



DIEGO VICENTE DA COSTA

**INFLUÊNCIA DO GLICEROL NO
METABOLISMO ENERGÉTICO DE TILÁPIAS
NILÓTICAS**

LAVRAS – MG

2012

DIEGO VICENTE DA COSTA

**INFLUÊNCIA DO GLICEROL NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE
TILÁPIAS NILÓTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Nutrição de não-ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dra. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS - MG
2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Costa, Diego Vicente da.

Influência do glicerol no metabolismo energético de tilápias
nilóticas / Diego Vicente da Costa. – Lavras : UFLA, 2012.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Energia. 3. Nutrição. 4. Peixe. 5.
Rota metabólica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3758

DIEGO VICENTE DA COSTA

**INFLUÊNCIA DO GLICEROL NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE
TILÁPIAS NILÓTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Nutrição de não-ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 8 de dezembro de 2011.

Dr. Daniel Okamura UFLA

Dr. Paula Adriane Perez Ribeiro UFMG

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Prof. Dr. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS - MG

2011

“Gostaria de ser hábil em exteriorizar o que sinto e aclarar o que está além do lógico, sucinto, entretanto, agora devo ser e me ater a esses códigos semióticos, os quais, em minhas mãos, não são capazes de transcender o óbvio, de que foi no campo científico-pedagógico onde meu laço com o saber tornou-se lúdico.

Na pós-graduação vislumbrei um vasto mundo, repleto de informação, o qual, além de sobrepujar minha limitada mundana compreensão, deixou-me simultaneamente tomado por perplexidade e admiração, sentimentos esses que propiciaram que a pesquisa se tornasse em minha vida, a mais nova paixão, minimizando o fantasma da inépcia e tornando assídua e diligente minha busca por informação.

Sei que não é preciso ser nenhum gênio para se obter um título de mestre, contudo se faz necessário prostrar uma série de testes, que não dizem respeito somente à academia, mas tangenciam também a íntima vida,

pois compreendi que traçar objetivos e fazer sonhos terem valia, algum revés traz, como ter que conviver com a saudade da família, por quem indubitavelmente tenho gratidão infinita, pois amparou-me por toda a vida, para que usufrísse de minha pouca capacidade cognitiva.

Por fim, parcamente relato minha alegria nestes mal escritos e livres versos,

com o intuito de compartilhar toda a satisfação imbuída em meu interior universo,

permitindo uma alforria de energias positivas, que fazem de mim um homem em felicidade imerso.”

Aos meus pais Edson e Dulce e ao meu irmão Saulo, por fomentarem
meus estudos,
DEDICO.

RESUMO GERAL

A aquicultura nos últimos anos, em contraste à estagnação da produção de pescado de origem extrativista, vem se desenvolvendo cada vez mais e pode ser beneficiada com o corrente excesso de glicerol no mercado, podendo utilizá-lo como uma fonte dietética de energia na nutrição dos peixes, em alternativa às fontes convencionalmente utilizadas. Objetivou-se com este trabalho estudar a influência da substituição do amido pelo glicerol na dieta de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre metabolismo energético. Foi determinado o peso, IHS (índice hepatossomático), concentrações plasmáticas, musculares e hepáticas de proteína, glicose e triglicerídeos, além das atividades hepáticas das enzimas málica, glicerol quinase e glicose-6-fosfato desidrogenase. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de inclusão de glicerol na ração) e seis repetições. Foram utilizados 48 machos sexados de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), com peso e comprimento médio inicial de $37,7\text{g} \pm 10,6\text{g}$ e $13,02 \pm 1,09$ cm, respectivamente. Os peixes foram aleatoriamente distribuídos em 4 tanques circulares de fibra de vidro, com capacidade total de 100L cada. A dieta foi fornecida por 60 dias, *ad libitum*, duas vezes ao dia, sendo isoenergética com 4500 Kcal de energia bruta e isoprotéica com 36% de proteína bruta. Os resultados foram analisados com auxílio do software SAEG, segundo teste F a 5% de significância. Os níveis de glicerol da dieta não influenciaram as variáveis de desempenho estudadas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para glicose muscular e plasmática. O tratamento com 0% de glicerol apresentou maior glicose hepática, comparado ao tratamento com 15%. Não houve diferença significativa nas concentrações de proteínas avaliadas. Os níveis de glicerol da dieta não influenciaram a quantidade de triglicerídeos plasmáticos. O tratamento com 15% de glicerol na dieta resultou em maiores níveis de triglicerídeos musculares e hepáticos. Os tratamentos com 10 e 15% de glicerol apresentaram maiores atividades da enzima G6PD, comparados ao tratamento com 5% de glicerol, entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos para atividade da enzima málica e glicerol quinase ($P > 0,05$). Pode-se concluir que a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é hábil em metabolizar o glicerol dietético, sendo este nutriente uma potencial fonte energética na dieta em detrimento ao amido.

Palavras-chave: Glicerol. Nutrição. Rota metabólica. Peixes.

GENERAL ABSTRACT

Aquaculture in recent years, as opposed to stagnation of extractive fish production, has developed increasingly and may be benefited from the current excess of glycerol in market, using it as a dietary source of energy to fish, alternatively to conventional sources. The present study aimed to evaluate the influence of starch substitution by glycerol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet on energy metabolism. It was determined the weight, hepatosomatic index, plasma, muscle and liver concentration of protein, glucose and triglycerides, as well as the activities of hepatic malic, glycerol kinase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase enzymes. The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments (0, 5, 10 and 15% inclusion of glycerol in the feed) and six repetitions. We used 48 male sexed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with initial average weight and length of $37.7\text{g} \pm 10.6\text{g}$ and 13.02 ± 1.09 cm, respectively. The fish were randomly divided into 4 circular tanks of fiberglass, with a total capacity of 100L each. The diet was provided for 60 days, *ad libitum*, twice daily and were isoenergetic with 4500 kcal of gross energy and isoproteic with 36% of crude protein. The results were analyzed using the software SAEG, according to F test at 5% significance. The levels of glycerol in the diet did not influence the performance variables studied. There was no significant difference between treatments for muscle and plasma glucose. Treatment with 0% glycerol showed higher hepatic glucose compared to treatment with 15%. There was no significant difference in protein concentrations evaluated. Levels of glycerol in the diet did not influence the amount of plasma triglycerides. Treatment with inclusion of 15% of glycerol in the diet resulted higher levels of muscle and liver triglycerides. Treatments with 10 and 15% glycerol showed higher activity of G6PD enzyme, compared to the treatment with 5% of glycerol, however, there was no significant difference among treatments on malic enzyme activity ($P > 0,05$). It was concluded that Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is able to metabolize dietary glycerol, which is a potential source of energy in diet over the starch.

Keywords: Fish. Glycerol. Metabolic pathway. Nutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	Reação da produção do biodiesel a partir da transesterificação do óleo vegetal	14
Figura 2	Ilustração esquemática de produção de biodiesel.....	14
Figura 3	Ilustração de uma molécula de glicerol	16

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1	Percentage composition of experimental diets	33
Table 2	Mean values of weight, standard length (SL), hepatosomatic index (HSI) of juvenile tilapia (<i>O. niloticus</i>) fed different concentrations of glycerol	34
Table 3	Effect of treatments on glucose, triglycerides and protein concentration in different tissues of juvenile Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>).....	36
Table 4	Effect of treatments on malic (EM), glycerol kinase (GK) and glucose-6-P dehydrogenase (G6PD) enzyme activity (U/mg protein) in liver of Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	40

APENDICES

Tabela 1	Análise de variância da concentração de glicose muscular.....	48
Tabela 2	Análise de variância da concentração de glicose no fígado	48
Tabela 3	Análise de variância da concentração de glicose no plasma	48
Tabela 4	Análise de variância da concentração de triglicerídeo muscular.....	48
Tabela 5	Análise de variância da concentração de triglicerídeo no fígado	49
Tabela 6	Análise de variância da concentração de triglicerídeo no plasma	49
Tabela 7	Regressão quadrática da concentração de triglicerídeo muscular	49
Tabela 8	Regressão quadrática da concentração de triglicerídeo no fígado.....	49
Tabela 9	Análise de variância da concentração de proteína no músculo	50
Tabela 10	Análise de variância da concentração de proteína no fígado.....	50
Tabela 11	Análise de variância da concentração de proteína no plasma	50
Tabela 12	Análise de variância da atividade da enzima málica	50
Tabela 13	Análise de variância da atividade da enzima GK.....	50
Tabela 14	Análise de variância da atividade da enzima G6PD.....	51

LISTA DE ABREVIÇÕES

COMP	COMPRIMENTO PADRÃO
DHA	DIHIDROXICETONA
DHAP	DIHIDROXIACETONA-FOSFATO
EB	ENERGIA BRUTA
EM	ENZIMA MÁLICA
G3P	GLICEROL-3-FOSFATO
G6PD	GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE
GK	GLICEROL QUIINASE
IHS	ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO
NADPH	NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO FOSFATO
PB	PROTEÍNA BRUTA
TAG	TRIACILGLICEROL

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução Geral	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	O biodiesel e sua produção	12
3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GLICEROL	16
4	METABOLISMO DO GLICEROL	18
5	GLICEROL COMO FONTE DE ENERGIA NA DIETA DE PEIXES	19
	REFERÊNCIAS	23
	CAPÍTULO 2 Influence of glycerol on energy metabolism in Nilotic Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	27
1	INTRODUCTION	28
2	MATERIALS AND METHODS	30
3	RESULTS AND DISCUSSION	34
4	CONCLUSION	44
	REFERENCES	45
	APÊNDICES	48

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O exponencial crescimento da população mundial e a constante progressão da demanda por insumos básicos à sobrevivência excitam pesquisadores de todas as áreas do conhecimento a concentrarem suas atenções em algumas questões que sustentam a continuidade e perpetuação da humanidade, a citar o desenvolvimento de fontes renováveis de energia e o aumento da produção de alimentos.

Afim de minimizar a dependência de recursos energéticos extinguíveis, o biodiesel tornou-se uma alternativa para a substituir os combustíveis fósseis, obtendo maior visibilidade no cenário econômico brasileiro 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. No entanto, a produção de biodiesel gera considerável quantidade de glicerina, que tem se tornado um co-produto abundante no mercado.

A aquicultura cada vez mais tem contribuído para a produção mundial de alimentos, possuindo índices consideráveis de crescimento em detrimento à pesca extrativa, contudo, ainda encontram-se alguns obstáculos que dificultam sua expansão, como a dependência de ingredientes dietéticos pouco abundantes e que oneram a produção, já que a alimentação representa a maior parcela dos custos de produção do pescado em cativeiro. Assim, surge a necessidade em se avaliar fontes de energia dietética alternativas às convencionalmente utilizadas.

São escassos na literatura os trabalhos a respeito da utilização da glicerol em dietas para peixes, o que remete a importância de se utilizar uma fonte pura para conhecimento incipiente. A glicerina possui grande variação em sua composição, em função da matéria prima utilizada e seu processamento na

produção do biodiesel. Esta ausência de padronização da glicerina também foi determinante na escolha do glicerol, denominações que no presente trabalho dizem respeito especificamente aos compostos bruto e purificado, respectivamente, como objeto de estudo.

Assim, com o atual cenário favorável para o crescimento da aquicultura bem como para produção de biodiesel, o levantamento de informações aliado à experimentação animal sobre a utilização do glicerol como ingrediente energético na dieta e seu destino metabólico nos peixes, faz-se necessário para avaliar a substituição de fontes de energia dietéticas convencionalmente usadas e embasar estudos posteriores com glicerina na nutrição de peixes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O biodiesel e sua produção

A crescente preocupação em relação ao aquecimento global no século XXI tem promovido um aumento significativo nas discussões sobre fontes alternativas de energia (Gonçalves, 2006). Assim, a produção de biocombustíveis tem por objetivo fornecer uma fonte de combustível renovável que reduza a dependência do petróleo (Dozier et al., 2008).

De acordo com a Resolução ANP nº 7, do dia 19 de março de 2008, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é definido como um composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais, conforme a especificação contida no Regulamento Técnico ANP nº7, integrante nesta Resolução (ANP, 2008).

A produção de biodiesel se encontra em crescimento, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu obrigatoriedade de adição de 5% de mistura de biodiesel ao óleo diesel, de acordo com a resolução nº 6/2009, do Conselho Nacional de Política Energética, sancionada em outubro de 2009.

Uma das principais vantagens do uso de biodiesel é menor emissão de gases poluentes (Silva & Freitas, 2008). Barnwal & Sharma (2005) concluíram que o SO₂ é totalmente eliminado, a fuligem diminui em 60%, o monóxido de carbono e os hidrocarbonetos diminuem em 50%, os hidrocarbonetos poliaromáticos são reduzidos em mais de 70% e os gases aromáticos diminuem em 15%, na combustão do biodiesel comparada à do diesel oriundo do petróleo.

O biodiesel é considerado um combustível limpo, o qual apresenta redução das emissões gasosas após sua queima, sobretudo, por não conter enxofre e hidrocarbonetos poliaromáticos, muitos dos quais são carcinogênicos.

Comparado ao diesel de petróleo, o biodiesel pode reduzir em até 78% as emissões de gás carbônico e, em mais de 90%, as emissões de óxido de enxofre (Gazzoni, 2008).

Projeções da UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura) indicam que a população brasileira atingirá 210 milhões de habitantes em 2020. É muito provável que esse aumento de população e as conseqüências da alta densidade demográfica venham a dobrar o consumo energético. O biodiesel será requerido em enormes quantidades, com produção limitada apenas pela biomassa necessária para a sua formação (UNESCO, 2007; citado por Ferrão-Gonzales et al., 2008).

O biodiesel pode ser produzido através de processos de craqueamento, esterificação ou por transesterificação (Ferrão-Gonzales et al., 2008). A transesterificação, conforme demonstrado na Figura 1 é o processo mais comum para a produção de biodiesel. Consiste numa reação química dos óleos ou gorduras com o etanol ou metanol, estimulada por um catalisador alcalino homogêneo (NaOH ou KOH), da qual também se extrai a glicerina bruta, que pode ser tratada e utilizada na indústria química, onde tem diversas aplicações (Figura 2) (Cerrate et al., 2006). O processo de transesterificação é afetado pela razão molar do álcool/óleo, catalisador, temperatura, tempo de reação e o conteúdo de água e ácidos graxos livres (Pinto, 2005), sendo a reação feita com metanol tecnicamente mais viável do que a com etanol comercial, porque a água existente no etanol (4 a 6%) retarda a reação (Ramos et al., 2003).

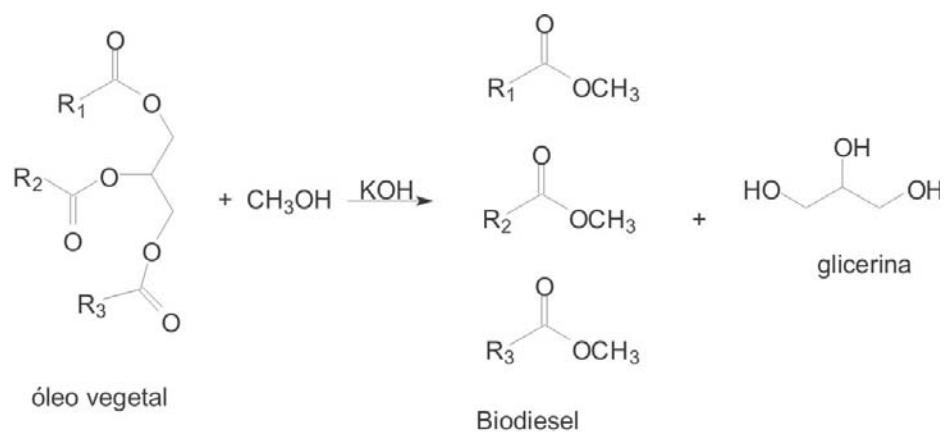


Figura 1 Reação da produção do biodiesel a partir da transesterificação do óleo vegetal

Fonte: (Gonçalves, 2006).

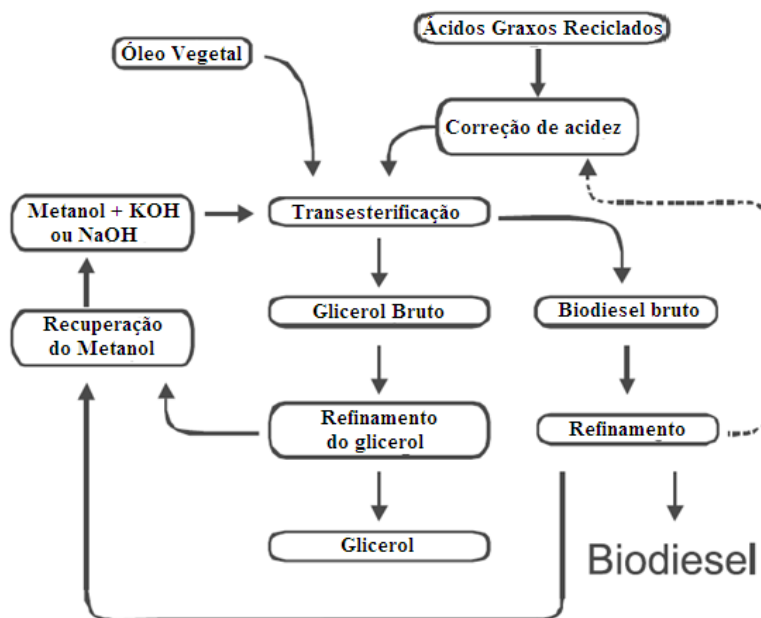


Figura 2 Ilustração esquemática de produção de biodiesel

Fonte: Pinto et al. (2005).

De acordo com Diniz (2005) e Swiatkiewicz et al. (2009), a cada 1000 kg de óleo utilizado na produção de biodiesel, são produzidos de 90 a 110 kg de glicerina, cerca de 10% do peso total de óleo utilizado na produção de biodiesel. Tal glicerina bruta possui valor muito baixo por causa das impurezas (Thompson & He, 2006) como água, catalisador (alcalino ou ácido), álcool não reagido, impurezas provindas dos reagentes, ácidos graxos, ésteres, etanol ou metanol, propanodióis, monoéteres, oligômeros de glicerina e polímeros (Pinto et al., 2005) . Com a demanda e a produção de biodiesel crescente, a quantidade de glicerina bruta gerada será considerável, e sua utilização se tornará um tema importante (Thompson & He, 2006).

A rentabilidade dos vários sistemas de produção depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Assim, existem diversos trabalhos que visam utilizar o glicerol na sua forma purificada ou no reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis (Rivaldi et al., 2008).

Estudos realizados no Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA - ESALQ/USP), sobre os custos de produção de biodiesel, demonstraram a grande importância dos subprodutos na contabilidade final da indústria integrada do biodiesel (Barros et al., 2006). Estes estudos demonstram que a produção comercial do biodiesel gera um excesso de formação da glicerina, necessitando buscar aplicações da mesma em larga escala, para agregar valor à cadeia produtiva.

3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GLICEROL

Glicerol ou 1,2,3-propanotriol é um composto orgânico pertencente à função álcool, líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (FAO, 2007). A sua forma estrutural está representada na figura 3. Na natureza, o glicerol está ligado nos ácidos graxos e formam o mono, di ou triacilglicerol, moléculas que compõem a maior fração da gordura animal e vegetal (Rivaldi et al., 2008).

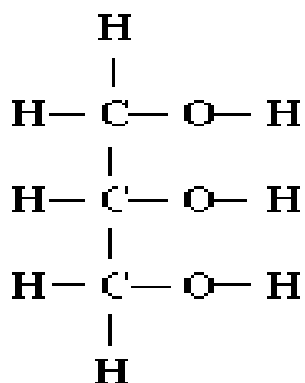


Figura 3 Ilustração de uma molécula de glicerol

Fonte: Jungermann et al. (1991).

O glicerol é reconhecido como seguro para o consumo humano, de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*, dos Estados Unidos), onde se atribuiu ao glicerol o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) – Geralmente Reconhecido como Seguro, quando usado como aditivo alimentar, segundo as boas normas de fabricação e alimentação, inclusive na alimentação humana (CFR, 2003). Pode ser utilizado em diversos produtos alimentícios para os mais diferentes propósitos, tais como umectante, solvente, amaciante e emulsificante. No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela

Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA).

De acordo com Swiatkiewicz et al. (2009), a glicerina bruta geralmente apresenta de 80 a 90% de glicerol, de 10 a 20% de umidade, cinzas (principalmente sais de Na), ácidos graxos livres e traços de proteína e metanol. Com isso a glicerina originada no processo de transesterificação na produção de biodiesel possui composição variada. Segundo Menten et al. (2008), nas plantas de produção de biodiesel no Brasil, o álcool utilizado é o metanol, assim como o catalisador mais utilizado é o hidróxido de sódio. Desta forma, existe um resíduo de sódio na glicerina bruta gerada neste processo. As concentrações de água, glicerol, fósforo, metanol, e cinzas também é variável devido ao processo de fabricação.

O teor de metanol é uma das principais preocupações para utilização da glicerina na alimentação animal. No entanto, o metanol tem o ponto de evaporação baixo (65°C), podendo ser eliminado durante o processo de extrusão da ração. Tyson et al. (2004) sugeriram que o problema fundamental com a glicerina do biodiesel é o teor de sal. Dependendo do catalisador usado na produção do biodiesel, a glicerina bruta gerada pode conter 6-8% de sais de sódio ou potássio. Fica evidente que o valor máximo de inclusão de glicerina bruta na dieta de animais pode ser limitada pelo excesso de sódio presente no produto (Menten et al., 2008)

Apesar de o glicerol ser geralmente considerado como seguro quando utilizado em conformidade com as boas práticas de manufatura e de alimentação, são escassos na literatura os trabalhos a respeito da utilização deste nutriente em dietas para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, o que remete a importância de se utilizar uma fonte purificada para conhecimento incipiente, tendo em vista a falta de informação de como esse ingrediente é metabolizado pela citada espécie.

4 METABOLISMO DO GLICEROL

O glicerol pode ser derivado da hidrólise dos triglicerídeos presentes no tecido adiposo, na gordura dietética e nas lipoproteínas do sangue. Está presente em diversas espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos. No entanto, é difícil ser encontrado na forma livre, pois geralmente encontra-se combinado a ácidos graxos.

De acordo com Mourot et al. (1994) o glicerol liberado a partir do catabolismo de triacilgliceróis pode ser convertido em glicose através da fosforilação em glicerol-3-fosfato, catalisada pela glicerol quinase, que em seguida pode seguir para gliconeogênese no fígado. O glicerol-3-fosfato também é precursor na síntese de triacilgliceróis e de fosfolipídeos. Além disso, glicerol-3-fosfato pode ser oxidado pela glicerol-fosfato-desidrogenase, produzindo diidroxiacetona-fosfato (DHAP), um precursor para a formação de glicose através da gliconeogênese (Emmanuel et al. 1983). Outra eventual rota do glicerol-fosfato é via glicolítica e, finalmente, o ciclo de Krebs, para produzir ATP (adenosina trifosfato) (Rosebrough et al. 1980).

O que vai definir qual rota o glicerol vai seguir no organismo será a condição fisiológica do animal. Entretanto, existe pouca informação sobre as implicações metabólicas da suplementação exógena de glicerol na dieta de peixes.

5 GLICEROL COMO FONTE DE ENERGIA NA DIETA DE PEIXES

A nutrição visa o fornecimento de energia para as atividades metabólicas, participando assim dos processos de catabolismo/anabolismo. Portanto, a energia não pode ser considerada um nutriente, mas sim o resultado dos processos de oxidação dos nutrientes adquiridos via dieta, como proteína, lipídeos e carboidratos, que poderão ser liberados como calor ou armazenados para uso posterior nos animais (Bicudo, 2008).

Em todas as atividades realizadas pelos animais ocorre gasto de energia. Estas atividades vão desde atividades bioquímicas, fisiológicas até mecânicas, que são essenciais para a sobrevivência, o crescimento e a reprodução dos animais. Os custos destas atividades são considerados no momento de formular uma ração para uma espécie animal, visando atender suas exigências energéticas (Kosh & Wieser, 1983).

Peixes carnívoros são mais eficientes em utilizar os lipídios como fonte de energia devido à capacidade limitada de seu metabolismo em controlar a glicemia (Caseras et al., 2002; Hemre et al., 2002), sendo os triglicerídeos a principal forma de armazenamento da energia corporal para estas espécies. O acúmulo dos triglicerídios é evidenciado no tecido adiposo, visceral e muscular (Wang et al., 2005; Zhong et al., 2007) e pode representar a forma de gordura mais abundante nestes tecidos.

Os peixes apresentam alta necessidade de proteína em comparação aos outros animais, porém estes apresentam baixa necessidade de energia. Essa menor necessidade de energia pode se resumir a três razões básicas. A primeira razão é que eles não precisam de energia para manutenção da temperatura corporal como os mamíferos. Uma segunda razão é que os peixes minimizam a energia exigida pelos músculos para manter seu equilíbrio, já que vivem na água. Uma vez que muitos peixes têm bexigas natatórias para ajudar a manter a

sua posição na coluna de água, exigem menos atividade muscular para manter a sua posição no espaço. Uma terceira razão para a menor necessidade de energia dos peixes é que excretam cerca de 85% de resíduos metabólicos como a amônia (NH_3) diretamente pelas brânquias na água circundante, com um custo mínimo de energia. Em contrapartida, os mamíferos gastam energia para produção de uréia, enquanto que as aves gastam energia para produzir o ácido úrico, para posteriormente serem excretados.

O uso da glicerina ou do glicerol puro em rações não é recente, a partir do momento que este produto apareceu no mercado, vem sendo estudado como possível ingrediente energético na alimentação animal (Bernal et al., 1978; Simon et al., 1996). Atualmente, com o crescimento da produção do biodiesel, a glicerina voltou a ser estudada por alguns pesquisadores que tentam entender melhor seu efeito e estabelecer níveis seguros para sua utilização.

A energia bruta do glicerol puro é de cerca de $4310 \text{ kcal.kg}^{-1}$, e é eficientemente usada por aves. O valor energético da glicerina bruta resultante de cada processo industrial, deve ser mensurado em função de sua pureza em glicerol, devido às diversas impurezas que podem estar presentes no produto (Dozier et al., 2008). São necessárias mais pesquisas para se determinar o valor da energia digestível do glicerol para peixes.

Em estudos sobre a adição de glicerina bruta como fonte de energia em dietas de catfish (*Ictalurus punctatus*), Li et al., (2010) avaliaram cinco dietas experimentais, com os níveis de 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina bruta, em substituição ao milho. Os autores não encontram diferenças significativas no consumo alimentar, ganho de peso, taxa de eficiência alimentar e níveis de lipídios no sangue dos peixes alimentados com as dietas de 0, 5 e 10% de glicerina. Entretanto, os peixes alimentados com ração contendo 15 e 20% de glicerina bruta apresentaram redução no ganho de peso, na eficiência alimentar e no teor de lipídios no fígado. No que diz respeito às análises teciduais, os autores

não verificaram diferenças estatísticas no teor de proteína bruta, porém, constataram um decréscimo no teor de lipídios e um aumento no teor da umidade do filé, quando aumentava-se o nível de glicerina na dieta. Os autores sugerem que o decréscimo no teor de lipídios, tanto no fígado quanto no filé, pode ser explicado pela deficiência do catfish em metabolizar o glicerol para lipídeo. Catfishs alimentados com 5% de glicerina na dieta apresentaram maiores níveis de glicemia do que os peixes alimentados com a dieta controle. Quando se elevou os níveis de glicerol na dieta para 10, 15 e 20%, o nível de glicose no plasma, em geral, diminuiu. Os autores justificam que os níveis de glicose circulante também são influenciados por outros carboidratos. Foi concluído que o catfish pode utilizar cerca de 10% de glicerina bruta na dieta sem que os peixes apresentem efeitos adversos sobre os parâmetros avaliados.

Menton et al. (1986) examinaram o glicerol como fonte de energia dietética para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em substituição de parte de farelo de trigo. Eles constataram que a utilização de glicerol em níveis de até 12%, em dietas de baixa energia, não afetou o crescimento dos peixes, a conversão alimentar e a composição da carcaça. As trutas arco-íris alimentadas com dietas de 6 e 12% de glicerol apresentaram um aumento do nível de glicose no plasma, mas não tiveram diferença na concentração de glicogênio hepático. A inclusão de glicerol livre nas dietas experimentais não teve efeito significativo sobre a composição final da carcaça. O glicerol não foi um precursor eficaz para a lipogênese na espécie estudada.

Em estudo realizado com tilápias do Nilo alimentadas com quatro níveis de inclusão de glicerol (2,5; 5,0; 7,5 e 10%) além de uma dieta controle, isenta do alimento, Neu (2011) relatou que não houve diferença significativa para os parâmetros de desempenho zootécnico. Com relação aos parâmetros bioquímicos, a lipoproteína HDL foi superior no grupo de peixes alimentados com 0,0 e 7,5%, não diferindo dos animais que foram alimentados com 5,0 e

10,0%. Para a composição centesimal dos juvenis de tilápia não foi verificada diferença significativa, com exceção dos lipídeos que tiveram os maiores valores nos peixes alimentados com 5,0% de glicerol, e os menores nos peixes alimentados com 10,0% do alimento. O glicerol pode ser incluído na dieta até o nível de 10%, suprimindo a demanda energética sem prejudicar o desempenho zootécnico, higidez e composição bioquímica e centesimal dos peixes.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução nº 7**, de 19 de março de 2008. Regulamento Técnico aplicado ao biodiesel. Brasília, 2008. Disponível em:

<http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucao_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml>. Acesso em: 10 dez. 2011.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 386**, de 5 de agosto de 1999. Regulamento Técnico sobre Aditivos Alimentares utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções. Brasília, 1999. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm>. Acesso em: 12 dez. 2011.

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, New York, v. 9, n. 4, p. 368-378, Aug. 2005.

BARROS, G. S. A. C.; SILVA, A. P.; PONCHIO, L. A. Custos de produção de biodiesel no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 36-50, 2006.

BERNAL, J. Efecto de la inclusión de glycerol o aceite vegetal a dietas com melaza para suínos e aves em crecimiento. **Veterinária Mexico**, Coyoacán, v. 3, p. 91-94, 1978.

BICUDO, A. J. A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887):** proteína, energia e aminoácidos. 2008. 123 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2008.

CASERAS, A. et al. 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, Dec. 2002.

CERRATE, S. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, Nov. 2006.

Code of Federal Regulations. **Part 582, substances generally recognized as safe:** subpart B, general purpose food additives: 21CFR582. Washington, 2003. §582.1320.

Conselho Nacional de Política Energética. **Resolução CNPE Nº 6**, de 16 de setembro de 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Brasília, 2009. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml>. Acesso em: 12 dez. 2011.

DINIZ, G. **De coadjuvante a protagonista:** glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2005. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/quimica/de-coadjuvante-a-protagonista>>. Acesso em: 4 set. 2011.

DOZIER, W. A. et al. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 2, p. 317-322, Feb. 2008.

EMMANUEL, B.; BERZINS, R.; ROBBLEE, A. R. Rates of entry of alanine and glycerol and their contribution to glucose synthesis in fasted chickens. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 24, n. 4, p. 565-571, Aug. 1983.

FERRÃO-GONZALES, A. D. et al. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. **Diálogos & Ciência**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 65-78, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2007. 162 p.

GONÇALVES, V. L. C. **Biogasolina:** produção de éteres e ésteres de glicerina. Brasília: Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica, 2006. 19 p.

HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 175-194, Sept. 2002.

- KOSH, F.; WIESER, W. Partitioning of energy in fish: can reduction of swimming activity compensate for the cost of production? **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 197, n. 1, p. 141-146, Apr. 1983.
- LI, H. M. et al. 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, Feb. 2010.
- MENTEN, J. F. M.; MIYADA, V. S.; BERENCHTEIN, B. **Glicerol na alimentação animal**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2008. 101 p.
- 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, p. 215-227, 1986.
- MOUROT, J. et al. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig: consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 237-244, Apr. 1994.
- NEU, D. H. **Glicerol na dieta de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.
- PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 28-37, 2003.
- RIVALDI, J. D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2008.

ROSEBROUGH, R. W. et al. Effects of dietary energy substitutions on reproductive performance, feed efficiency, and lipogenic enzyme activity on large white turkey hens. **Poultry Science**, Faisalabad, v. 59, n. 7, p. 1485-1492, July 1980.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 843-851, maio/jun. 2008.

SIMON, A.; BERGNER, H.; SCHWABE, M. Glycerol: feed ingredient for broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 103-112, 1996.

SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 615-619, Mar. 2009.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Michigan, v. 22, n. 2, p. 261-265, Apr. 2006.

TYSON, K. S. et al. **Biomass oil analysis: research needs and recommendations**. Colorado: Technical Report National Renewable Energy Laboratory Golden, 2004. 92 p.

WANG, J. T. et al. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 1/4, p. 439-447, Sept. 2005.

ZHONG, Y. et al. Compositional characteristics of muscle and visceral oil from steelhead trout and their oxidative stability. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 2, p. 602-608, Dec. 2007.

CAPÍTULO 2 Influence of glycerol on energy metabolism in Nilotic Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

Aquaculture in recent years, as opposed to stagnation of extractive fish production, has developed increasingly and may be benefited from the current excess of glycerol in market, using it as a dietary source of energy to fish, alternatively to conventional sources. The present study aimed to evaluate the influence of starch substitution by glycerol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet on energy metabolism. It was determined the weight, hepatosomatic index, plasma, muscle and liver concentration of protein, glucose and triglycerides, as well as the activities of hepatic malic, glycerol kinase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase enzymes. The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments (0, 5, 10 and 15% inclusion of glycerol in the feed) and six repetitions. We used 48 male sexed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with initial average weight and length of $37.7 \text{ g} \pm 10.6 \text{ g}$ and $13.02 \pm 1.09 \text{ cm}$, respectively. The fish were randomly divided into 4 circular tanks of fiberglass, with a total capacity of 100L each. The diet was provided for 60 days, *ad libitum*, twice daily and were isoenergetic with 4500 kcal of gross energy and isoproteic with 36% of crude protein. The results were analyzed using the software SAEG, according to F test at 5% significance. The levels of glycerol in the diet did not influence the performance variables studied. There was no significant difference between treatments for muscle and plasma glucose. Treatment with 0% glycerol showed higher hepatic glucose compared to treatment with 15%. There was no significant difference in protein concentrations evaluated. Levels of glycerol in the diet did not influence the amount of plasma triglycerides. Treatment with inclusion of 15% of glycerol in the diet resulted higher levels of muscle and liver triglycerides. Treatments with 10 and 15% glycerol showed higher activity of G6PD enzyme, compared to the treatment with 5% of glycerol, however, there was no significant difference among treatments on malic enzyme activity ($P > 0,05$). It was concluded that Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is able to metabolize dietary glycerol, which is a potential source of energy in diet over the starch.

Keywords: Fish. Glycerol. Metabolic pathway. Nutrition.

1 INTRODUCTION

The vast majority of worldwide energy consumed comes from fossil source, therefore exhaustible. This leads researchers around the world to discuss the feasibility of using alternative energy sources rather than oil, primarily renewable sources, which, in total balance, decrease reliance on nonrenewable energy sources and contribute to sustainable development.

The production process of biodiesel produces large amounts of gross glycerin, which is the main co-product and represents approximately 10% of the total production of biodiesel. The recent growth in biodiesel production has generated an excess of this glycerin on market, resulting in lower costs compared to other energy sources used in animal nutrition.

However, crude glycerin presents impurities such as water, salts, esters, alcohol and residual oil. The percentage of glycerol in the mixture ranges from 65 to 70% (w/w) and most of the impurities is formed by reaction of free fatty acids with alcohol and in presence of catalyst, creating a problem of standardization on the process of synthesis of the co-product and hence, hindering their application in animal nutrition. There are few studies in the literature regarding the use of glycerol in diets for fish, which suggests the importance of using a pure source for incipient information, annulling the effect of impurities.

Aquaculture, in recent years as opposed to stagnation of extractive fish production, has developed increasingly and may be benefited from the current excess of glycerol in market, using it as a dietary source of energy to fish, alternatively to conventional sources. Recent increase in global production of biodiesel and consequent abundance of glycerol, makes further researches necessary to enable using the co-product in animal diet.

As more than 50% of cost production of intensive fish farming is attributed to feeding, researches regarding the use of alternative ingredients aims to reduce the cost and replace usual feeds such as corn and soybeans, commonly absorbed by market for other purposes, such as human food, oil production and required in large quantities by other animal cultures. The objective of the present study was to evaluate the influence of dietary starch substitution by glycerol on energy metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), by determining weight, hepatosomatic index, plasmatic, muscular and hepatic concentration of protein, glucose and triglycerides, as well as the hepatic enzymes activities of malic (ME), glycerol kinase (GK) and glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD).

2 MATERIALS AND METHODS

Experiment was conducted at the Fish Station of Animal Science Department from Federal University of Lavras, Minas Gerais state, Brazil. The experimental adaptation period of animals in laboratory conditions was ten days in which fish received basal diet without glycerol.

The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments (level of inclusion of dietary glycerol) and 6 replicates (fish). It was used juvenile male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with initial average weight and length of $37.7 \text{ g} \pm 10.6 \text{ g}$ and $13.02 \pm 1.09 \text{ cm}$, respectively.

Fish were randomly divided into circular tanks of fiberglass, with a total capacity of 100L each. It was used a water recirculating system, biofilter, sand filter and ultraviolet filter. Temperature was controlled by a PT100 probe, connected to a temperature controller N540, accurate to two decimal places, regulated to maintain water temperature at $29 \text{ }^\circ \text{C}$. Dissolved oxygen and water temperature were measured daily, with a portable digital oxymeter (Bernauer, F-1550A). Ammonia, nitrite, nitrate, and pH were examined weekly with a commercial kit Alcon®.

Experimental diets were formulated with 0, 5, 10 and 15% glycerol with 99.75% purity (TABLE 1). The diets were pelleted isonitrogenous and isocaloric with 36% crude protein and 4500 kcal / kg gross energy. The fish were fed *ad libitum* for 60 days, twice daily (at 8:00 and 17:00h) and the tanks were siphoned after each feeding, to remove remaining feed and excreta.

Fish were fasted for 24 hours and anesthetized with 2-phenoxyethanol in a concentration of 0.8 mL.L^{-1} before experimental collecting. Fish were weighted and had length measured. It was collected approximately 1 mL of blood by cardiac puncture, 3g white muscle of each juvenile and whole liver. The plasma was separated by centrifugation at 3000 g for 10 min at room temperature

(approximately 22 °C). Plasma, muscle and liver collected were immediately stored at -20 °C for further analysis.

White muscle samples were diluted in MilliQ water at 1:2 ratio of (weight / volume). The white muscle was macerated with the aid of a pestle in an ice bath. After soaking, the sample was subjected to ultrasonic bath for 10 minutes and was centrifuged at 13,400 g for five minutes at 4 ° C. The supernatant was separated and the process was repeated two more times. The homogenate of the supernatant was used for the quantification of glucose, total protein and muscle triglycerides.

Liver samples were diluted in 25 mM HEPES-KOH at pH 7.2, at a ratio of 1:4 (weight / volume). The liver tissue was macerated in an ice bath. After soaking, the sample was subjected to ultrasonic bath for 10 minutes and centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 ° C. The supernatant was separated and the process was repeated two more times. The supernatant of homogenate was used to glucose, total protein and triglycerides determination, in addition to the enzymatic activities of malic (EC. 1.1.1.40), glycerol kinase (EC. 2.7.1.30) and glucose-6-phosphate-dehydrogenase (EC. 1.1.1.49).

Quantification of glucose was performed with the Labtest (Glucose HK Linqiform, Cat 85). The reading was made by a microplate reader with a 340nm filter, after being incubated at 37 ° C for 5 minutes. The resulting absorbance is compared to standard glucose kit and is directly proportional to the concentration of glucose in the sample.

Analysis of triglycerides was performed using the Labtest (TG Linqiform, Cat 87). Reading was made by a microplate reader with a filter of 505 nm after being incubated at 37°C for 10 minutes. The intensity of red color produced is compared to the standard kit and triglycerides is directly proportional to the concentration of triglycerides in the sample

The total protein concentrations were determined by the Bradford (1976) method. The protein concentration was estimated using an equation generated by the reading of solutions containing different concentrations of bovine serum albumin.

Specific activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase followed the methodology proposed by Graeve (1967). The activity of G6PD was measured at 25 ° C in a buffer consisting of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM NADP and 2 mM glycerol-6-P. It was conducted a reading process in spectrophotometer with absorbance of 340 nm.

Activity of glycerol kinase was determined according to the methods of Fossati and Prencipe (1982) and Sakasegawa et al. (1998). The reaction mixture was incubated at 25 °C in buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, and the concentrations of formed quinoneimine pigment were monitored by spectrophotometer with 500 nm of absorbance.

Determination of specific activity of malic enzyme followed methodology proposed by Spina (1966). The activity of MS was measured at 25 ° C in buffer constituted by 100 mM Triethanolamine-HCl, pH 7.4, 100 mM solution of L-malic acid, 20 mM b-NADP, 20 mM MnCl₂ solution. It was conducted a reading process in spectrophotometer with absorbance of 340 nm.

Data were submitted to analysis of variance and regression with means compared by SNK test at level of 5% of significance, using the computational package SAEG - System for Genetic Analysis and Statistics (Euclides, 1997).

Table 1 Percentage composition of experimental diets

Ingredients	Glycerol levels			
	0%	5%	10%	15%
Corn	14	14	14	14
Soybean meal	20	20	20	20
Soybean Oil	8	7,8	7,6	7,35
Bicalcium phosphate	1,2	1,2	1,2	1,2
Corn starch	16	10,65	5,25	0
Fish meal	36,78	36,78	36,78	36,78
Mineral and vitaminic premix	0,5	0,5	0,5	0,5
Cellulose	2	2	2	2
Gelatin	1,5	1,5	1,5	1,5
Antioxidant (BHT)	0,02	0,02	0,02	0,02
Glycerol	0	5	10	15
Kaolin	0	0,55	1,15	1,65
Crude protein (%)	35,99	35,99	35,99	35,99
Gross energy (Kcal/Kg)	4500,12	4500,95	4499,93	4499,78
TOTAL	100	100	100	100

Composition of vitamin and mineral supplement (amount / kg): Vitamin A 1,500 IU; Vitamin B2, 15 mg; Vitamin B3, 1000 IU; Vitamin B12, 1000 IU; Vitamin E, 25 mg; Vitamin PP, 120 g; Colin, 2000 mg; Calcium Pantothenate, 80 mg; Folic Acid, 2mg; BHT, 170 mg; Mn, 80 mg; Fe, 24 mg; Zn, 50 mg; Cu, 8 mg; I, 3 mg; Se 0,10 mg

3 RESULTS AND DISCUSSION

During the experiment, the average values of dissolved oxygen (5.1 ± 0.9 mg/L), temperature ($29 \pm 0,1$ C), ammonia (0.03 ± 0.001 mg/L) and pH ($7.2 \pm 0,2$) remained within recommended limits for the species in question.

Levels of glycerol in the diet did not influence weight and standard length of Nile tilapia juvenile ($P > 0.05$) (Table 2).

Table 2 Mean values of weight, standard length (SL), hepatosomatic index (HSI) of juvenile tilapia (*O. niloticus*) fed different concentrations of glycerol

	CV	Glycerol levels				Signific.
		0%	5%	10%	15%	
Weight (g)	16.48	$116,83 \pm 19,03$	$135 \pm 28,93$	$111,16 \pm 10,05$	$108,83 \pm 14,56$	ns
SL (cm)	4.89	$15,25 \pm 0,52$	$15,83 \pm 0,98$	$15,08 \pm 0,58$	$15,25 \pm 0,82$	ns
HSI (g)	22.63	$3,77 \pm 0,75$	$3,69 \pm 0,71$	$3,12 \pm 0,42$	$3,61 \pm 1,16$	ns

ns= not significant, according to SNK test, at 5% significance level.

Menton et al. (1986) examined glycerol as a source of dietary energy for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and concluded that use of glycerol at levels up to 12% by replacing part of wheat bran in the diets of low energy, did not affect fish growth. The authors suggested that rainbow trout was not efficient in use glycerol as an energy source. In present study, it was used Nile tilapia as experimental model and although there was no significant difference between treatments for weight, standard length and HSI, tilapia could metabolize dietary glycerol as energy source. The difference between results can be caused by different dietary habits of the species studied, in view that in general tilapia, as

omnivorous fish, has more facility to metabolize dietary carbohydrates (Dabrowski and Guderley, 2002).

Present study did not find significant differences in the HSI of fish ($P > 0.05$), suggesting that the lipid reserves deposited in the liver were not enough to change the HSI of tilapia. Given the great importance of energy metabolism in the fish liver, it may change the HSI of fish, and it is common the deposition of liver lipids as well as glycogen. Menton et al.(1986) found no significant differences in HSI of rainbow trout fed diets containing 0% and 12% of purified glycerol in the diet, contrasting a study made by Li et al. (2010), with catfish, in which HSI was higher in fish fed 15% and 20% of glycerol, compared to fish fed with 5 and 10%.

Table 3 presents the average concentrations of glucose, triglycerides and proteins in the liver, muscle and plasma of juvenile tilapia fed different concentrations of glycerol in the diet. There was no significant difference in treatments for muscle and plasma glucose ($P > 0.05$).

Table 3 Effect of treatments on glucose, triglycerides and protein concentration in different tissues of juvenile Nile tilapia (*O. niloticus*)

		Glycerol levels			
		0%	5%	10%	15%
	CV	White muscle (mg.g-1)			
Glucose	12.03	1,18 ± 0,06	1,19 ± 0,14	1,22 ± 0,17	1,20 ± 0,16
Triglycerides	6.26	1,49 ± 0,16 C	1,54 ± 0,11 C	1,77 ± 0,05 B	2,12 ± 0,09 A
Protein	4.35	45,31 ± 3,00	45,56 ± 1,81	46,74 ± 1,11	45,66 ± 1,53
		Plasm (mg.ml-1)			
Glucose	11.34	0,72 ± 0,03	0,62 ± 0,14	0,63 ± 0,02	0,64 ± 0,04
Triglycerides	7.03	1,61 ± 0,04	1,54 ± 0,10	1,50 ± 0,19	1,59 ± 0,04
Protein	7.13	3,99 ± 0,28	3,93 ± 0,25	4,13 ± 0,24	4,08 ± 0,37
		Liver (mg.g-1)			
Glucose	10.63	30,54 ± 2,63 A	28,08 ± 3,03 AB	26,49 ± 3,35 AB	25,20 ± 2,68 B
Triglycerides	6.20	16,71 ± 1,33 C	17,07 ± 0,85 C	18,57 ± 1,57 B	21,34 ± 0,52 A
Protein	2.80	93,16 ± 1,69	91,04 ± 3,50	90,68 ± 2,04	92,94 ± 2,70

Means in the same row followed by different letters, differ by SNK test at 5% significance level.

Treatment with 0% of glycerol showed higher hepatic glucose compared to treatment with 15% of glycerol ($P < 0.05$), in general the level of glycerol in the diet was inversely proportional to the level of glucose in liver. High hepatic glucose levels in T0% liver fish was probably because of high level of starch in the diet, since the T15%, with low starch, showed the lowest hepatic glucose level. The specie ability to maintain homeostasis is one of the main parameters to evaluate the usability of carbohydrates in the diet, as reported by Corrêa et al. (2007), in a study with tambaqui *Colossoma macropomum*. The best use of carbohydrate as an energy source causes protein spare, and let it to be used to the structural function and tissue development (Moura et al., 2007).

The plasma and muscle glucose concentrations were probably not affected due to fasting before slaughter in which fish were submitted, and because glucose is readily available for energy production in muscle activity, being rapidly consumed as energy source.

Menton et al. (1986) found that plasma glucose levels were significantly different in trout fed diets with 6 and 12% glycerol in fasted and fed states. The trout supplemented with 6% of free glycerol (9% lipids in the diet) had a plasma glucose level significantly higher in fish fed, but not in fasting, compared with trout fed high energy diets (22% lipids) and low energy (9% lipids), which were not supplemented with glycerol free. In contrast, trouts in both high-energy diet (22% fat) and in low-energy diet (9% fat), which did not contain free glycerol showed similar levels of plasma glucose, and were not significantly influenced by fish in the fed or fasting state, corroborating the present study, in which levels of glycerol in the diet did not influence plasma glucose.

Li et al. (2010) found higher levels of glucose in the blood of catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing 0% and 5% glycerol, decreasing in treatments containing 10%, 15% and 20% glycerol, in substitution to corn grain. This response cannot be easily explained, given that other carbohydrates such as

starch, and other nutrients in the diet also influence circulating glucose levels. The difference in plasma glucose behavior, on the levels of glycerol added to the diet of fish, among different papers cited above, takes place according to the difference in the dietary habits of the species studied.

There was no significant difference ($P > 0.05$) between treatments on amount of muscle, plasma and hepatic protein. The results suggest that glycerol diet spare protein catabolism for energy purposes in the Nile tilapia. Corroborating Menton et al. (1986) that found no significant difference in the plasma proteins concentration of trout fed diets with 6 and 12% glycerol. In contrast, trout fed high energy diets had consistently productive protein value significantly higher than trout raised on diets of low energy. This would indicate that glycerol did not spare the utilization and /or catabolism of dietary proteins as an energy source, as did the lipids in the diet of high energy.

That disparity in results may be related to different feeding habits of the species studied, due to the fact that carnivorous fish have preferential use of protein as a source of energy (Halver, 1980).

Young et al. (1964) and Chan et al. (1981) found in rats that the glycerol might have a positive effect on nitrogen metabolism, since it is a readily available energy source and, thus, prevents the catabolism of amino acids to obtain energy or gluconeogenesis. In the present study, dietary levels of glycerol applied did not interfere on protein turnover of the tilapia, leaving the use of glycerol in the present study, restricted to the lipid and carbohydrate metabolism.

The levels of glycerol in the diet did not influence the concentration of plasma triglycerides ($P > 0.05$) in Nile tilapia juvenile. There was no change in plasma triglyceride levels probably because fish was not energetically deficient, therefore there is no need to mobilize energy, and consequently realize lipolysis in adipocytes. Treatments with 10% and 15% of glycerol showed significant

quadratic regression ($P < 0.01$) for of muscle and liver triglycerides concentrations ($y = 0,0742x^2 - 0,1605x + 1,5779$; $R^2 = 0.8604$ and $y = 0,6044x^2 - 1,483x + 17,601$; $R^2 = 0.7532$, respectively). The results of this study suggest that juvenile of Nile tilapia has the ability to use glycerol from diet as a substrate for tissue lipogenesis, indicating a greater fat deposition in the liver and muscle of fish, being this feature in general not desired due to no appreciation of filet fat by the consumer market.

In contrast to the results obtained in this study, Li et al. (2010) found concentrations of liver lipids significantly lower in the channel catfish *Ictalurus punctatus* fed 15% and 20% glycerol in the diet compared to fish fed with higher levels low glycerol. This disparity in results may be related to different eating habits of the species studied, and Nile tilapia, which has a considerable ability to use dietary carbohydrates as an energy source, showed a tendency to store dietary supplied glycerol esterified to fatty acids in triglycerides form in tissues.

Menton et al. (1986) found that the addition of free glycerol in both low-energy diets and high energy diets, produced no significant effect on the final composition of the carcass of the trout. The lacks of any effect on lipid levels of the carcass indicate that free glycerol diet seems to have no significant effect on the lipogenic activity in trout.

Working with similar levels of starch in the diet to the present study, Okamura (2009) reported that juvenile surubim (*Pseudoplatystoma sp*) fed with diets containing 5% carbohydrate showed higher concentrations of triglycerides in the liver compared with fish that were fed with a diet containing 10%, 15% and 20% of diet starch. Probably, this effect was caused by higher concentration of lipids (11%) combined with lower concentrations of carbohydrate (5%) in the diet of this treatment. However, this difference in the carbohydrate:fat relation was not enough to provide significant variations in plasma and muscle triglycerides deposition.

On the other hand, Narayan and McMullen (1979) in studies with rats, found that the addition of glycerol in the diet, or not fed with lipids, promoted an increase in liver triglycerides, increasing weight of this tissue. Glycerol also provided an increase in serum lipids of the rats.

In broilers, Gianfelici (2009) observed that the level of glycerol in the diet did not influence the concentration of triglycerides in the liver, indicating that the increase of dietary glycerol did not produce an increase on lipids synthesis in that organ. Other study with chickens Barteczko and Kaminski (1999) observed that animals fed with diets containing 10 and 15% glycerol showed a significant increase in triglycerides and blood glucose levels.

Table 4 presents the effects of provided diets on the activity of G6PD, GK and EM enzymes, expressed in U/mg of protein,. Treatment with 10% and 15% of glycerol showed higher activity of G6PD enzyme, compared to treatment with 5% ($P < 0.05$). No significant difference was found between treatments for glycerol kinase and malic enzyme activities ($P > 0.05$).

Table 4 Effect of treatments on malic (EM), glycerol kinase (GK) and glucose-6-P dehydrogenase (G6PD) enzyme activity (U/mg protein) in liver of Nile tilapia (*O. niloticus*)

(U/mg protein)	CV	Glycerol			
		0%	5%	10%	15%
EM	5,37	0,0524 ± 0,0029	0,0515 ± 0,0030	0,0550 ± 0,0017	0,0557 ± 0,0036
GK	10,96	0,0797 ± 0,020	0,0810 ± 0,010	0,0851 ± 0,018	0,0914 ± 0,016
G6PD	7.94	0,439 ± 0,018 AB	0,419 ± 0,043 B	0,479 ± 0,018 A	0,490 ± 0,052 A

Means in the same row followed by different letters differ by SNK test at 5% significance level.

Some literature data shows that the activity of these enzymes into fish, is in a range of 0.109 to 0.920 U/mg of protein for G6PD and 0.013 to 0.082 U/mg of protein for EM (Dias et al.,2004, Borba et al. 2003; Meton et al. 2003; Dias et

al., 1998), which is consistent with the enzyme activity values found in this study. To the best of the present authors knowledge, there is no report in literature of values of hepatic GK activity in Nile tilapia liver. The wide range of variation on enzyme activities found in literature is a function of diversity of species and experimental conditions, with respect to time under the assay conditions, temperature and amount of tissue used, in which tests were performed.

The results suggest that fish from treatments with 10 and 15% glycerol, used glycerol as lipogenic substratum in liver and muscle, considering the highest activity of hepatic enzyme G6PD and highest amount of triglycerides in referred tissues. Glycerol concentrations in present study, was enough to supply the energy subsidized for carbohydrate portion in the diet, tending to divert the carbohydrates route to the pentose phosphate pathway, evidenced by increasing G6PD enzyme activity. The excess of glucose of treatment 0% also biased a detour route for G6PD, probably due to carbohydrate saturation in which fish were submitted, in view of the tilapia good efficiency to metabolize the dietary carbohydrate.

Based on determination of enzymatic activity of G6PDH, Shimeno and Takeda (1973) observed that the highest activity of pentose phosphate route is the liver or hepatopancreas in fish. In common carp, the hepatic enzyme activity was about 90% of the activity glucose-6-phosphate dehydrogenase throughout the entire body. The authors also reported that the highest activity was observed in the liver of freshwater eel (*Anguilla anguilla*), more than twice found in the common carp liver and three times more than rainbow trout liver.

GK is a key enzyme that catalyzes the phosphorylation of glycerol to glycerol-3-P. Glycerol 3-phosphate is used for TAG synthesis but can also be diverted to form glycolytic/glyconeogenic intermediates. Since the phosphorylation of glycerol is necessary for the entry of glycerol into the

glycolytic pathway, the level of glycerol kinase in the tissue will therefore influence the extent of glycerol utilization. Although there was no significant difference between treatments for hepatic GK activity, there was a tendency to increasing values as increased levels of dietary glycerol. In treatment T15, glycerol uptake from diet may be used at the glyconeogenic pathway due to low starch of the treatment, in view that in some animals the use of glycerol in hepatic gluconeogenesis has been proposed to support central nervous system requirements for glucose (Houser et al., 2007), and it may be used for TAG synthesis, evidenced by higher levels of TAG in liver and muscle and higher activity of G6PD found in this study. That corroborates a study realized by Lech (1970), which reported that trout (*Salmo gairdneri*) liver contains glycerol kinase and the tissue is able to convert glycerol to CO₂, glycogen and lipids.

It is known that the activity of the pentose phosphate route in liver is associated with NADPH and ribose-5-phosphate production. Triglyceride/fatty acid cycling requires the constant generation of glycerol 3-phosphate for triglyceride synthesis, particularly in situations when cycling is increased, as in fish from treatment with 15%.

In fatty acid formation, metabolic pathways require specific amounts of reduced energy in form of NADPH. In fish, the main metabolic source of NADPH is oxidative phase of pentose phosphate, catalyzed, among other enzymes, by glucose-6-P-dehydrogenase. The malic enzyme, active on the pyruvate / malate cycle, also contributes for NADPH supply, although in a smaller proportion (Salway, 1994). In present study, pyruvate may have been used for the acetyl CoA synthesis, diverting from pyruvate / malate route. Deviation of the route probably occurred on use of acetyl CoA for fatty acids synthesis, providing no accumulation of malate, which explains the lower values found and no difference in treatments in this study for malic enzyme activity. The variation in the route activity between different species may be the result of

species-specific requirement variations of those metabolites, and it can be affected by several factors such as diet composition and physiological state in which fish is encountered.

Dietary glycerol was possibly used in fatty acid synthesis and the pentose phosphate route, evidenced by increased serum triglyceride levels in liver and muscle, with increased activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase. Regarding to G6PDH activity, it also appears to be influenced by high concentration of dietary starch, characterized by increased enzyme activity in fish fed high concentration of starch. Further studies are needed to determine energy provided by dietary glycerol and trace more accurately the metabolic route of referred specie.

4 CONCLUSION

The inclusion of dietary glycerol above 10% stimulates triglycerides deposition in liver and muscular tissues, characterizing glycerol as a lipogenic substrate.

The lipogenesis process in tissues was congruent with increased activity of hepatic G6PD enzyme.

Nile tilapia juveniles are able to metabolize dietary glycerol, which is a potential energy source to be used in fish diet rather than starch.

REFERENCES

- BARTECZKO, J.; KAMINSKI, J. The effect of glycerol and vegetable fat on some physiological indices of the blood and over fatness of broiler carcass. **Annales Animal Science**, Warsaw, v. 36, n. 2, p. 197-209, 1999.
- BORBA, M. R. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 16, n. 4, p. 362-369, Sept. 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CHAN, P.; POLLACK, E.; FISHMAN, R. Differential effects of hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids. **Brain Research**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 143-153, 1981.
- CORRÊA, C. F. et al. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary constarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 147, n. 4, p. 857-862, Aug. 2007.
- DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: _____. **Fish nutrition**. 3rd ed. New York: Elsevier, 2002. p. 309-365.
- DIAS, J. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1122-1130, Oct. 2004.
- DIAS, J. et al. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p. 169-186, Jan. 1998.
- EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG - Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 150 p.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxidase. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 28, p. 2077-2080, 1982.

GIANFELICI, M. F. **Uso de glicerol como fonte de energia para frangos de corte**. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GRAEVE, K. Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Journal**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 353-361, June 1994.

HALVER, J. E. Proteins and amino acids. In: _____. **Fish feed technology**. Rome: FAO, 1980. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e04.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

HOUSER, D. S. et al. Renal function in suckling and fasting pups of the northern elephant seal. **Comparative and Biochemistry Physiology**, New York, v. 129, n. 2/3, p. 405-415, June 2001.

LECH, J. Glycerol kinase and glycerol utilization in trout (*Salmo gairdneri*) liver. **Comparative and Biochemistry Physiology**, New York, v. 34, p. 117-124, 1970.

LI, H. M. et al. 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, Feb. 2010.

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.

METON, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Short and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus auratus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 99-107, 2003.

MOURA, G. de S. et al. Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1609-1615, nov. 2007.

NARAYAN, K.; MCMULLEN, J. The interactive effect of dietary glycerol and corn oil on rat liver lipids, serum lipids and serum lipoproteins. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 109, p. 1836-1846, 1979.

OKAMURA, D. **Influência do amido de milho no metabolismo energético de surubim *Pseudoplatystoma spp.*** 2009. 97 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SAKASEGAWA, S. et al. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepti*- cum: characterization, gene cloning and primary structure. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n. 12, p. 2388-2395, Sept. 1998.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. London: Balckwell Science, 1994. 95 p.

SHIMENO, S.; TAKEDA, M. Studies on hexose monophosphate shunt of fishes: II., distribution of glucose-6- phosphate dehydrogenase. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 39, p. 461-466, 1973.

SPINA, J.; BRIGHT, H. J.; ROSENBLOOM, J. Purification and properties of L-malic enzyme from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, New York, v. 9, p. 29-39, 1966.

YOUNG, J.; SHRAGO, E.; LARDY, H. Metabolic control of enzymes involved in lipogenesis and gluconeogenesis. **Biochemistry**, New York, v. 3, p. 1687-1692, 1964.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 1 Análise de variância da concentração de glicose muscular

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.5125000E-02	0.1708333E-02	0.082	*****
Resíduo	20	0.4186250	0.2093125E-01		

Coeficiente de Variação = 12.031

Tabela 2 Análise de variância da concentração de glicose no fígado

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	95.20119	31.73373	3.685	0.02919
Resíduo	20	172.2331	8.611654		

Coeficiente de Variação = 10.638

Tabela 3 Análise de variância da concentração de glicose no plasma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.3983040E-01	0.1327680E-01	2.395	0.09856
Resíduo	20	0.1108800	0.5544001E-02		

Coeficiente de Variação = 11.347

Tabela 4 Análise de variância da concentração de triglicerídeo muscular

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	1.460021	0.4866736	41.283	0.00000
Resíduo	20	0.2357750	0.1178875E-01		

Coeficiente de Variação = 6.266

Tabela 5 Análise de variância da concentração de triglicerídeo no fígado

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	79.81842	26.60614	20.351	0.00000
Resíduo	20	26.14750	1.307375		

Coeficiente de Variação = 6.205

Tabela 6 Análise de variância da concentração de triglicerídeo no plasma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.4784167E-01	0.1594722E-01	1.316	0.29709
Resíduo	20	0.2424417	0.1212208E-01		

Coeficiente de Variação = 7.039

Tabela 7 Regressão quadrática da concentração de triglicerídeo muscular

Nome	Coefficiente	Desvio-Padrão	Valor de T	Coef. Beta	Probab.
Constante	0.157792E+01				
TRAT	-0.160500E+00	0.110047E+00	-1.458462	-0.675070	0.0798
TRAT^2	0.741667E-01	0.216656E-01	3.423252	1.584501	0.0013
R2	0.860493				
R2 ajustado	0.847206				

Tabela 8 Regressão quadrática da concentração de triglicerídeo no fígado

Nome	Coefficiente	Desvio-Padrão	Valor de T	Coef. Beta	Probab.
Constante	0.176010E+02				
TRAT	-0.148296E+01	0.115703E+01	-1.281698	-0.789054	0.1070
TRAT^2	0.604375E+00	0.227789E+00	2.653220	1.633405	0.0074
R2	0.753208				
R2 ajustado	0.729704				

Tabela 9 Análise de variância da concentração de proteína no músculo

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	7.252811	2.417604	0.608	*****
Resíduo	20	79.50389	3.975194		

Coeficiente de Variação = 4.351

Tabela 10 Análise de variância da concentração de proteína no fígado

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	29.34124	9.780414	1.473	0.25201
Resíduo	20	132.7824	6.639118		

Coeficiente de Variação = 2.802

Tabela 11 Análise de variância da concentração de proteína no plasma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.1496208	0.4987361E-01	0.601	*****
Resíduo	20	1.660375	0.8301875E-01		

Coeficiente de Variação = 7.136

Tabela 12 Análise de variância da atividade da enzima málica

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.7363082E-04	0.2454361E-04	2.945	0.05781
Resíduo	20	0.1666918E-03	0.8334592E-05		

Coeficiente de Variação = 5.377

Tabela 13 Análise de variância da atividade da enzima GK

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.000546	0.00018	2.142	0.1268
Resíduo	20	0.001701	0.000085		

Coeficiente de Variação = 10.96

Tabela 14 Análise de variância da atividade da enzima G6PD

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TRAT	3	0.2014153E-01	0.6713842E-02	5.089	0.00886
Resíduo	20	0.2638633E-01	0.1319316E-02		

Coeficiente de Variação = 7.945