012), ao testarem dois níveis de suplementação de glicerol (0 e 5%), como meio de reposição das reservas de glicogênio muscular de dourada (*Sparus aurata*), observou

que o peixe alimentado a inclusão de 5% de glicerol bruto mostrou uma deposição significativamente maior de glicogênio em relação ao controle (0%).

Em estudos anteriores envolvendo o glicerol comprovou-se que o mesmo, além do glicogênio pode também influenciar a atividade lipogênica. Lin (1977) ao estudar a adição de 20% de glicerol na dieta de ratos por três semanas, relata que ele causou aumento do peso do fígado. Por outro lado, quando esse mesmo autor estudou 20% de glicerol na dieta de frangos alimentados por três semanas, o mesmo não observou alteração no peso do fígado.

Lin (1977), ao estudar alimentação de animais não ruminantes, observou que o glicerol provoca respostas espécie-específicas e órgão-específicas. Partindo desse pressuposto, de que consta na literatura a deposição de glicogênio e a atividade lipogênica podem ser influenciadas pelo glicerol na dieta, sugere-se que sejam realizados mais estudos com esse alimento, a fim de desvendar o efeito metabólico do mesmo sobre as reservas energéticas nos peixes.

4 CONCLUSÃO

A inclusão da glicerina bruta até o nível de 10,0 % em dietas de pintado-da-Amazônia é viável, pois não interferiu no desempenho animal e não provocou alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos da espécie estudada.

REFERÊNCIAS

- BALEN, R. E.; JUNIOR, G. B.; COLPINI, L. M. S.; BOMBARDELLI, R.A.; SILVA, L.C.R.; MEURER, F. Energia digestível e inclusão da glicerina bruta em dietas para juvenis de curimatá. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-357, 2017.
- BARBOSA, P. T.L.; PEREIRA, G. R.; MENDES, B. V.; PORTO, E. P.J.; PIRES, T.B. **Sistema de Produção de Pintado amazônico: caracterização das variáveis químicas da água**. XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA-ZOOTEC 2015. Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia Fortaleza – CE, 2015.
- BIDINOTTO, P.M. et al. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of microsamples. **Boletim técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 10, p. 53-60, 1997.
- BOCKOR, L. Seminário de Bioquímica do tecido animal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- CASERAS, A.; METÓN, I.; VIVES, C.; EGEA, M.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, n. 6, p. 607-614, 2002.
- COSTA, D. V.; PAULINO, R.R.; OKAMURA, D.; OLIVEIRA, M.M.; ROSA, P.V. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed glycerol. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.50 n. 5, 2015.
- DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **American Journal of Medical Science**, v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.
- FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v.276, p.112-119, 2008.
- FRIES, E.M.; ZAMINHAN, M.; LUCHESI, J.D.; COSTA, J.M.; MALUF, M.L.F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Características hematológicas de *Carassius auratus** Hematologic characteristics of *Carassius auratus*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 84-88, 2013.
- GERSHANOVICH, A.D.; KISELEV, G.A. Growth and hematological response of sturgeon hybrids Russian sturgeon (*Acipenser guldenstadti*) x beluga (*Huso huso L.*) to protein and lipid contents in the diet. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.106A, n.3, p.581-586, 1993.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 538p, 2017.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 342p. 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds). **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GALLEGO, A.G.; MOREIRA, I.; POZZA, P. C.; CARVALHO, P. L.O.; SIERRA, L. M. P.; FILHO, C. L. C. Neutral semi-purified glycerin in starting pigs feeding. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2831-2842, 2014.

HARZER, B.; STIPP, M.C.; HERRERIAS, T. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 1, p. 82-99, 2015.

HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, 8, 175-194, 2002.

ISHIKAWA, N.M; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p. 54-63, 2008.

KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v.19, nº111, 2009.

LI, M.H. MINCHEW, C.D.; OBERLE, D.F.; ROBINSON, E.H. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.41, n.1, p.130-136, 2010.

LIN, E.C.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.

LUNDSTEDT, L.M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia**. 2003. 140 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

MACIEL, R.P; NEIVA, J. N. M; RESTLE, J.; MIOTTO, F. R. C.; SOUSA, L.F.; CUNHA, O. F. R.; MORON, S. E; PARENTE, R. R. P. Performance and carcass characteristics of dairy steers fed diets containing crude glycerin. **Revista Brasileira de Zootecnia (Online)**, v. 45, p. 677-685, 2016.

MCCARTHY, D.H.; STEVENSON, J.P.; ROBERTS, M.S. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Journal of Fish Biology**, v.5, p. 1-8, 1973.

MENTON, D. J.; SLINGER, S. J.; HILTON, J. W. Utilization of free glycerol as a source of dietary energy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 215-227, 1986.

MOESCH, A.; VOLKWEIS, M.I.; CARNEIRO, Z.W. F.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D. Growth, body composition and hepatopancreas morphology of Nile tilapia fingerlings fed crude glycerol as a replacement for maize in diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.219, p.122 – 131, 2016.

- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P. & SCHRECK, C.B. E. **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, p. 247-270, 1997.
- NEU, D.H.; FURUYA, W.M.; BOSCOLO, W.R.; POTRICH, F.R.; LUI, T.A.; FEIDEN, A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v.19, p.211-217, 2013.
- PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M., HISANO, H. TAVARES-DIAS, M. **Perfil hematológico de surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) cultivados intensivamente no estado de Mato Grosso do Sul**. 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes FMVZ - UNESP - Botucatu, 2009.
- PEDRO, N.; GUIJARRO, A.; LOPES-PATIÑO, M.A.; ÁLVAREZ, R.M.M.; ALONSO-BEDATE, M.; DELGADO, M.J. Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (*Tincatinca*): ritmos diarios y estacionales. **Comunicación científica CIVA**, p. 173-190, 2004.
- RANZANI-PAIVA M.J.T.; PÁDUA S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1.ed. Maringá: Eduem, 135p, 2013.
- RANZANI-PAIVA M.J.T.; TAVARES DIAS, M. Eritrograma, relação viscerosomática, hepatosomática e esplenosomática em tainhas *Mugil platanus* Günther (*Osteichthyes*, *Mugilidae*) parasitadas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19, n.3, p. 807 - 818, 2002.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; EIRAS, A.C.; FELIZARDO, N.N. Hematological analysis in “cachara”, *Pseudoplatystoma fasciatum* Linneus, 1766, in captivity. **European Aquaculture Society and World Aquaculture Society**, Nice, França, v. 28, 2000a.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, C.G.; TAKEMOTO, R.M. & EIRAS, A.C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p. 507-513, 2000b.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, C.G.; TAKEMOTO, R.M. & EIRAS, A.C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.22, n. 2, p. 507-513, 2000c.
- RIBEIRO, R.D.X. **Glicerina bruta na dieta de cordeiros confinados**. 20015. 82 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2015.
- ROMANO, G.G.; MENTEN, J.F.M.; FREITAS, L.W.; LIMA, M.B.; PEREIRA, R.; ZAVARIZE KC; DIAS, C.T.S. Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 97-105, 2014.
- SHIAU, S.Y. Utilization of carbohydrates in warmwater fish-with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Aquaculture**, [s.l.], v.151, p. 79-96, 1997.

SILVA, A. S. E.; LIMA, J.T.A.X.; BIANCO, B.S. Hematologia em peixes. **Revista Centauro v.3**, v.3, n.1, p.24-32, 2012.

SILVA, T. S. et al. Dietary tools to modulate glycogen storage in gilthead seabream muscle: glycerol supplementation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 42, p. 10613-10624, 2012.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B. de; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. de. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NETO, A.; MARIANO, W. dos S.; SÓRIA, S.F.P. (Ed.). **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, p.43-80, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Embrapa Amapá. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 32, p. 693-698, 2002.

THRALL, M. A; WEISER, G; CAMPBELL, T. W; ALLISON, R. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2ed. Published by Wiley-Blackwell, Oxford, 776 p, 2012.

TOMAZ, P.M.; CAMPOS, C.M. Variáveis hematológicas durante período reprodutivo de *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Revista eletrônica Anais do Encontro de Iniciação Científica – ENIC**, n. 3, 2011.

WEISS, D.J.; WARDROP, J.; SCHALM, O.W. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6.ed. Iowa: Black well Publishing, 1206p, 2010.

WINTROBE, M.M. The volume and hemoglobin content of the red blood corpuscle: simple method of calculation, normal findings, and value of such calculations in the anemias. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.177, p. 513–23, 1929.

CAPÍTULO IV

Análise histopatológica de juvenis de “pintado-da-Amazônia” alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta

RESUMO

O presente estudo verificou a adição de glicerina bruta na dieta de juvenis de pintado-da-Amazônia por análises histopatológicas no fígado. O experimento foi executado no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, utilizou-se 150 juvenis de pintado-da-Amazônia, com peso inicial de $6,83 \pm 1,11$ (g) e comprimento de $10,06 \pm 0,57$ cm distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições (10 animais em cada repetição). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), utilizando o Programa Instat v 3.0 para Windows. Os animais foram alimentados com cinco dietas experimentais contendo níveis crescentes de glicerina (0%; 5%; 7,5%; 10% e 12,5%). O arraçoamento ocorreu por um período de 90 dias (30 dias de adaptação e 60 dias experimental) e ao final desse período, foram selecionados aleatoriamente 9 animais de cada tratamento para a retirada de amostras do fígado e rim que foram submetidos à rotina de processamento histológico e consecutivamente a montagem das lâminas para análise. Utilizou-se metodologia semi-quantitativa pelo Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões e Cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), baseado na gravidade de cada lesão. Os valores do VMA e IAH não apresentaram diferenças significativas, denotaram respectivamente alterações pontualmente distribuídas pelo fígado e que não comprometem o seu funcionamento, sendo assim reversíveis. Os resultados demonstraram que a inclusão de até 12,5% de glicerina bruta em dietas de pintado-da-Amazônia em substituição parcial do milho pode ser utilizada sem causar alterações hepáticas significativas na espécie estudada.

Palavras chaves: tecidos, função hepática, patologia, surubim.

CAPÍTULO IV

Análise histopatológica de juvenis de “pintado-da-Amazônia” alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta

ABSTRACT

The present study verified the addition of crude glycerin in the diet of juveniles of Painted Amazonia by histopathological analyzes in the liver. The experiment was carried out at the Neotropical Fish Morphophysiology and Biochemistry Laboratory of the Federal University of Tocantins, 150 juveniles of Amazonian Paints, with initial weight of 6.83 ± 1.11 (g) and length of $10,06 \pm 0.57$ cm distributed in a completely randomized design (DIC), with 3 replicates (10 animals in each replicate). The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey 's test ($p > 0.05$) and those without normal distribution were submitted to non-parametric analysis (Kruskall Wallis) using the Instat Program v 3.0 for Windows. The animals were fed five experimentais diets containing increasing levels of glycerol (0%, 5%, 7.5%, 10% and 12.5%). The feeding occurred for a period of 90 days (30 days of adaptation and 60 experimental days) and at the end of this period, were randomized 9 animals of each treatment for removal of liver and kidney samples were subjected to routine histology and consecutively the assembly of the slides for analysis. We used a semi-quantitative methodology by the Calculation of Mean Value of Change (VMA), based on the incidence of lesions and Calculation of Histological Alteration Index (AHI), based on the severity of each lesion. The values of the VMA and AHI did not present significant differences, respectively denote changes punctually distributed by the liver and do not compromise its functioning, thus being reversible. The results showed that the inclusion of up to 12.5% crude glycerin-of-painted Amazon diets as partial replacement of corn can be used without causing significant hepatic disorders in the studied species.

Keywords: fabrics, hepatic function, pathology, surubim.

1 INTRODUÇÃO

Os surubins são espécies de peixes comerciais de grande destaque na piscicultura brasileira, pelo alto padrão de sua carne, ausência de espinhos intramusculares e seu grande porte (SABAINI et al., 2015). No entanto, a aquicultura enfrenta alguns entraves relacionados principalmente a alimentação que corresponde a 70% dos custos de produção. Desta forma, busca-se diminuir os custos de produção das dietas e aumentar o aproveitamento das frações nutricionais (ALMEIDA FILHO et al., 2012).

A produção de biodiesel no Brasil gera como subproduto o glicerol que possui grande biodisponibilidade e baixo custo (NEU et al., 2013; OOI et al., 2004). Por apresentar tais características tem sido proposto como alimento alternativo para aves (LAMMERS et al., 2008b), suínos (LAMMERS et al., 2008c; BERENCHTEIN, 2010), ruminantes (ABDALLA, 2008; DONKIN, 2008) e peixes (LI et al., 2010; NEU et al., 2012). Além de proporcionar redução de custos com a alimentação animal, o uso do glicerol como alimento evita o desencadeamento de um problema ambiental, visto que o mesmo é considerado um potencial poluidor quando não utilizado corretamente.

Entretanto, sabe-se que na composição deste elemento pode existir alguns resíduos, dentre elas o metanol e alguns metais, que mesmo em quantidades mínimas, podem interferir no metabolismo dos peixes. Porém, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) através da resolução de nº 386/1999, classificou o glicerol como produto umectante na lista de aditivos que são permitidos para a alimentação humana e animal (MOESCH et al., 2016).

Nos peixes, estudos histopatológicos costumam ser direcionados a órgãos, que possuem importante função no metabolismo de substâncias tóxicas, como é caso do fígado, que pode sofrer alteração em sua parte estrutural e metabólica devido a exposição de poluentes, a alimentação, as toxinas, os parasitos e os micro-organismos (ROCHA et al., 2010).

O rim dos peixes também é um órgão importante nos mecanismos fisiológicos como osmorregulação, excreção, metabolismo endócrino, hemopoiese e imunitário. Além de ser sensível a processos parasitários, bacterianos, viróticos poluidores e manejo nutricional (FERRAZ DE LIMA et al., 1993).

Este estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de possíveis alterações histopatológicas no fígado e rim de pintado-da-Amazônia alimentados com dietas contendo diferentes concentrações (0,0; 0,5; 7,5; 10; e 12,5%) de glicerina bruta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins – UFT, Campus de Araguaína – TO. Conduzido no Laboratório Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, no período de janeiro de 2017 a abril de 2017.

Foram utilizados 150 juvenis de “pintado-da-Amazônia” com peso inicial total médio de $6,83 \pm 1,11$ distribuídos em 15 caixas de fibra com capacidade de 1000 litros (cinco tratamentos e três repetições e 10 animais por caixa d’água), com fluxo constante de água.

O delineamento experimental utilizado foi o casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas por teste de Tukey ($p > 0,05$) e aqueles que não apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), utilizando o Programa Instat v 3.00 para Windows. O protocolo para este experimento foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, processo nº (23101.005896/2016-56), da Universidade Federal do Tocantins.

Os tratamentos consistiram de cinco rações experimentais; sendo quatro com níveis de inclusão (5,0, 7,5, 10 e 12,5%) de glicerina bruta em substituição parcial do milho e um tratamento controle como referência (sem inclusão de glicerina). Todas as dietas foram formuladas de forma a proporcionar uma ingestão diária isoprotéica e isoenergética.

Os ingredientes foram peletizados em moedor de carne e secas em estufa com circulação e renovação de ar à 55°C. Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia (8h e 17h) até a saciedade aparente por um período de 90 dias de experimento, sendo 30 dias de adaptação. A sifonação das caixas era realizada todos os dias (15h).

Após o período experimental, os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato gastrointestinal. Foram selecionados 9 animais (escolhidos aleatoriamente) de cada tratamento que foram insensibilizados no gelo para retirada de amostras de tecido hepático e renal.

As amostras foram lavadas com solução salina 0,9% e fixadas por 24 horas em solução Bouin. Posteriormente o material foi lavado por 24h em água corrente e armazenadas em recipientes contendo álcool 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, e 100%) e clarificadas em xilol (FERNANDEZ et.al., 2011).

Posteriormente aos processos de desidratação e clarificação, as amostras foram incluídas em parafina para confecção de cortes histológicos de 3µm de espessura usando micrótomo

manual, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), para posterior análise em microscopia de luz.

Todas as seções foram analisadas usando imagens obtidas em um microscópio LEICA DM500 conectado a um computador pelo o programa LAZ 2.0.

As alterações do fígado e rim consistiram na observação de 5 campos de cada lâmina em aumento de 100x. As análises histopatológicas de ambos os tecidos foram avaliadas por dois métodos semi-quantitativos: Valor Médio de Alterações (VMA) e pelo Índice de Alterações Histológicas (IAH).

O cálculo do (VMA) resulta na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Desta forma, atribuiu-se um valor numérico para cada animal de acordo com a escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão).

Para avaliar o grau das alterações no fígado e no rim utilizou-se o Índice de Alterações Histológicas (IAH) segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundžic (1994), onde cada alteração foi classificada em graus progressivos relacionados ao comprometimento das funções teciduais: estágio I, alterações que não comprometem o funcionamento do órgão; estágio II para alterações mais severas que comprometem o funcionamento órgão, mas são reversíveis; e estágio III, para as alterações mais graves que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Classificação das alterações histológicas do fígado quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundžic (1994).

Alterações Histológicas no Fígado	Estágio
Núcleo na periferia da célula	I
Deformação do contorno celular	I
Deformação do contorno nuclear	I
Hipertrofia celular	I
Hipertrofia nuclear	I
Atrofia celular	I
Vacuolização citoplasmática	I
Dilatação dos sinusóides	I
Ausência de núcleo	II
Ausência de nucléolo	II
Estagnação biliar	II
Vacuolização nuclear	II
Degeneração nuclear	II
Congestão	II
Infiltrado inflamatório	II
Núcleos picnóticos	II
Necrose focal	III

Tabela 2 Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksic & Mitrovic-Tutundžic (1994).

Alterações Histológicas no Rim	Estágio
1. Alterações tubulares	
Degeneração granular	I
Hipertrofia celular	I
Hipertrofia nuclear	I
Vacuolização celular	I
Dilatação da luz tubular	I
Túbulos em regeneração	I
Rompimento celular	II
Degeneração hialina	II
Oclusão da luz tubular	II
Degeneração tubular	II
Novos néfrons	II
2. Alterações glomerulares	
Dilatação dos capilares	II
Espessamento do endotélio	II
Aumento do volume glomerular	II
Redução do espaço de Bowman	II
Presença de hemácias no espaço de Bowman	II
Extravasamento de sangue no espaço de Bowman	II
3. Necrose	
Necrose focal	III

Um valor de IAH foi calculado para cada animal, de acordo com a fórmula: $IAH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$, onde ΣI , ΣII e ΣIII correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III respectivamente.

Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido; entre 11 e 20 indicam danos leves ao órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados; de 51 a 99, danos severos e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises histopatológicas

3.1.1 Fígado

Sabe-se que a glicerina bruta pode apresentar em sua constituição concentrações de metanol e que uma intoxicação aguda por este resíduo pode levar à acumulação de ácido fórmico, resultando em um processo de acidose no metabolismo (LAMMERS et al., 2008a).

O fígado é um órgão importante na digestão e absorção de nutrientes dos alimentos e, portanto, o monitoramento desse órgão é considerado imprescindível (RAŠKOVIÉ et al., 2011). Alterações morfológicas no fígado podem ser desencadeadas por substâncias químicas, drogas e até mesmo pela alimentação desbalanceada, que pode resultar em adaptações, lesão e até morte celular. Este órgão é altamente suscetível às mudanças do estado nutricional de peixes, onde a qualidade da dieta interfere diretamente em estrutura histo-morfo funcional (HONORATO et al., 2014).

As alterações observadas no fígado dos pintados-da-Amazônia alimentados com a dieta controle e com níveis crescentes de glicerina bruta foram em sua maioria lesões de estágio I, consideradas alterações que não comprometem o funcionamento do órgão e uma alteração do estágio II consideradas mais severas, mas reversíveis. As alterações encontradas nos hepatócitos foram: núcleo na periferia da célula, hipertrofia nuclear, vacuolização citoplasmática, dilatação dos sinusóides e estagnação biliar.

A frequência de ocorrência das alterações hepáticas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática encontradas nos tratamentos, estão apresentadas na (Tabela 3).

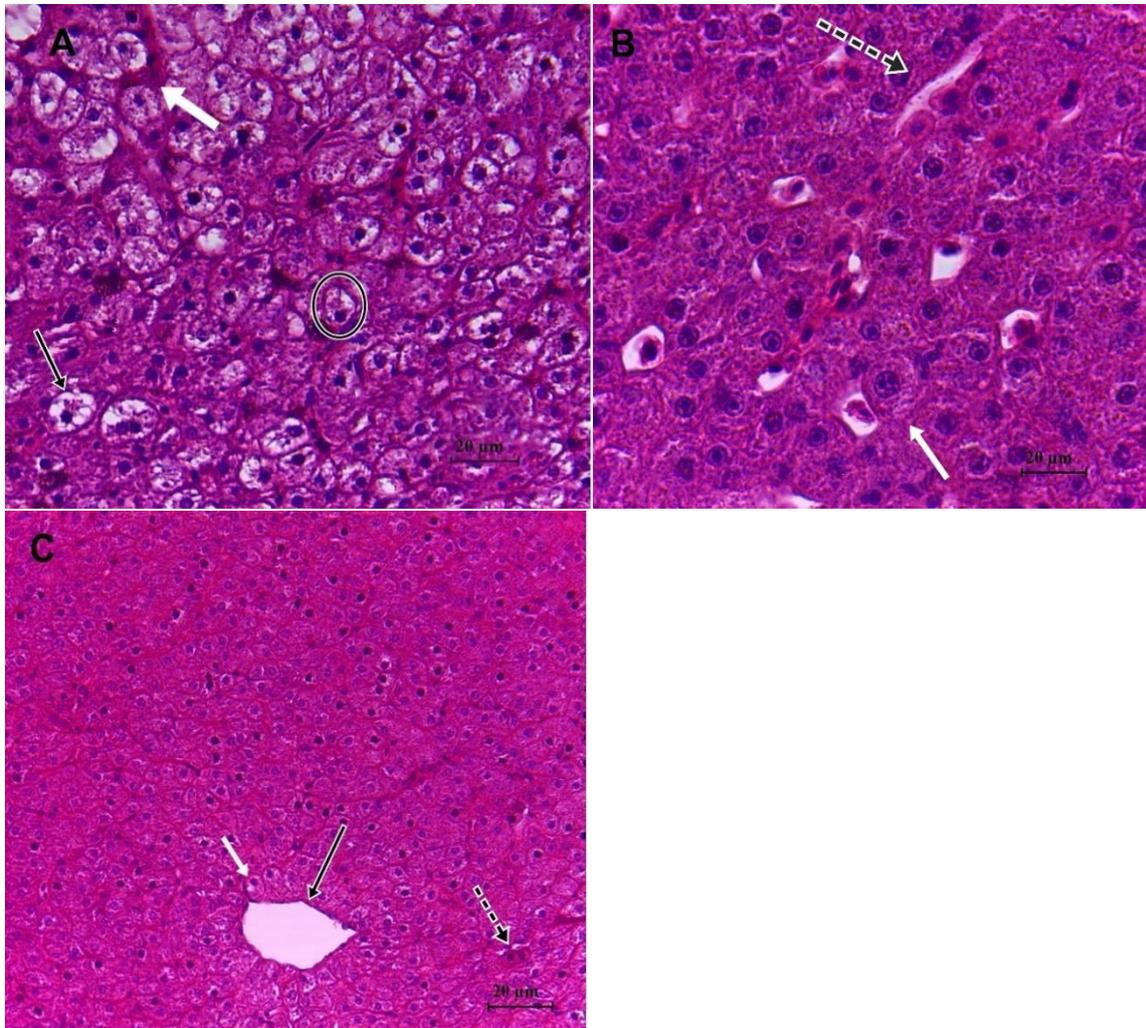
Tabela 3 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de juvenis Pintado-da-Amazônia alimentados com diferentes níveis de adição de glicerina bruta à ração.

ALTERAÇÃO	ESTÁGIO	DIETAS				
		0,0%	5,0%	7,5%	10,0%	12,5%
Núcleo na periferia da célula	I	+	+	0+	0+	0+
Hipertrofia nuclear	I	0	0	0+	0+	0+
Vacuolização citoplasmática	I	0	0	0+	0+	0+
Dilatação dos Sinusóides	I	0	0+	0+	0	0
Estagnação biliar	II	0+	0+	0+	0+	0+

0 = inexistente; 0+ = alteração de rara ocorrência; + = alteração ocorrente; ++ = alteração bastante ocorrente; +++ = alteração de intensa ocorrência.

As alterações mais frequentes encontradas no fígado dos pintados estão apresentadas nas figuras abaixo.

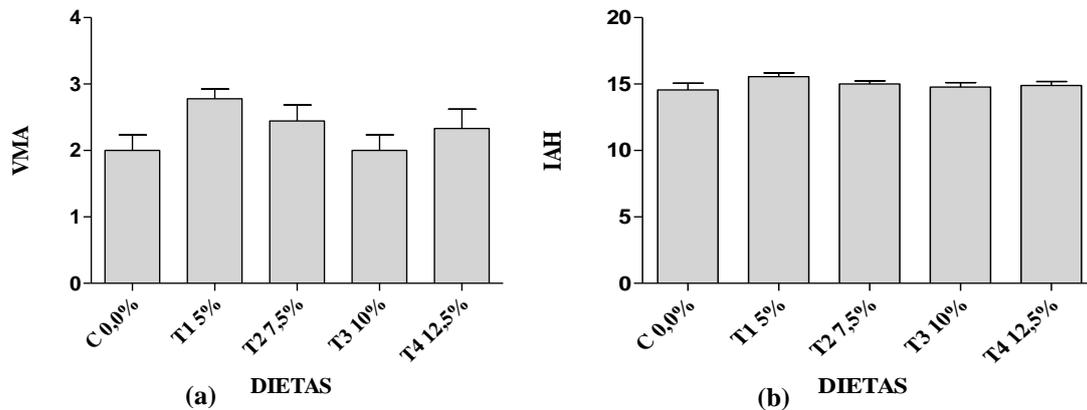
Figura 1 Alterações histopatológicas no fígado de pintado-da-Amazônia. (A) estagnação biliar (seta branca), vacuolização citoplasmática nos hepatócitos (seta preta) e núcleo na periferia da célula (área circular). (B) dilatação dos sinusóides (seta preta tracejada) e hipertrofia nuclear (seta branca). (C) tecido hepático normal - hepatócitos (seta branca), veia central (seta preta fina) e sinusóides (seta preta tracejada).



Os resultados do valor médio de alterações e índice de alterações histopatológicas estão apresentados na Figura 2. O Valor Médio de Alteração Histológica (VMA) obtido para as alterações hepáticas não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as dietas experimentais (5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5% de glicerina bruta) e controle (figura 2a). Observou-se alterações pontualmente distribuídas pelo fígado, pois não ultrapassaram o grau 2.

O Índice de Alteração Histológica (IAH) também não apresentou diferença significativa (figura 2b) demonstrando que as alterações no tecido hepático não comprometeram o seu funcionamento.

Figura 2 Valores médios de VMA e IAH no fígado de pintado-da-Amazônia. Dados são médias \pm desvio padrão ($p>0,05$).



Estudos sobre a histopatologia de animais alimentados com glicerina bruta ainda se apresentam de forma incipiente. No entanto, dentre os poucos realizados observa-se que os resultados corroboram com encontrados no presente estudo. Moesch et al. (2016) ao estudar a substituição do farelo de milho por glicerol bruto em rações para alevinos de *O. niloticus* nas concentrações de (0, 20, 40, 60, 80 e 100%) concluiu que não ocorreu diferenças na área dos hepatócitos e que os possíveis compostos tóxicos presentes na composição de glicerol bruto não afetou a área de hepatócitos.

De acordo com Lammers et al. (2008a) suínos em crescimento alimentados com a adição de até 10% de glicerol não sofreram danos hepáticos, visto que, a frequência de lesões histológicas não foi influenciada pelo tratamento dietético.

Em estudos com ruminantes, Leão et al. (2012) também não identificou alterações hepáticas em amostras provenientes de vacas e novilhos alimentadas com até 24% de inclusão de glicerol.

3.1.2 Rim

Como citado anteriormente a glicerina bruta possui alguns resíduos contaminantes como o metanol, utilizado no processo de separação do glicerol dos ácidos graxos (LEÃO et al., 2012). Desta forma é de suma importância estudos que investiguem alterações patológicas ligadas ao glicerol.

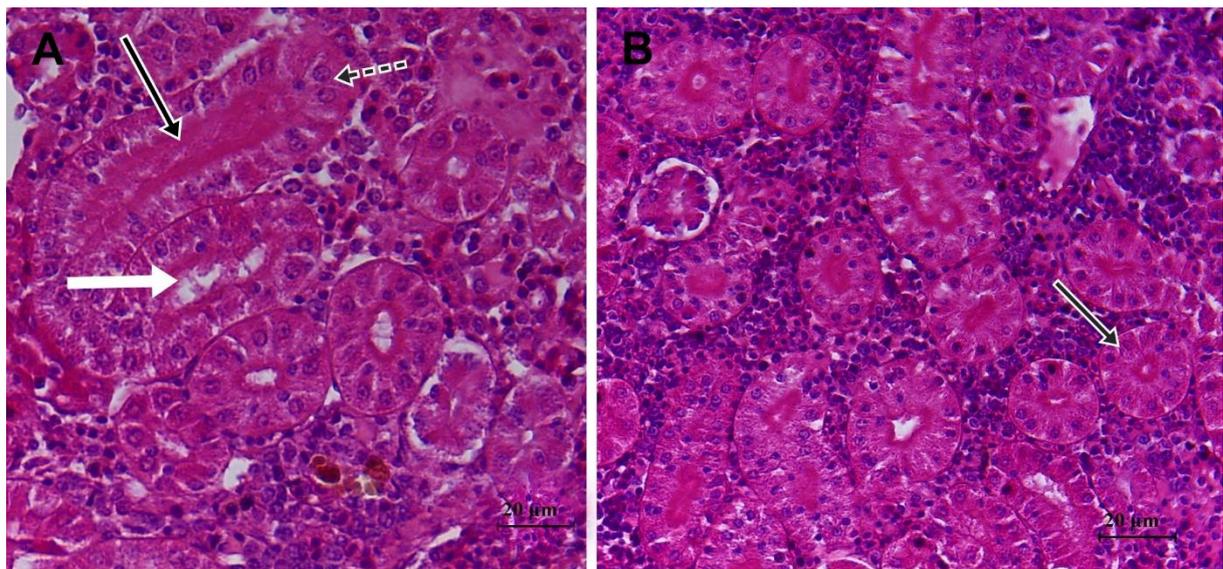
Segundo Thophon et al. (2003), o rim de teleósteos, por processar grande volume sanguíneo, é um dos primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes e assim pode ser utilizado como indicador dos efeitos dos contaminantes.

A análise histopatológica renal realizada neste estudo, demonstrou que as alterações observadas no rim dos pintados-da-Amazônia alimentados se restringiram aos túbulos renais

e foram em sua maioria lesões de estágio I (alterações que não comprometem o funcionamento do órgão) e uma alteração do estágio II (consideradas mais severas, porém passíveis de reversão).

As alterações encontradas foram: hipertrofia nuclear, dilatação da luz tubular e oclusão da luz tubular e estão apresentadas na figura 3.

Figura 3 Alterações histopatológicas no rim de pintado-da-Amazônia. (A) oclusão da luz tubular (seta preta), dilatação da luz tubular (seta branca) e hipertrofia nuclear (seta preta tracejada). (B) túbulo renal com morfologia normal (seta preta).



A frequência de ocorrência das alterações renais e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função renal encontradas nos tratamentos, estão apresentadas na (Tabela 4).

Tabela 4 Ocorrência de alterações no tecido renal de juvenis Pintado-da-Amazônia alimentados com diferentes níveis de adição de glicerina bruta à ração.

ALTERAÇÃO	ESTÁGIO	DIETAS				
		0,0%	5,0%	7,5%	10,0%	12,5%
Hipertrofia nuclear	I	0+	0+	0+	+	+
Dilatação da luz tubular	I	0	0	0	0+	0
Oclusão da luz tubular	II	+	+	0+	0+	0+

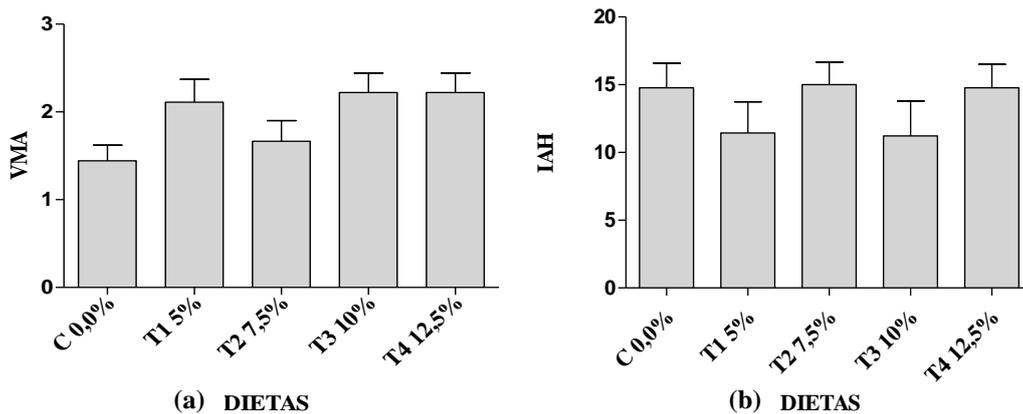
0 = inexistente; 0+ = alteração de rara ocorrência; + = alteração ocorrente; ++ = alteração bastante ocorrente; +++ = alteração de intensa ocorrência.

Os resultados do valor médio de alterações e índice de alterações histopatológicas estão apresentados na Figura 4. Assim, como foi observado na análise hepática o Valor Médio de Alteração Histológica (VMA) obtida para as alterações renais não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as dietas experimentais (5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5% de glicerina

bruta) e controle (figura 4a). As alterações se apresentaram distribuídas de forma pontual na área renal, pois não ultrapassaram o grau 2.

O Índice de Alteração Histológica (IAH) também não apresentou diferença significativa (figura 4b) demonstrando que as alterações renais não foram graves a fim de comprometer o funcionamento do órgão.

Figura 4 Valores médios de VMA e IAH no rim de pintado-da-Amazônia. Dados são média \pm desvio padrão ($p > 0,05$).



Não foram encontrados trabalhos associando a histologia renal de peixes com a dieta contendo glicerina bruta. No entanto, há alguns relatos para outras espécies de monogástricos como suínos por exemplo, em que não se verificou frequência de lesões histológicas no rim (LAMMERS, et al., 2008a). Em ruminantes, Leão et al. (2012) também não observou alterações patológicas nas amostras renais de bovinos alimentados com glicerina bruta.

4 CONCLUSÃO

A inclusão de até 12,5% de glicerina bruta em dietas de pintado-da-Amazônia em substituição parcial do milho pode ser utilizada sem causar alterações hepáticas e renais. Visto que as alterações encontradas nos dois tecidos foram consideradas lesões que não comprometem o funcionamento do órgão ou lesões reversíveis.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; CARMO, C.A.; PAULA EDUARDO, J.L. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 260-268, 2008.
- ALMEIDA FILHO, R.L.; HONORATO, C.A.; ALMEIDA, L.C.; USHIZIMA, T.T.; SANTA MARIA, F.M. 2012 Nutrição de surubim (*Pseudoplatystoma* ssp.) - Desafio para Aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, art. 178, v. 9, n. 5, p. 1995 – 2010, 2012.
- BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; BRAZ, D.B.; ALMEIDA, V.V.; TSE, M.L.P.; MIYADA, V.S. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1491-1496, 2010.
- DONKIN, S.S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 280-286, 2008.
- FERNANDEZ, W. S.; DIAS, J. F.; RIBEIRO, C. A. O.; AZEVEDO, J. S. Liver Damages and nuclear abnormalities In Erythrocytes of *Atherinella Brasiliensis* 104 (*Actynopterigii*, *Atherinopsidade*) from two beaches In Southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 59, n. 2, p. 163-169, 2011.
- FERRAZ DE LIMA, C.L.B.; REIS, N.S.; CECCARELLI, P.S. Estudo topográfico e histológico do rim de pacu *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1987(Teleostei, Serrasalminae). **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 6, n.2, p.41-52,1993.
- HONORATO, C.A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J.; MACHADO, M.RF.; NASCIMENTO, C.A. SATURNINO, K.C. Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34 supl.1 Rio de Janeiro, 2014.
- LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; WEBER, T. E.; BREGENDAHL, K.; LONERGAN, S. M.; PRUSA, K. J.; AHN, D. U.; STOFFEGREN, W. C.; HONEYMAN, M. S. Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin supplemented diets. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2962-2970, 2008 a.
- LAMMERS, P.; KERR, B.J.; HONEYMAN, M.S.; STALDER, K.; DOZIER, W.A.; WEBER, T.E.; KISS, M.T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008b.
- LAMMERS, P.; KERR, B.J.; WEBER, T.E.; DOZIER, W.A.; KISS, M.T.; BREGENDAHL, K.; HONEYMAN, M.S. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 602-608, 2008c.
- LEAO, J.P.; RAMOS, A.T.; MARUO, V.M.; SOUZA, D.P.M.; NEIVA, J.N.M.; RESTLE, J.; MORON, S.E. Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1253-1256, 2012.
- LI, M.H., MINCHEW, C.D., OBERLE, D.F.; ROBINSON, E.H. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish *Ictalurus punctatus*; **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, 2010.

- MOESCH, A.; VOLKWEIS, M.I.; CARNEIRO, Z.W. F.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D. Growth, body composition and hepatopancreas morphology of Nile tilapia fingerlings fed crude glycerol as a replacement for maize in diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, 122 – 131, 2016.
- NEU, D.H.; FURUYA, W.M.; BOSCOLO, W.R.; POTRICH, F.R.; LUI, T.A.; FREIDEN, A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, 19, 211-217, 2012.
- OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue: a rich source of glycerol and medium chain triglycerides. **Journal of Oleo Science.**, v.53, n.1, p.29-33, 2004.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, cap. 30, p. 339-352, 1994.
- RAŠKOVIÉ, B.S.; STANKOVIÉ, M.B.; MARKOVIÉ, Z.Z.; POLEKSIÉ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, p. 87-100, 2011.
- ROCHA, R. M.; COELHO, R. P.; MONTES, C. S.; SANTOS, S.S.D, FERREIRA, M.A.P. Avaliação histopatológica do fígado de *brachyplatystoma rousseauxii* (castelnau, 1855) da baía do guajará, Belém, Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n.1, 2010.
- SABAINI, D.S.; CASAGRANDE, L.P.; BARROS, A.F. Viabilidade econômica da criação do pintado da Amazônia (*pseudoplatystoma* spp.) em tanques-rede no estado de Rondônia, Brasil. Bol. **Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 825 – 835, 2015.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. Dordrecht. **Journal aquatic ecosystem stress recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.