



ADRIANA BRASIL FERREIRA PINTO

**METABOLISM OF GLYCEROL IN PIGS FED DIETS
CONTAINING MIXED CRUDE GLYCERIN AND
 β -ADRENERGIC AGONIST**

**LAVRAS – MG
2018**

ADRIANA BRASIL FERREIRA PINTO

**METABOLISM OF GLYCEROL IN PIGS FED DIETS CONTAINING MIXED
CRUDE GLYCERIN AND β -ADRENERGIC AGONIST**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

Profa. Dra. Luciana de Paula Naves
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pinto, Adriana Brasil Ferreira.

Metabolism of glycerol in pigs fed diets containing mixed crude glycerin and β -adrenergic agonist / Adriana Brasil Ferreira Pinto. - 2018.

93 p. : il.

Orientador(a): Raimundo Vicente de Sousa.

Coorientador(a): Luciana de Paula Naves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Metabolismo animal. 2. Enzima. 3. Lipogênese. I. Sousa, Raimundo Vicente de. II. Naves, Luciana de Paula. III. Título.

ADRIANA BRASIL FERREIRA PINTO

**METABOLISM OF GLYCEROL IN PIGS FED DIETS CONTAINING MIXED
CRUDE GLYCERIN AND β -ADRENERGIC AGONIST**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 19 de março de 2018

Profa. Dra. Luciana de Paula Naves	UNIFENAS
Prof. Dr. Cesar Augusto Pospissil Garbossa	USP
Prof. Dr. Anderson Assaid Simão	UFLA
Prof. Dr. Luciano José Pereira	UFLA

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de carácter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.

Arthur Schopenhauer

Aos meus pais, Valéria e Paulo, e ao meu irmão Daniel, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente, acreditando firmemente no meu potencial,

A minha gatinha, Agatha, pelo companheirismo e fidelidade, pela enorme alegria e carinho que sempre me trouxe ao longo desses 13 anos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer nos momentos de fraqueza e me confortar naqueles em que mais preciso.

A minha amada família, pela confiança, compreensão, encorajamento e amparo durante os momentos difíceis de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por sempre me acolher; em especial ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por me permitir a realização de tão almejada meta.

Ao professor, orientador e amigo Dr. Raimundo Vicente de Sousa pela orientação, conhecimentos compartilhados, compreensão e paciência; pela amizade e imensa confiança, sem as quais meus esforços seriam dobrados. “O grande mestre não dogmatiza, deixa que seus discípulos encontrem os seus próprios caminhos”.

À coorientadora e amiga Dra. Luciana de Paula Naves por ser luz nesse longo e árduo caminho. Por todos os ensinamentos técnicos e pessoais, pela imensa empatia, compreensão e paciência e pela amizade que construímos ao longo desses últimos anos.

À amiga, parceira de projeto, experimento e estudo MSc. Imara Guimarães Lima pela presteza, iniciativa e agilidade, sem os quais nosso experimento não seria possível; pelos feriados e madrugadas no laboratório; pela delicadeza, cordialidade e amizade, que levarei em meu coração.

Ao professor Dr. Cesar Augusto Pospissil Garbossa, pelo importante auxílio no experimento à campo e nas análises estatísticas, por sua participação em minha banca de defesa e todas as demais contribuições a este trabalho.

Aos professores Dr. Anderson Assaid Simão do Departamento de Química (DQI), Dr. Luciano José Pereira, do Departamento de Ciências da Saúde (DSA), Dra. Viviam de Oliveira Silva, do DMV e Dr. Leonardo da Silva Fonseca, da UFVJM, por aceitarem participar da banca de defesa e por suas preciosas contribuições a este trabalho.

Aos professores do Departamento de Zootecnia (DZO), em especial Dra. Priscila Vieira Rosa, Dr. Vinicius de Souza Cantarelli, Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu e Dr. Rony Antonio Ferreira, pelos ensinamentos e concessão do uso da infraestrutura necessária para a realização da pesquisa.

Aos funcionários do DMV (UFLA) Willian, Marcos e Fidélis, ao funcionário Danilo do Setor de Suinocultura do DZO (UFLA) e aos técnicos do DZO (UFLA), em especial ao Márcio

Nogueira, pelo grande apoio na fase de experimentação à campo e laboratorial. Aos secretários de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Fátima e Berin, pela dedicação e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À Usina da Petrobras Biocombustível S.A. localizada em Montes Claros, pelo fornecimento da glicerina bruta.

Ao frigorífico Nutrili Indústria e Comércio de Carnes Ltda. por proporcionar as condições adequadas para o abate dos animais, coleta das amostras e realização das análises químicas que precisavam ser feitas no frigorífico.

À amiga Mírian Silva Braz pelo apoio e imenso auxílio durante a fase de qualificação, pelo carinho e atenção que firmaram a base de uma linda amizade.

Às amigas pós-graduandas Tamira e Marina e aos amigos graduandos Aline, Andressa, Camila, Iana, Letícia, Maria Eduarda, Monique, Pedro, Renata, Sudário e Thamires pela disponibilidade e preciosa ajuda na condução do experimento.

Aos amigos Danilo e Michele pela amizade e apoio em duras fases, pela filosofia nos cafés da tarde ou descontração nas noites de sábado, por me trazerem novas visões e por todas as risadas compartilhadas.

A minha irmã de alma, amiga para toda a vida, Tati, por compreender meu coração, minha mente e meu espírito, por me aceitar exatamente como sou e me amar incondicionalmente. Por todos os momentos de sorrisos e lágrimas, pela presença constante mesmo com toda a distância que nos separa, simplesmente por ser minha amiga, única, verdadeira e eterna!

Aos suínos que participaram desse experimento, que me mostraram ser tão amáveis, dóceis e inteligentes e, assim, apenas reforçaram meu amor aos animais! A eles ofereço gratidão e compaixão, pois suas vidas serviram à humanidade...

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

O glicerol é um importante componente do metabolismo animal que pode ser destinado à síntese de triacilgliceróis, glicose ou ser oxidado para produção de energia. A glicerina bruta apresenta elevada concentração de glicerol (70 a 95%) e alto valor energético (cerca de 4.320 kcal de energia bruta/kg) e, assim, vem sendo estudada como fonte energética na alimentação de animais de produção, como os suínos. A ractopamina, por sua vez, tem sido utilizada como suplemento dietético para suínos, a fim de se obter carcaças com menores teores de gordura e maior quantidade de massa magra, potencializando o processo de produção e tornando a carne desses animais mais competitiva no mercado. Neste sentido, a otimização do uso de glicerina bruta mista (GBM) e cloridrato de ractopamina (RAC) em dietas para suínos em terminação requer uma melhor compreensão do metabolismo do glicerol. Portanto, este estudo foi conduzido para avaliar o desempenho, parâmetros sanguíneos, teores de metabólitos no músculo e a atividade de enzimas no fígado, tecido adiposo e rim de suínos alimentados com dietas contendo GBM e/ou RAC. De acordo com o peso inicial, 64 suínos machos castrados foram distribuídos em esquema fatorial 4 x 2, correspondendo a quatro concentrações de GBM (0, 100, 150 e 200 g/kg ou 0, 10, 15 e 20%) em dietas contendo 0 ou 10 mg/kg de RAC. Cada dieta foi avaliada em oito repetições. O desempenho durante o período experimental de 28 dias foi avaliado. Ao final do experimento, amostras de sangue, músculo *Longissimus lumborum*, fígado, gordura subcutânea e rim foram coletadas. Não houve interação GBM x RAC para todos os parâmetros avaliados. Além disso, não houve efeito isolado da GBM ou RAC da dieta sobre o ganho de peso e as concentrações sanguíneas de glicose, insulina, triacilgliceróis, colesterol total, proteína total, albumina, creatinina, cortisol e lactato. Entretanto, independente da suplementação de RAC na dieta, o aumento da concentração de GBM na dieta afetou o consumo de ração diário e o consumo diário de GBM, elevando o nível de glicerol no sangue e no músculo e aumentando a atividade da glicerol quinase (GK) no fígado e da enzima málica no tecido adiposo. Por outro lado, independente da concentração dietética de GBM, a inclusão de RAC na dieta melhorou a conversão alimentar, reduziu a concentração de glicerol no músculo, diminuiu a atividade da GK e glicerol-3-fosfato desidrogenase no fígado e da glicose-6-fosfato desidrogenase no tecido adiposo, além de aumentar a atividade da glutamato desidrogenase hepática. Conclui-se que há maior taxa de fosforilação do glicerol no fígado, estímulo da lipogênese no tecido adiposo e provável aumento do aproveitamento do glicerol pelas fibras musculares em resposta ao aumento da concentração de glicerol circulante proveniente da dieta. Por outro lado, quando a dieta contém até 200 g/kg de GBM e 10 mg/kg de RAC há indicativos de menor aproveitamento do glicerol para a síntese de triacilgliceróis no tecido muscular, fígado e no tecido adiposo, além de aumento da oxidação de aminoácidos no fígado acompanhado de melhoria na conversão alimentar dos suínos.

Palavras-chave: Adaptação metabólica. Enzima. Lipogênese. Metabolismo Animal. Parâmetro Sanguíneo.

ABSTRACT

Glycerol is an important component of animal metabolism that can be directed for triacylglycerols or glucose synthesis or be oxidized for energy production. Crude glycerin has a high concentration of glycerol (70 to 95%) and high energy (approximately 4.320 kcal gross energy / kg) and, therefore, has been studied as an energy source in the diet of farm animals, such as pigs. Ractopamine, in turn, has been used as a dietary supplement for pigs, in order to obtain carcasses with lower fat content and higher lean mass, improving the production process and making the meat of these animals more competitive in market. Thereby, the optimization of the use of mixed crude glycerin (MCG) and the ractopamine hydrochloride (RH) in diets for finishing pigs requires a better understanding of glycerol metabolism. Therefore, this study evaluated the performance of blood parameters, metabolite levels in the *Longissimus lumborum* muscle and the activity of enzymes in the liver, subcutaneous adipose tissue and kidney of pigs fed diets containing MCG and/or RH. According to the initial weight, 64 barrows were distributed in a 4 x 2 factorial design, corresponding to four concentration of MCG (0, 100, 150, and 200 g/kg) in diets containing 0 or 10 mg/kg RH. Each animal was considered an experimental unit, being used eight repetitions per treatment. The performance during the experimental period of 28 days was evaluated. At the end of the experiment, samples of blood, muscle *Longissimus lumborum*, liver, subcutaneous fat, and kidney were collected. There was no interaction between MCG x RH for all the evaluated parameters. Moreover, there was no isolated effect of dietary MCG or RH on the weight gain and the blood concentrations of glucose, insulin, triacylglycerols, total cholesterol, total protein, albumin, creatinine, cortisol, and lactate. However, regardless the supplementation of RH in the diet, the increase of MCG concentration in the diet affected the daily feed intake and the daily intake of MCG, increasing the level of glycerol kinase (GK) in the liver and the malic enzyme at the adipose tissue. On the other hand, regardless the dietetic concentration of MCG, the inclusion of RH in the diet improved food conversion rate, reduced the glycerol concentration in the muscle, decreased the GK activity and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver and glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipose tissue, also increasing the activity of hepatic glutamate dehydrogenase. There was a higher rate of phosphorylation of glycerol in the liver, stimulation of lipogenesis in adipose tissue and a likely increase in the utilization of glycerol by muscle fibers in response to an increased concentration of circulating glycerol from the diet. On the other hand, when the diet contained up to 200 g/kg MCG and 10 mg/kg RH, there were indications of lower utilization of glycerol for the synthesis of triacylglycerols in muscle, liver and adipose tissue, besides increased oxidation of amino acids in the liver followed by improved feed conversion of pigs.

Keywords: Metabolic adaptation. Enzyme. Lipogenesis. Animal metabolism. Blood parameter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de obtenção do glicerol 3-fosfato.	20
Figura 2: Reações importantes do metabolismo intermediário.	21
Figura 3: Glicólise - fase de pagamento.	22
Figura 4: Ciclo de Krebs.....	24
Figura 5: Glicólise e Gliconeogênese.	25
Figura 6: Síntese de triacilglicerol.	27
Figura 7: O transporte de acetil-CoA para o citossol.	29
Figura 8: Síntese do palmitato (16:0) pelo complexo da ácido graxo sintase.	31
Figura 9: Síntese de NADPH que será utilizado na síntese de ácidos graxos.	32
Figura 10: Mecanismo de ação da ractopamina.	44
Figura 11: Efeitos metabólicos da ractopamina no tecido adiposo e muscular.....	44

LISTA DE SIGLAS

1,3 BPG	1,3-bifosfoglicerato
ACACA	Acetil CoA carboxilase alfa
ACoAC	Acetil CoA carboxilase
ACP	Proteína carreadora de acila
ADD1	Fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácido graxo livre
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AQP	Aquaporina
ATGL	Lipase de triacilglicerol do adipócito
ATP	Adenosina trifosfato
CLA	Ácido linoleico conjugado
CoA	Coenzima A
CPT-1	Carnitina-palmitoil-transferase 1
DHAP	Diidroxiacetona-fosfato
FAS	Ácido graxo sintase
G3P	Glicerol 3-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GH	Hormônio do crescimento
GIM	Gordura intramuscular
GK	Glicerol quinase
GLUT-4	Transportador de glicose-4
GPDH	Glicerol 3-fosfato desidrogenase
G _s	Proteína G estimulatória
GTP	Guanosina trifosfato
HF	Alta fibra
HSL	Lipase hormônio sensível
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
LF	Baixa fibra
LPL	Lipase lipoproteica

LW	Large White
Lys	Lisina
MAG	Monoacilglicerol
MCD	Malonil-CoA descarboxilase
ME	Enzima málica
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK-C	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGC	Coativador do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
pST	Somatotropina suína
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
RAC	Ractopamina
REL	Retículo endoplasmático liso
SCD	Estearoil-CoA-dessaturase
SFA	Ácido graxo saturado
-SH	Grupo tiol
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
ST	Somatotropina
TAG	Triacilglicerol
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
β-AA	Agonista β-adrenérgico
β-AR	Receptor β-adrenérgico

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Utilização da glicerina na alimentação de suínos em terminação	16
2.2	Metabolismo do glicerol	18
2.2.1	A origem do glicerol e do glicerol 3-fosfato	18
2.2.2	O glicerol como substrato para a via glicolítica	22
2.2.3	O glicerol na gliconeogênese	24
2.2.4	O glicerol na lipogênese	26
2.3	Lipogênese em suínos	28
2.3.1	Mecanismos bioquímicos da lipogênese	28
2.3.2	Particularidades da lipogênese em suínos – sítio, precursores e destino dos triacilgliceróis	33
2.3.3	Regulação da lipogênese	34
2.3.3.1	Efeito do genótipo e/ou fenótipo sobre a lipogênese	35
2.3.3.2	Regulação nutricional da lipogênese	36
2.3.3.2.1	Efeito do teor e tipo de carboidratos sobre a lipogênese	36
2.3.3.2.2	Efeito do teor de gordura e perfil de ácidos graxos sobre a lipogênese	37
2.3.3.2.3	Efeito do teor de proteína e perfil de aminoácidos sobre a lipogênese	38
2.3.3.3	Regulação hormonal da lipogênese	40
2.3.3.3.1	Regulação pela insulina	40
2.3.3.3.2	Regulação pelo hormônio do crescimento ou somatotropina	41
2.3.3.3.3	Regulação pelas catecolaminas e seus análogos sintéticos	42
2.4	Ractopamina	43
2.4.1	Mecanismo de ação da ractopamina	43
2.4.2	Efeito da ractopamina sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de suínos em terminação	45
2.4.3	Efeito da ractopamina sobre o metabolismo do tecido adiposo	46
2.4.4	Efeito da ractopamina sobre o metabolismo do tecido muscular	47
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	49
	REFERÊNCIAS	50

SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	63
ARTIGO 1 – Metabolism of glycerol in pigs fed diets containing mixed crude glycerin and β-adrenergic agonist.	63
Summary text for the Table of Contents	64
Abstract.	64
Introduction	65
Materials and methods.....	66
Results.....	70
Discussion	72
Conclusions	78
Conflicts of interest.....	79
Acknowledgements	79
References.....	79
APÊNDICES	87
APÊNDICE A – Tabelas	87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A glicerina bruta é um co-produto oriundo da produção do biodiesel. Como a produção deste biocombustível tem sido crescente nos últimos anos, a oferta de glicerina bruta no mercado também tem sido cada vez maior (Agência Nacional do Petróleo – ANP, 2016). Neste sentido, a oferta de glicerina tem excedido sua demanda pelas indústrias química, farmacêutica e alimentícia, havendo, portanto, a necessidade de se estabelecer novas alternativas para o seu adequado aproveitamento (MENTEN; ZAVARIZE; SILVA, 2010). É importante considerar também que existe a expectativa de que o aumento da taxa de inclusão obrigatória de biodiesel ao diesel de petróleo aumentará ainda mais a oferta de glicerina no mercado, o que provavelmente irá estimular a redução do seu preço tornando este produto cada vez mais atrativo economicamente (POPP et al., 2016).

O glicerol é um importante componente do metabolismo animal, que pode ser destinado à produção de triacilgliceróis, de glicose ou ser completamente oxidado para a produção de energia (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014; XUE; CHENG; JIANG, 2017). A glicerina bruta apresenta elevada concentração de glicerol (80 a 95%, frequentemente) e alto valor energético (cerca de 4.320 kcal de energia bruta/kg) e, por conseguinte, vem sendo estudada como fonte energética na alimentação de animais de produção, como os suínos (BERENCHTEIN et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; GOMIDE et al., 2012; MOUROT et al., 1994). Gonçalves et al. (2014), Gomide et al. (2012) e Hansen et al. (2009) incluíram até 16% de glicerina na dieta de suínos em terminação e, em todas essas pesquisas, os resultados de desempenho, características de carcaça ou qualidade da carne não apresentaram prejuízos. Todavia, no que se refere ao aproveitamento metabólico do glicerol, o nível máximo de inclusão da glicerina bruta na ração de suínos machos castrados em fase de terminação ainda não está bem estabelecido.

A ractopamina, por sua vez, tem sido utilizada como suplemento na dieta de suínos a fim de se obter carcaças com menores teores de gordura e maior quantidade de massa magra, otimizando o processo de produção e tornando a carne desses animais mais competitiva no mercado. A ractopamina se liga a receptores β -adrenérgicos (β -AR) na membrana celular, desencadeando cascatas de sinalização intracelular que levam, aparentemente, ao aumento da síntese proteica e/ou diminuição de sua degradação (GUNAWAN et al., 2007; SALEM et al., 2006), bem como redução da lipogênese e/ou aumento da lipólise (KIM et al., 2010; LIU et al.,

2012). Entretanto, embora a ractopamina seja reconhecidamente um aditivo modificador do metabolismo animal, ainda é controverso se o seu principal mecanismo de ação sobre a redução da gordura corporal em suínos é por meio da inibição da lipogênese ou por estímulo da lipólise (ARAÚJO et al., 2014). Segundo Ferreira et al. (2013), o entendimento dos eventos de lipólise e/ou lipogênese decorrentes da suplementação de ractopamina na ração pode colaborar para a formulação de dietas com melhor balanceamento dos nutrientes promovendo melhores resultados zootécnicos dos suínos, justificando assim a necessidade de novos estudos que objetivem compreender melhor os efeitos metabólicos da ractopamina suplementada na dieta.

Portanto, tendo em vista o potencial da glicerina bruta para ser utilizada como ingrediente energético na ração animal e os relatos científicos sobre as melhorias provenientes da inclusão da dieta de suínos com ractopamina, tem-se como objetivo geral desta pesquisa compreender o metabolismo do glicerol em suínos machos castrados em fase de terminação alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta, na ausência e presença de ractopamina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Utilização da glicerina na alimentação de suínos em terminação

Na suinocultura, a alimentação é um dos fatores de maior custo no sistema produtivo, representando cerca de 70% do total, devido à grande utilização de milho como fonte energética na composição das rações (BERTECHINI, 2012). Assim, há um constante interesse por parte de nutricionistas acerca da obtenção de alimentos energéticos alternativos, que substituam os ingredientes tradicionais de forma eficaz e segura sem, contudo, afetar o desempenho, as características da carcaça e a qualidade da carne dos animais (GOMIDE et al., 2012). A glicerina tem se mostrado um ingrediente energético promissor na alimentação de suínos em terminação, com valores médios de energia metabolizável (EM) estimados, na matéria natural, de aproximadamente 3.200 a 3.500 kcal de EM/kg de glicerina bruta (KOVÁCS et al., 2011; MELO, 2012). Neste sentido, a glicerina vem sendo avaliada como forte candidata a atender a necessidade da indústria (BERENCHTEIN et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; GOMIDE et al., 2012; MOUROT et al., 1994).

Internacionalmente, a glicerina é classificada como “GRAS” (*Generally Regraded as Safe*), ou seja, é reconhecida como um alimento seguro (MENTEN; ZAVARIZE; SILVA, 2010). Ademais, a utilização da glicerina em alimentos destinados a humanos foi autorizada no Brasil pela resolução da ANVISA nº 386, de 5 de agosto de 1999 (ANVISA, 1999). Por sua vez, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Instrução Normativa de Nº 42, de 16 de dezembro de 2010 (MAPA, 2010), regularizou o uso da glicerina na alimentação animal e padronizou sua composição, visando a prevenção de intoxicações nos animais. Assim, recomenda-se que a glicerina usada como ingrediente na ração de monogástricos tenha no mínimo 80% de glicerol e, no máximo, 13% de umidade e 150 mg/kg (15%) de metanol (LOPES et al., 2012). Em excesso, o metanol pode ser convertido a formaldeído, que causa lesões na retina, entre outras complicações (DASARI, 2007).

Estudos avaliaram a inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na ração de suínos e não encontram efeitos significativos sobre o desempenho, as características de carcaça e a qualidade da carne desses animais (BERENCHTEIN et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; DUTTLINGER et al., 2012; GOMIDE et al., 2012; MADRID et al., 2013; MOUROT et al., 1994; SCHIECK et al., 2010; VILLELA et al., 2017). Duttlinger et al. (2012) demonstraram que a inclusão de até 5% de glicerina bruta na dieta de suínos em terminação não influenciou o desempenho (ganho de peso diário, consumo de ração, peso vivo final e eficiência alimentar)

ou as características de carcaça (peso da carcaça quente, rendimento de carcaça, espessura de toucinho e profundidade de lombo). Os autores também observaram um pequeno aumento de gordura saturada no toucinho e barriga, assim como o que foi relatado por Mourot et al. (1994) e Schieck et al. (2010), o que é desejado, uma vez que tais cortes de carne são destinados à obtenção de bacon. Madrid et al. (2013) estudaram a inclusão de glicerina bruta (87% de glicerol e 0,05% de metanol) na dieta de suínos em fases de crescimento e terminação e também demonstraram que sua adição em até 5% não afetou o desempenho, metabólitos sanguíneos (glicose, frutossamina e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 – IGF-1), digestibilidade de nutrientes e equilíbrio de nitrogênio. Similarmente, a inclusão de até 9% de glicerina (80% de glicerol e 0,3% de álcalis combinados) na dieta de suínos em crescimento e terminação não alterou o desempenho, as características de carcaça e a qualidade da carne, a qual foi baseada em parâmetros de pH, cor e perda de água por gotejamento do músculo longíssimo (BERENCHTEIN et al., 2010).

Teores de glicerina bruta um pouco superiores a esses também mostraram-se seguros para utilização na alimentação de suínos. Carvalho et al. (2013) verificaram que dietas contendo até 12% de glicerina bruta oriunda de óleo de soja (56% de glicerol e 11% de metanol) ou de glicerina mista oriunda de gordura animal e óleo de soja (55% de glicerol e 5% de metanol) não prejudicaram os resultados de desempenho e características de carcaça de suínos em terminação. Níveis de inclusão de até 16% de glicerina bruta na dieta de suínos em terminação também não alteraram tais resultados ou a qualidade da carne, como relatado por Gomide et al. (2012), (glicerina com 85% de glicerol e 0,16% de metanol), Gonçalves et al. (2014), (glicerina de óleo de soja com 75% de glicerol e 10% de metanol ou glicerina mista de óleo de soja e sebo com 68% de glicerol e 6% de metanol) e Hansen et al. (2009) (glicerina mista de óleo vegetal e sebo 76% de glicerol e 1,8% de metanol).

Em sua pesquisa com 16% de glicerina bruta incluída na alimentação de suínos em terminação, Gomide et al. (2012) relataram um aumento na capacidade de retenção de água e na maciez da carne, características desejáveis pela indústria de alimentos e pelo mercado consumidor. A menor perda de água na carne suína devido a suplementação da dieta desses animais com glicerol tem sido relatada desde a década de 90 (MOUROT et al., 1994) e relacionada à hipótese de que parte do glicerol ingerido possa ser destinado ao tecido muscular e lá promova retenção hídrica devido à alta pressão osmótica que exerce sobre a célula. Entretanto, tanto Mourot et al. (1994) quanto Gomide et al. (2012) não dosaram o teor de glicerol no tecido muscular dos suínos, o que poderia comprovar ou não a hipótese estabelecida para justificar os dados observados.

Contudo, quando 30% de glicerina bruta foi adicionada à ração de suínos em crescimento e terminação, houve piora da conversão alimentar, com menor ganho de peso pelos animais, sem qualquer alteração do consumo alimentar (KIJORA et al., 1995). Além disso, a inclusão de 30% de glicerina purificada na alimentação de suínos surtiu um outro efeito negativo, observado por Mendoza et al. (2010). Os autores relataram que a oxidação completa da urina dos animais que receberam esses altos níveis de glicerina resultou em 540% mais energia bruta do que a urina dos animais controle (dieta sem glicerina), representando elevada perda energética. Tais dados indicam que o aproveitamento de altos níveis de glicerina dietética pode ser limitado metabolicamente, porém a compreensão do metabolismo do glicerol em suínos permanece ainda incipiente.

2.2 Metabolismo do glicerol

2.2.1 A origem do glicerol e do glicerol 3-fosfato

O glicerol, um componente do metabolismo animal, é encontrado na circulação e no interior das células, tendo sua origem a partir de (1) gordura dietética, (2) lipólise no tecido adiposo e (3) hidrólise dos triacilgliceróis (TAGs) das lipoproteínas do sangue (GONÇALVES et al., 2014).

No estado alimentado, após a ingestão de gorduras dietéticas (~ 90% TAG), mais de 30% dos TAG são totalmente hidrolisados em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. O glicerol entra rapidamente nos enterócitos do intestino delgado e, posteriormente, alcança a circulação por meio da veia porta, sendo metabolizado, principalmente pelo fígado (LIN, 1977).

Os efeitos do fornecimento de níveis crescentes de glicerina dietética (0 a 16%) foram estudados em suínos em fase de crescimento e terminação. Os autores observaram que as concentrações plasmáticas de glicerol aumentaram linearmente com os teores de glicerina na ração; enquanto que os níveis plasmáticos de glicose e ácidos graxos livres não foram influenciados (HANSEN et al., 2009).

Em frangos de corte, Bernardino et al. (2014) encontraram respostas semelhantes, com aumentos no teor de glicerol plasmático com o fornecimento de rações contendo de 0 a 7% de glicerina. Estes resultados demonstram a absorção intestinal do glicerol presente na glicerina e seu transporte até o fígado de monogástricos (TAO et al., 1983). Além disso, indicam que a quantidade de glicerol absorvida pelo animal é dependente da concentração deste composto na dieta.

Durante estados de maior demanda energética, como jejum e exercício, a lipólise no tecido adiposo é aumentada pela ativação da lipase de TAG do adipócito e da lipase hormônio sensível (HSL), que inicia a quebra de TAG em AGL e monoacilglicerol (MAG). A última reação converte MAG em AGL e glicerol, sendo catalisada pela MAG lipase. No tecido adiposo, a atividade da glicerol quinase (GK), que catalisa a fosforilação inicial do glicerol a glicerol 3-fosfato (G3P), é desprezível e, por conseguinte, o glicerol resultante da degradação de TAG não é normalmente utilizado no tecido adiposo. Por isso, AGL e glicerol gerados são exportados para o sangue para servir como combustíveis para outros tecidos (LEBECK, 2014; NELSON; COX, 2014).

Uma proteína transmembrana, a aquaporina 7 (AQP7), promove a liberação do glicerol a partir do tecido adiposo (LI et al., 2008; MAEDA et al., 2004), sendo sua deficiência associada ao acúmulo de TAGs no tecido adiposo e à obesidade em camundongos (HARA-CHIKUMA et al., 2005; HIBUSE et al., 2005). Além disso, foi verificado que a abundância de AQP7, tanto em nível transcricional quanto proteico, ocorre em paralelo aos níveis plasmáticos de glicerol, com aumento da expressão durante o jejum e diminuição com a alimentação (KISHIDA et al., 2000; KISHIDA et al., 2001b).

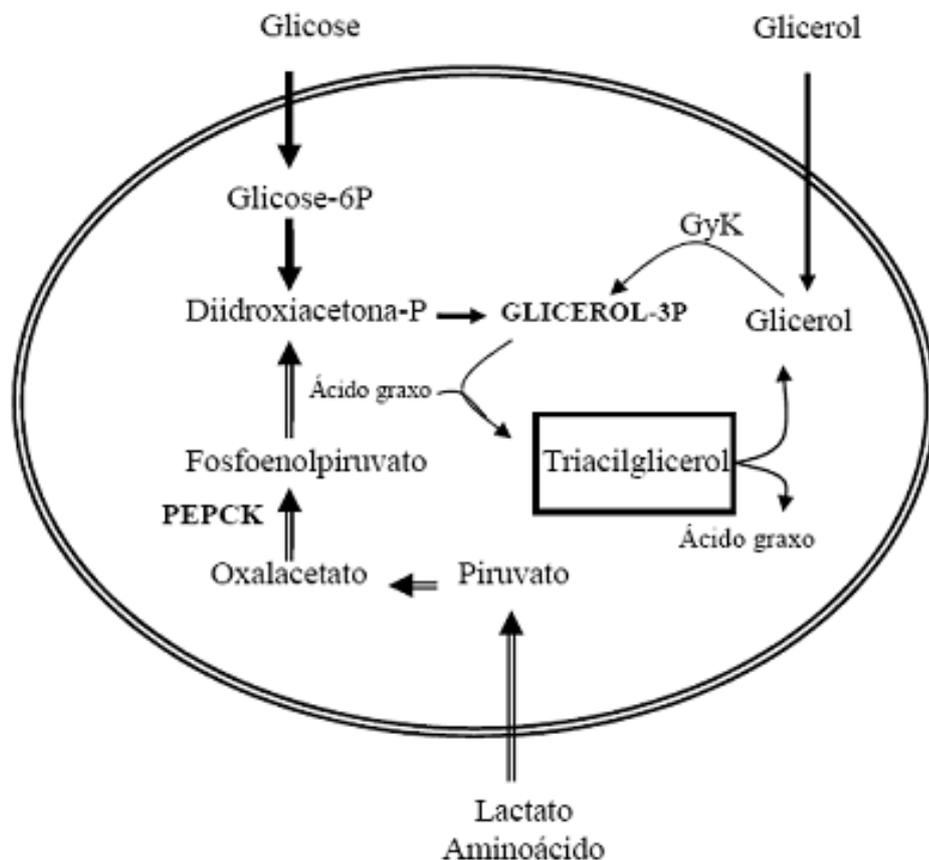
Também tem sido relatada a expressão da AQP7 no rim de suínos (LI et al., 2008), camundongos (KISHIDA et al., 2001a, b) e humanos (HIBUSE et al., 2006), mesmo que baixa, quando comparada ao tecido adiposo. Sohara et al. (2005) detectaram, por imunohistoquímica, a AQP7 nos túbulos proximais do rim de camundongos e observaram elevado teor de glicerol na urina (glicerolúria) de animais knockout para AQP7, concluindo, conseqüentemente, que a AQP7 tem importante papel na reabsorção renal do glicerol. Além disso, segundo Lin (1977), o rim é responsável por, aproximadamente, 1/5 da capacidade total do organismo em metabolizar o glicerol; enquanto que o fígado responde por cerca de 3/4 desta capacidade.

Assim, a maior parte do glicerol, resultante seja da absorção intestinal, da liberação pelo tecido adiposo ou da reabsorção renal, alcança o fígado, sendo captado pela aquaporina 9 (AQP9) (LEBECK, 2014; MAEDA, 2012). Da mesma forma que para a AQP7, o nível de mRNA para AQP9 também aumenta com o jejum e diminui com a alimentação (CALAMITA et al., 2012; CARBREY et al., 2003; KURIYAMA et al., 2002). Os efeitos da deficiência de AQP9 sobre o metabolismo foram estudados por Rojek et al. (2007), os quais observaram que camundongos AQP9^{-/-} exibiram hiperglicerolemia em comparação aos camundongos AQP9^{+/-}. Uma vez dentro do hepatócito, o glicerol pode ser utilizado, conforme a necessidade da célula no momento considerado, para a lipogênese, gliconeogênese e/ou como substrato para a via glicolítica (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; LEBECK, 2014; NELSON; COX, 2014).

O primeiro passo para utilização do glicerol é a sua fosforilação a G3P, no fígado ou rim, pela enzima GK, uma enzima chave no metabolismo do glicerol. Na ausência da fosforilação, o glicerol é excretado pelo organismo, o que representa dupla perda nutricional, uma vez que, o glicerol não produzirá a energia que poderia e haverá gasto energético para sua excreção (XUE; CHENG; JIANG, 2017).

Existem outras duas formas de obtenção do G3P: (1) a partir da glicose, usando as primeiras reações da rota glicolítica até a produção de diidroxiacetona-fosfato (DHAP), seguida da redução da DHAP a G3P, pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (GPDH) (LEBECK, 2014; NELSON; COX, 2014) e (2) por meio da gliceroneogênese, uma via que converte alanina, lactato e/ou piruvato em G3P. A gliceroneogênese envolve a carboxilação do piruvato a oxaloacetato e a descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato (PEP), tendo como enzima chave a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK-C) (FIGURA 1) (LEBECK, 2014; MORENO, 2012; CHAVES et al., 2006).

Figura 1: Vias de obtenção do glicerol 3-fosfato.



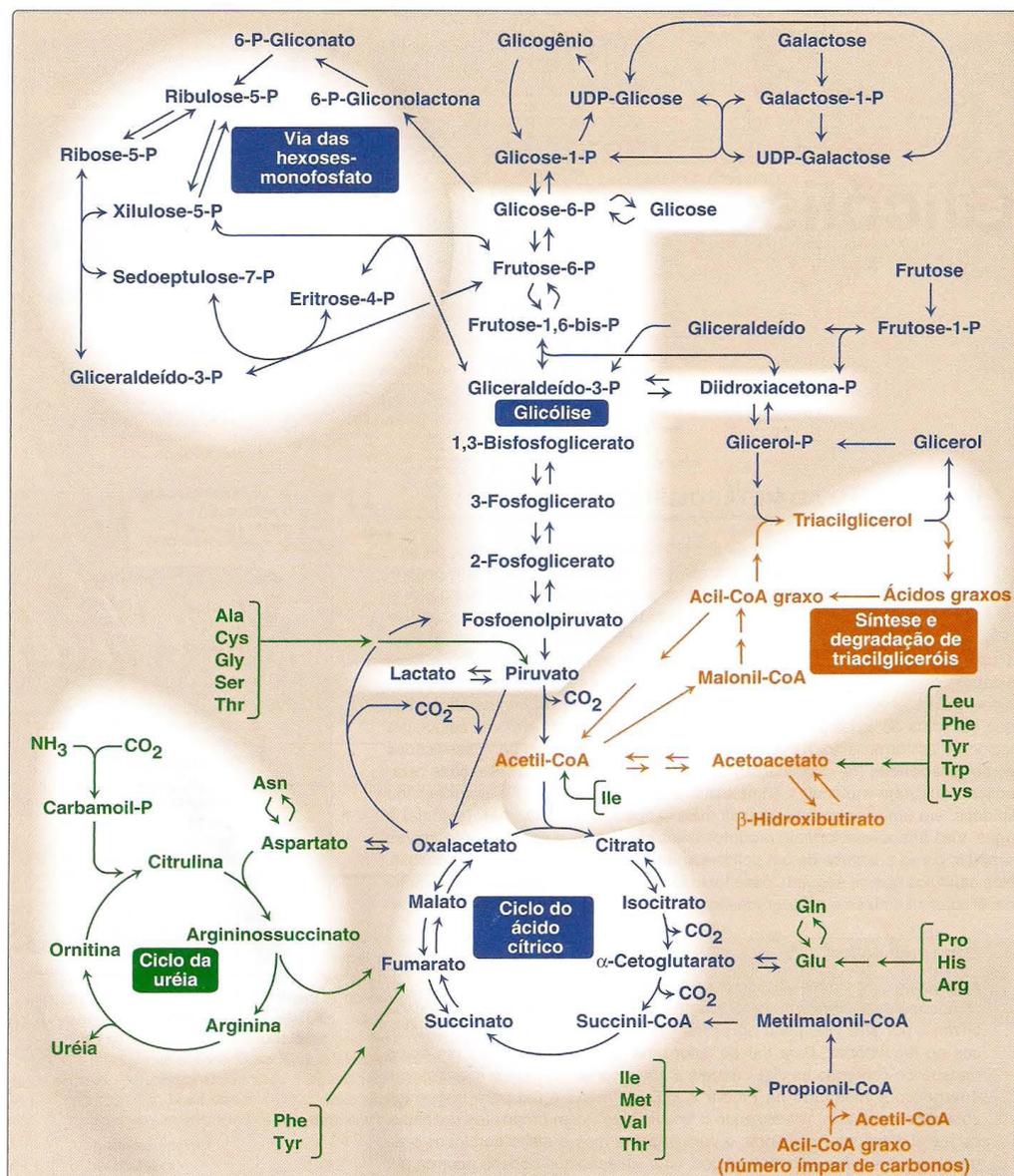
Legenda: GyK, glicerol quinase; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

Fonte: Adaptado de Chaves et al., 2006.

Como dito anteriormente, os adipócitos possuem baixa atividade da GK e, portanto, obtém o G3P a partir da glicólise ou da gliceroneogênese (LEBECK, 2014; MORENO, 2012).

O G3P pode ser destinado à síntese de lipídeos (lipogênese) ou convertido a diidroxiacetona-fosfato (DHAP), pela ação da enzima GPDH. A DHAP, por sua vez, pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato pela triose fosfato isomerase e, dependendo do estado energético do animal, este intermediário pode ser utilizado metabolicamente para a síntese de glicose (gliconeogênese) ou ser completamente oxidado para a produção de energia, via glicólise e ciclo de Krebs (FIGURA 2) (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014; XUE; CHENG; JIANG, 2017).

Figura 2: Reações importantes do metabolismo intermediário.

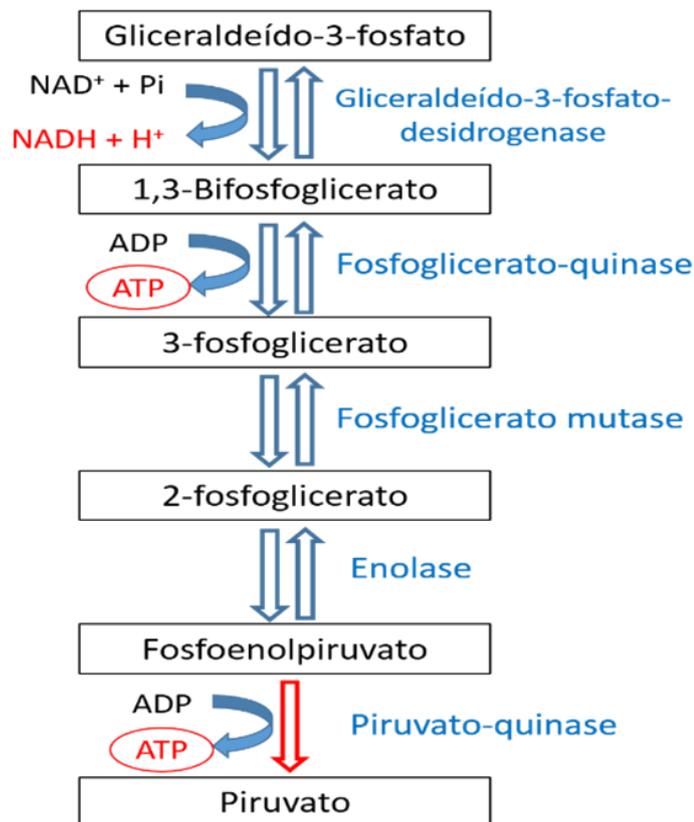


Fonte: Champe, Harvey e Ferrier, 2009.

2.2.2 O glicerol como substrato para a via glicolítica

Como relatado no item 2.2.1, o gliceraldeído-3-fosfato é um intermediário que pode ser completamente oxidado na via glicolítica e no ciclo de Krebs, para gerar energia. Este composto entra na fase de pagamento da glicólise, especificamente na reação de número 6 (FIGURA 3).

Figura 3: Glicólise - fase de pagamento.



Fonte: Do autor (2018).

Reação 6: Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato

Neste passo, o gliceraldeído-3-fosfato é oxidado (desidrogenado) pelo NAD^+ , que se reduz a NADH , e fosforilado por um fosfato inorgânico, dando origem ao 1,3-bifosfoglicerato (1,3 BPG). Esta reação é catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, reversivelmente.

Reação 7: Síntese do 3-fosfoglicerato com produção de ATP

Na reação 7, o 1,3 BPG transfere um grupo fosfato para uma molécula de adenosina difosfato (ADP), dando origem a uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) e ao 3-fosfoglicerato. Esta é a primeira etapa da glicólise que sintetiza ATP diretamente na via e é

catalisada pela enzima fosfoglicerato-quinase, que, ao contrário da maior parte das quinases, é fisiologicamente reversível.

Reação 8: Troca do grupo fosfato do carbono 3 para o carbono 2

Na 8ª reação, a enzima fosfoglicerato-mutase promove a mudança do grupo fosfato do carbono 3 para o carbono 2 do fosfoglicerato, dando origem ao 2-fosfoglicerato, preparando o substrato para a próxima reação. Trata-se de uma reação livremente reversível.

Reação 9: Desidratação do 2-fosfoglicerato

A reação 9 é uma reação de desidratação catalisada pela enzima enolase. O 2-fosfoglicerato é desidratado formando uma molécula de água e o PEP, que contém um enol fosfato de alta energia. A reação é reversível, apesar do produto ser um composto altamente energético.

Reação 10: Formação do piruvato com produção de ATP

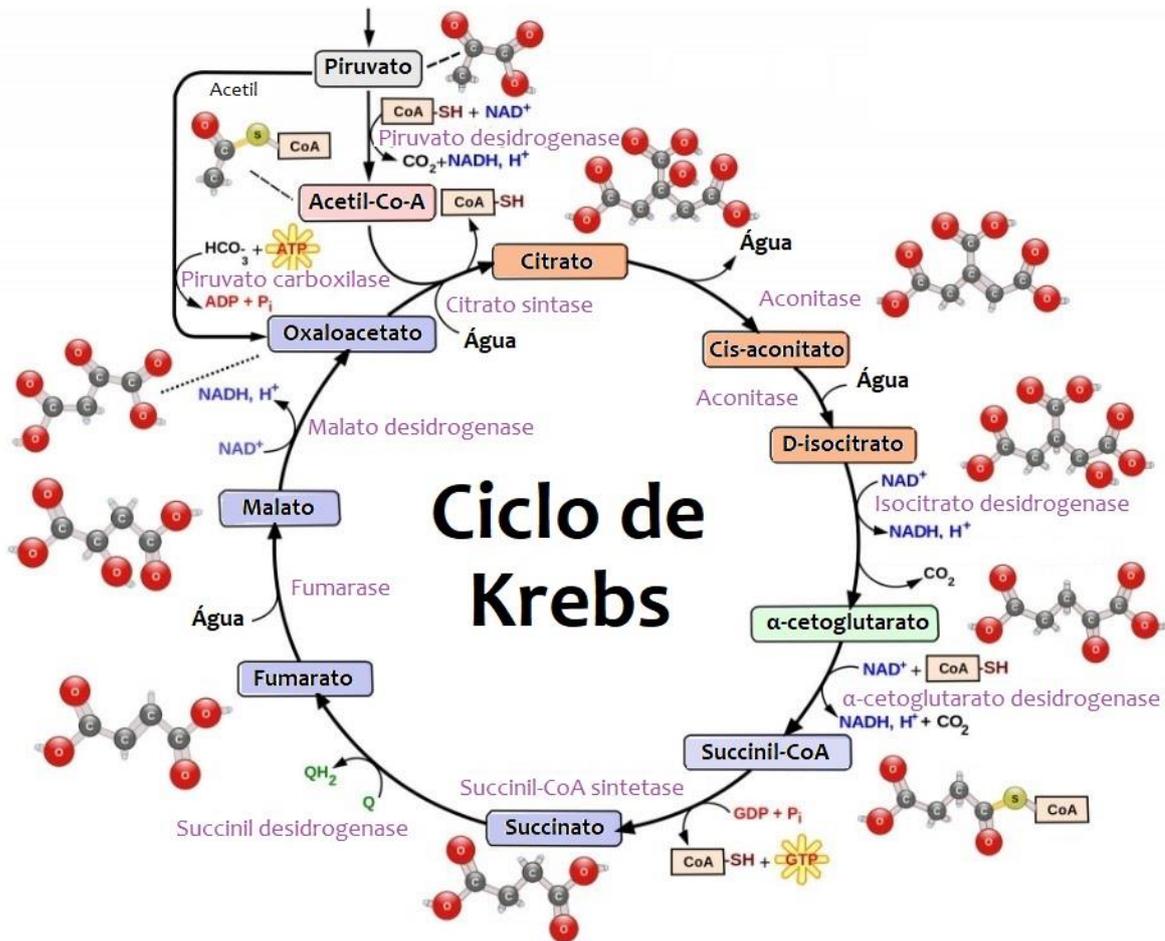
Na 10ª reação, a última desta via metabólica, há transferência do grupo fosfato do PEP para uma molécula de ADP, formando, assim, uma molécula de ATP e piruvato. Esta reação é catalisada pela enzima piruvato-quinase, sendo a terceira reação irreversível da glicólise (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

Para cada molécula de gliceraldeído-3-P obtida do glicerol, são produzidos na via glicolítica 2 ATPs de forma direta, por fosforilação ao nível do substrato e 2,5 ATPs de forma indireta, pois o NADH produzido gera energia para síntese de ATP por fosforilação oxidativa na cadeia respiratória.

O destino do piruvato depende da célula e das circunstâncias metabólicas, sendo duas rotas possíveis em mamíferos, que produzem: (1) acetil-CoA e (2) ácido láctico.

Em organismos aeróbios ou em tecidos sob condições aeróbias, o piruvato pode ser descarboxilado oxidativamente, de forma irreversível, pela piruvato-desidrogenase, produzindo acetil-CoA, o principal combustível para o ciclo do ácido cítrico ou de Krebs (FIGURA 4) e bloco constitutivo para a síntese de ácidos graxos. O piruvato também pode ser carboxilado a oxalacetato (um intermediário do ciclo do ácido cítrico) pela piruvato-carboxilase, dependente de biotina (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

Figura 4: Ciclo de Krebs.



Fonte: Adaptado de <http://www.npr.org/sections/health-shots/2015/04/21/401254790/would-doctors-be-better-if-they-didnt-have-to-memorize>. Acesso em: 15 de julho de 2016.

Na glicólise anaeróbia, a lactato-desidrogenase converte o piruvato em ácido láctico, sendo o NADH reoxidado a NAD⁺. Isso ocorre em células que apresentam pouca ou nenhuma mitocôndria, como os eritrócitos, e em tecidos onde a produção de NADH excede a capacidade oxidativa da cadeia respiratória, tais como o músculo em exercício (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

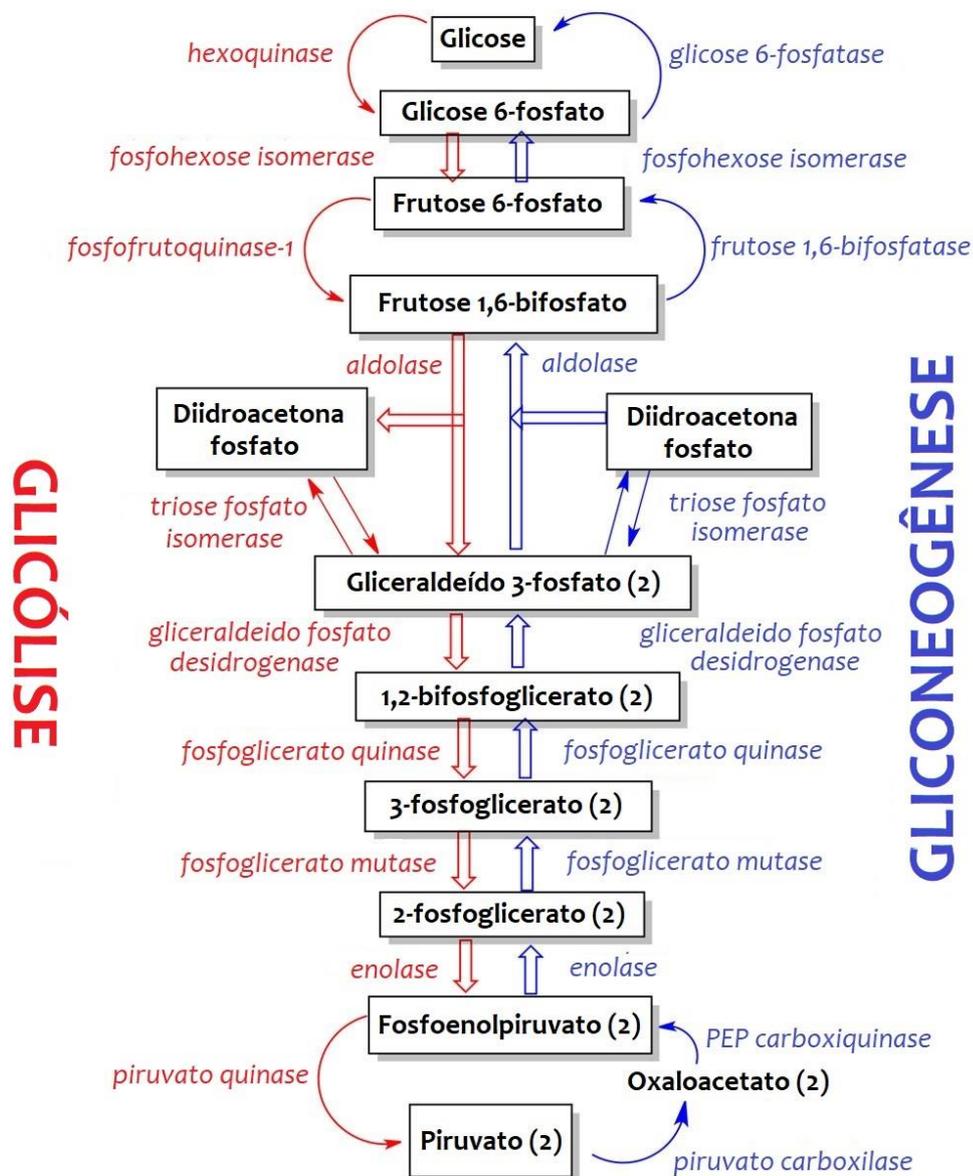
2.2.3 O glicerol na gliconeogênese

Em oposição à via glicolítica, o gliceraldeído-3-fosfato, obtido do glicerol, também pode ser utilizado para a síntese de glicose, pela via gliconeogênica.

Neste caso, a primeira reação necessária é a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, pela simples reversão da via glicolítica. Já a reação seguinte, por ser irreversível na via glicolítica, precisa ser contornada. Assim, a hidrólise da frutose-1,6-

bisfosfato pela frutose-1,6-bisfosfatase contorna a reação irreversível da fosfofrutoquinase-1 e fornece uma via energeticamente favorável para a formação de frutose-6-fosfato. A próxima etapa é facilmente reversível, ocorrendo a conversão de frutose-6-fosfato para glicose-6-fosfato. Por fim, a hidrólise da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase contorna a reação irreversível da hexoquinase e fornece uma via energeticamente favorável para a formação de glicose livre (FIGURA 5) (NELSON; COX, 2014; XUE; CHENG; JIANG, 2017).

Figura 5: Glicólise e Gliconeogênese.



Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphoglycerate_kinase#/media/File:Glycolytic_and_gluconeogenic_pathways.jpg. Acesso em: 15 de julho de 2016.

Estudos indicam que o papel da AQP7 e da AQP9 reside, principalmente, no suprimento do glicerol para a gliconeogênese (JELEN et al. 2011; KURIYAMA et al., 2002; MAEDA et al., 2004, 2008 e 2009). Tal conclusão foi baseada em uma série de observações, como níveis plasmáticos reduzidos de glicose e não alterados de insulina em camundongos knockout para AQP7 (MAEDA et al., 2004), maior expressão de AQP7 e AQP9 durante estados de baixos níveis de insulina (KISHIDA et al., 2001a, b; MAEDA et al., 2008 e 2009) e, na falta de AQP9, o fígado não aumenta sua produção de glicose em resposta à perfusão com glicerol (JELEN et al. 2011; KURIYAMA et al., 2002).

Mensurações da quantidade de glicerol utilizado para a gliconeogênese no estado de jejum foram, essencialmente, realizadas em seres humanos e demonstram grande variabilidade. Foram relatados valores de 38% em homens magros após um curto jejum até, aproximadamente, 100% em mulheres obesas após inanição prolongada (BABA et al., 1995; BORTZ et al., 1972; LANDAU et al., 1996; NURJHAN et al., 1986). Em geral, a proporção de glicerol utilizado para a gliconeogênese aumenta com o prolongamento do período de jejum. Mesmo tendo uma contribuição menor na geração hepática de glicose durante o jejum noturno, o glicerol torna-se cada vez mais importante como precursor para a síntese *de novo* de glicose com o jejum prolongado (LEBECK, 2014). Assim, a quantidade de glicose sintetizada *de novo* atribuída ao glicerol foi de 4,5 e 21,6% em homens saudáveis mantidos em jejum durante 14 e 62-86 horas, respectivamente (BABA et al., 1995).

2.2.4 O glicerol na lipogênese

No fígado, intestino, rim, glândula mamária ativa, tecido adiposo e músculo estriado esquelético o glicerol pode ser destinado à síntese de acilgliceróis. Mono-, di- e triacilgliceróis consistem em uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos esterificando uma molécula de glicerol (XUE; CHENG; JIANG, 2017).

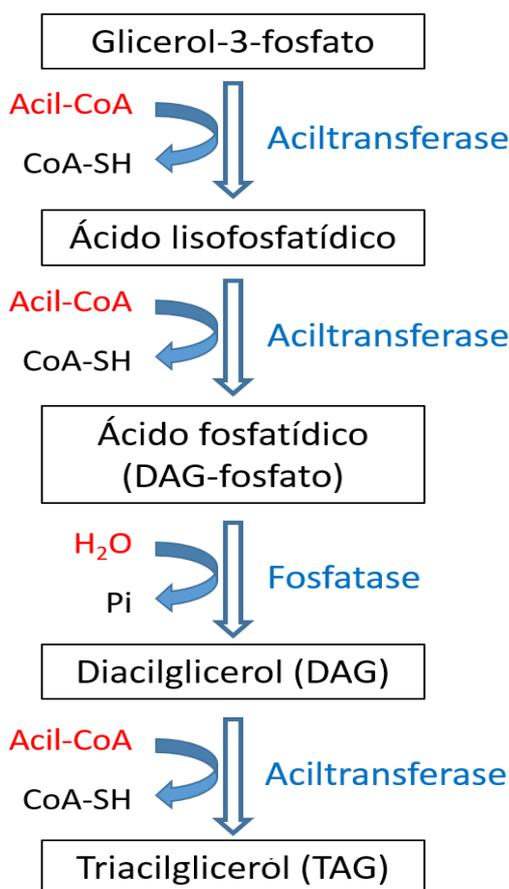
O G3P é o aceptor inicial dos ácidos graxos durante a síntese de acilgliceróis. Os ácidos graxos precisam ser ativados à acil-CoA graxo (por meio da união com a coenzima A), antes de participarem da síntese de acilgliceróis. Tal ativação é catalisada por uma família de acil-CoA-sintetases (tiocinases) (XUE; CHENG; JIANG, 2017).

Na primeira reação de biossíntese dos TAGs, ocorre a acilação dos dois grupos hidroxila livres do G3P por duas moléculas de acil-CoA graxo, pela ação da glicerol 3-fosfato-aciltransferase, a fim de formar diacilglicerol 3-fosfato (fosfatidato ou ácido fosfatídico). Embora o diacilglicerol 3-fosfato ocorra apenas em quantidades muito pequenas nas células,

ele é um intermediário central na biossíntese dos lipídeos e pode ser convertido tanto em TAGs quanto em glicerofosfolipídeos (NELSON; COX, 2014).

Na via que leva aos TAG, o diacilglicerol 3-fosfato é convertido a 1,2-diacilglicerol, pela enzima fosfatidato-fosfatase. Na última etapa, a enzima diacilglicerol-aciltransferase promove a acilação da posição sn-3 do 1,2-diacilglicerol, convertendo-o em triacilglicerol (TAG) (FIGURA 6) (AMEER et al., 2014; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009).

Figura 6: Síntese de triacilglicerol.



Fonte: Do autor (2018).

Relatos mostram que a proporção de glicerol utilizado para a síntese de TAG varia desde apenas 6% em mulheres após 16 horas de jejum (KAHN; FLIER, 2000) até mais de 60% em homens jovens submetidos ao jejum por 14 horas (BABA et al., 1995). Em tilápia do Nilo, níveis de inclusão de 10 e 15% de glicerol na ração levaram aos maiores níveis plasmáticos de TAGs, maior atividade hepática das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e GK, indicando que, para tais níveis de inclusão, o glicerol é um importante precursor lipogênico (COSTA et al., 2015).

2.3 Lipogênese em suínos

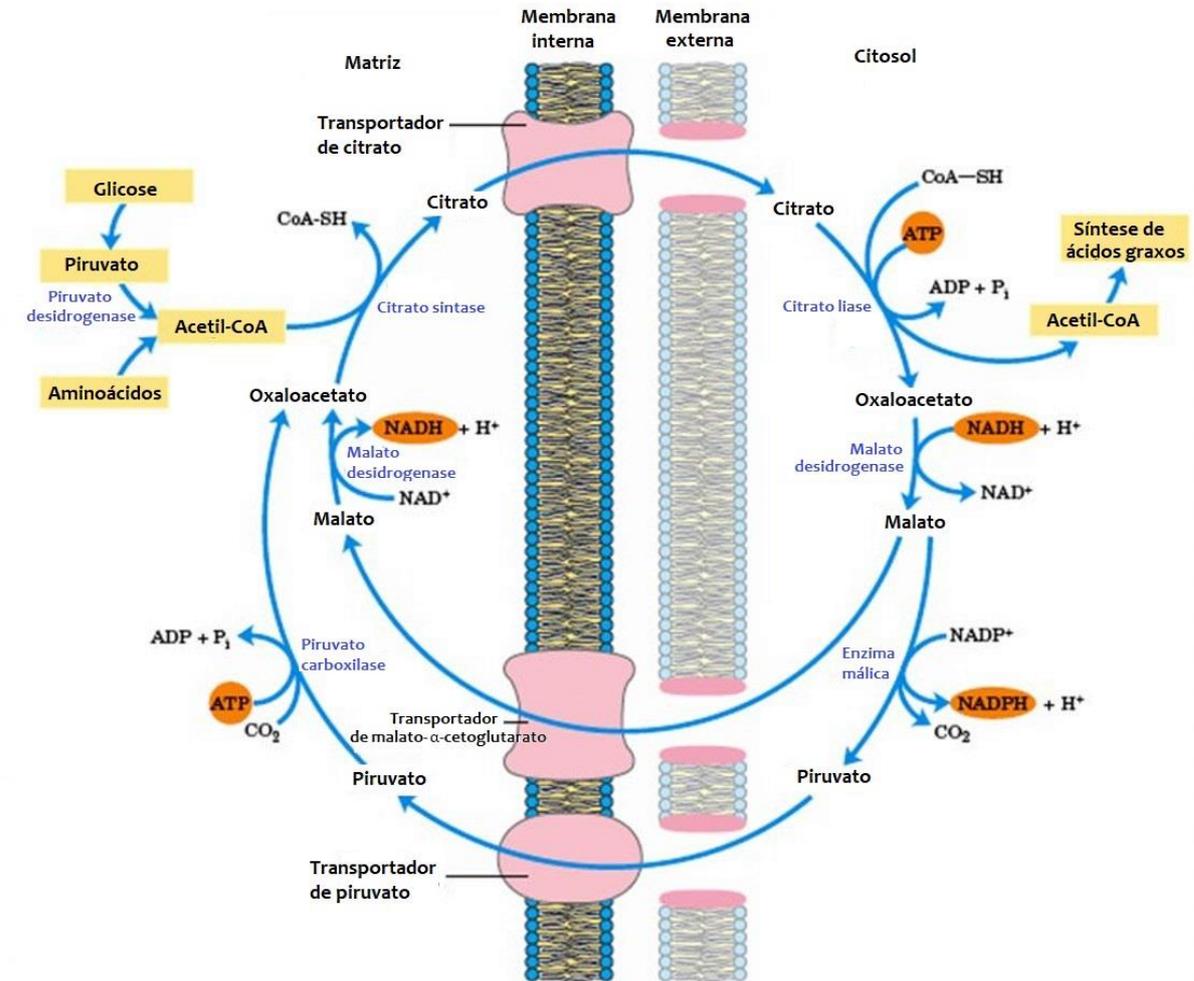
2.3.1 Mecanismos bioquímicos da lipogênese

O termo lipogênese pode se referir a todos os processos que levam à síntese de lipídeos, tanto a partir de compostos lipídicos (ácidos graxos pré-formados da dieta), quanto a partir de componentes não lipídicos em excesso na alimentação. Já de forma mais específica, a expressão “lipogênese de novo” é usada para a síntese endógena de ácidos graxos a partir de precursores não lipídicos, especialmente carboidratos. O termo também pode ser utilizado em um sentido mais restrito e referir-se à síntese endógena de palmitato, incluindo ou não as transformações bioquímicas que este composto pode sofrer (dessaturação e alongação) e sua subsequente esterificação (síntese de TAGs). A lipogênese não deve ser confundida com a adipogênese, que se refere à diferenciação dos pré-adipócitos em células adiposas maduras (KERSTEN, 2001; BERTECHINI, 2012; AMEER et al., 2014).

A lipogênese é um processo citosólico, que ocorre no fígado e no tecido adiposo, também na glândula mamária em lactação e em menor extensão nos rins, por incorporação de carbonos à molécula acetil-CoA, a fim de formar uma cadeia de ácido graxo, utilizando ATP e NADPH (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

A acetil-CoA, fonte para a síntese de ácidos graxos, é produzida dentro da mitocôndria pela oxidação do piruvato, corpos cetônicos e aminoácidos. Assim, a primeira etapa da síntese de ácidos graxos é a translocação da acetil-CoA mitocondrial para o citosol (FIGURA 7). Entretanto, a coenzima A (CoA), componente da acetil-CoA, não é capaz atravessar a membrana mitocondrial interna, por isso, a transferência ocorre na forma de citrato, que é produzido pela união do oxaloacetato (OAA) com a acetil-CoA. Tal processo de transferência acontece quando a concentração mitocondrial de citrato é alta, o que, por sua vez, é causada pela inibição da enzima isocitrato desidrogenase devido à grande quantidade de ATP. Desta forma, o citrato citosólico pode ser reconhecido como um indicador de alta energia e ambos, citrato e ATP elevados, favorecem essa via metabólica (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009).

Figura 7: O transporte de acetil-CoA para o citosol.



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/9537294/>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2018.

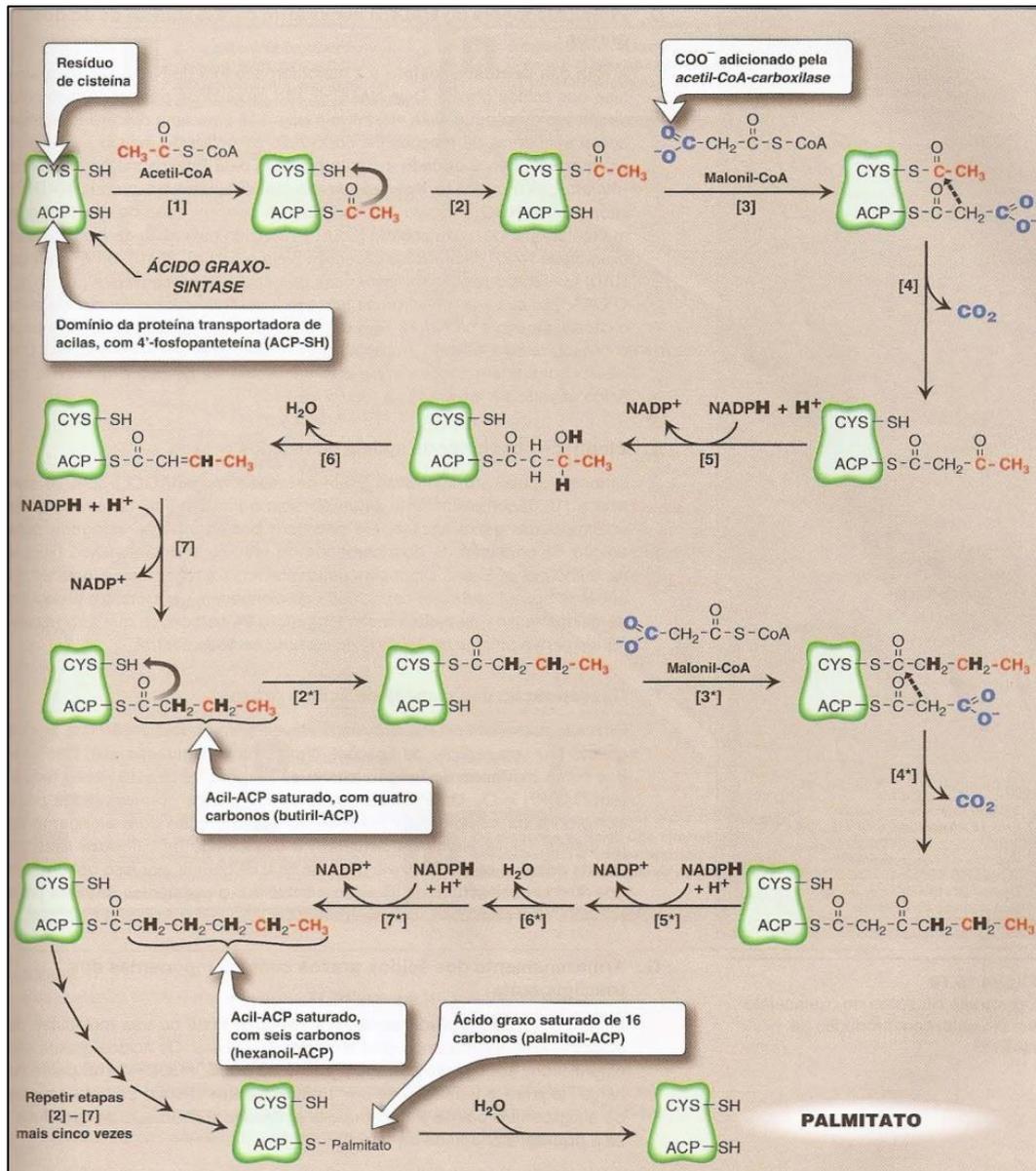
Uma vez no citosol, o citrato é clivado pela ATP-citrato-liase, resultando em acetil-CoA e OAA. A acetil-CoA é, então, convertida a malonil-CoA pela ação da acetil CoA carboxilase (ACoAC), com consumo de ATP e CO_2 , carregado por uma coenzima, a biotina. Tal processo de carboxilação e posterior descarboxilação irá gerar a energia necessária para as condensações carbono-carbono na síntese de ácidos graxos. A ACoAC inativa apresenta-se como um dímero e a regulação de sua atividade pode se dar a curto e a longo prazo. A curto prazo e de forma alostérica, essa enzima é ativada pelo citrato, o que provoca sua polimerização e inativada pelos produtos, malonil-CoA e palmitoil-CoA, levando à sua despolimerização. Também a curto prazo, um segundo mecanismo de controle é a fosforilação reversível, em que, na presença de adrenalina e glucagon, a enzima é fosforilada e, conseqüentemente, inativada; na presença de insulina, a enzima é desfosforilada e, portanto, ativada. A regulação de longa duração ocorre

pela dieta. Assim, dietas hipercalóricas, principalmente aquelas com alto conteúdo de carboidratos, aumentam a síntese de ácidos graxos, pois estimulam a síntese de ACoAC. Em contrapartida, o jejum, dietas hipocalóricas ou com altos teores de gordura provocam redução na síntese de ACoAC, diminuindo a lipogênese. A enzima ácido graxo sintase (FAS), que será abordada a seguir, também é regulada por esse mesmo tipo de manipulação dietética (AMEER et al. 2014; NELSON; COX, 2014).

Na última fase da síntese de ácidos graxos, as reações são catalisadas por uma enzima dimérica multifuncional, a FAS (FIGURA 8). Cada monômero da FAS possui sete atividades enzimáticas diferentes e um domínio que se liga à fosfopanteteína, denominado ACP (proteína carreadora de acila). Cada sítio tem um papel fundamental nessa fase final da síntese de ácido graxo. A primeira etapa tem início com a transferência de uma unidade de acetato da acetil-CoA para o grupo tiol (-SH) da ACP, no domínio acetil-CoA-ACP-acetiltransacilase (1). A seguir, tal molécula (com dois carbonos) é transferida, temporariamente, para o grupo -SH de uma cisteína da enzima, deixando a ACP livre (2). A ACP recebe, então, uma molécula de malonato (com três carbonos) da malonil-CoA, no domínio: malonil-CoA-ACP-transacilase (3). O grupo acetila, ligado ao resíduo de cisteína, se une ao grupo malonila, ligado ao domínio ACP, liberando CO₂, originalmente adicionado pela acetil-CoA-carboxilase. A perda da energia livre gerada por tal descarboxilação favorece a reação, resultando em um fragmento com quatro carbonos unidos ao domínio ACP. Domínio: 3-cetoacil-ACP-sintase (4). No domínio: 3-cetoacil-ACP-redutase, o grupo cetona é reduzido a um álcool, utilizando NADPH (5). Em seguida, ocorre hidrólise e formação de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (carbonos α e β), no domínio: 3-hidroxiacil-ACP-desidratase (6). Finalmente, no domínio: enoil-ACP-redutase, a ligação dupla é reduzida, também pelo consumo de NADPH (7) (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

O resultado dessas sete etapas é a produção de um composto com quatro carbonos (butiril), cujos três carbonos terminais estão totalmente saturados e que permanece unido à ACP. As sete etapas são repetidas, começando com a transferência da cadeia butiril da ACP para o resíduo de cisteína (passo 2 acima) e seguindo as etapas subsequentes (passos 3 a 7). Esse ciclo de reações é repetido seis vezes, incorporando, a cada vez, dois carbonos (derivados da malonil-CoA) na extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo em crescimento. Ao atingir o comprimento de 16 carbonos, o processo de síntese do ácido graxo termina, gerando o palmitoil-S-ACP. A enzima palmitoil-tioesterase cliva a ligação tioéster, produzindo o palmitato (16:0), completamente saturado (NELSON; COX, 2014).

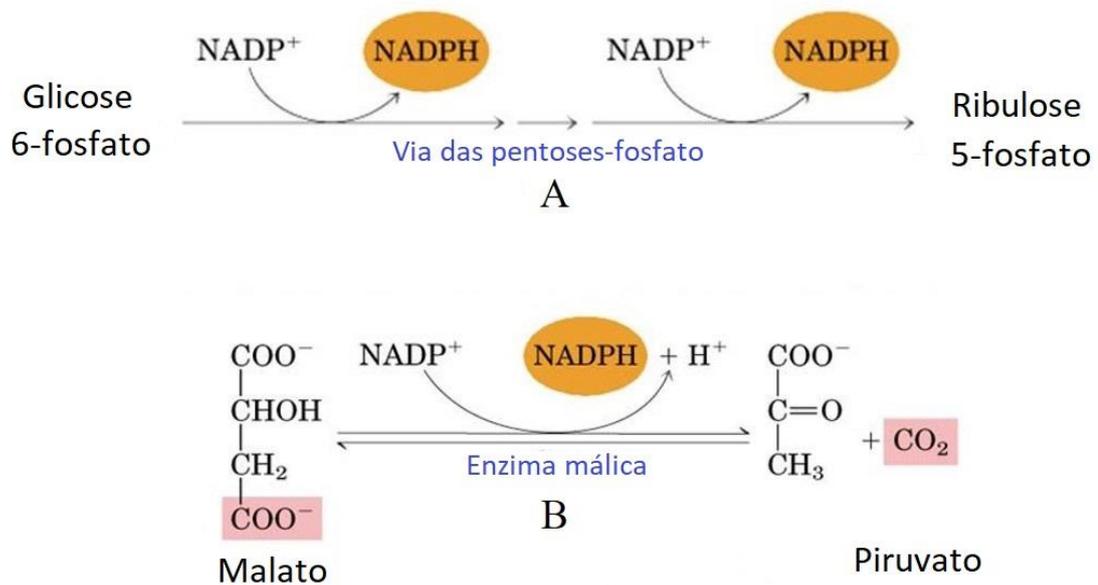
Figura 8: Síntese do palmitato (16:0) pelo complexo da ácido graxo sintase.



Fonte: Champe, Harvey e Ferrier, 2009.

O NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos é oriundo de dois processos metabólicos distintos (FIGURA 9). A via das pentoses-fosfato gera dois NADPHs para cada molécula de glicose que segue essa rota. Tal via é regulada basicamente na reação catalisada pela enzima G6PDH (FIGURA 9A). A outra fonte de NADPH é a conversão citosólica de malato a piruvato, em que o malato é oxidado e descarboxilado pela enzima málica (ME) citosólica (malato-desidrogenase dependente de NADP), e também produz CO₂ (FIGURA 9B) (AMEER et al., 2014).

Figura 9: Síntese de NADPH que será utilizado na síntese de ácidos graxos.



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/10182374/>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2018.

Como dito anteriormente, o palmitato (16:0), totalmente saturado, é o produto final, resultante da atividade da FAS. Entretanto, este composto pode sofrer modificações subsequentes para gerar ácidos graxos de cadeias mais longas e/ou insaturados. A elongação ocorre no retículo endoplasmático liso (REL) e requer um sistema de enzimas independentes. Neste processo, carbonos doados pela malonil-CoA serão acrescentados à cadeia do ácido graxo, sendo os elétrons fornecidos pelo NADPH. As reações de dessaturação requerem dessaturases presentes no REL, NADH, citocromo b5 e sua redutase ligada ao FAD. A primeira ligação dupla é tipicamente inserida entre os carbonos 9 e 10, produzindo principalmente 18:1(9) e pequena quantidade de 16:1(9). Os mamíferos possuem dessaturases para os carbonos 4, 5, 6 e 9, não havendo, portanto, a possibilidade de introdução de duplas ligações a partir do carbono 10 até o carbono terminal (ω) da cadeia. Essa é a razão pela qual os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) linoleico e linolênico são nutricionalmente essenciais. Não obstante, uma variedade de PUFAs pode ser produzida, por meio de dessaturação adicional combinada com elongação (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014).

Os TAGs sintetizados no tecido adiposo são armazenados no citosol das células, de forma quase anidra, contribuindo diretamente para a deposição de gordura local e para o armazenamento de energia em longo prazo. No fígado, os TAGs formados são, principalmente, exportados, ligados a ésteres de colesterol, fosfolipídeos e proteínas, a fim de formar as

lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs). A VLDL recém-formada é secretada no sangue, onde amadurece e entrega lipídeos endógenos para os tecidos periféricos (GONDRET; FERRÉ; DUGAIL, 2001).

2.3.2 Particularidades da lipogênese em suínos – sítio, precursores e destino dos triacilgliceróis

O tecido adiposo foi identificado como o principal contribuinte para a síntese de ácidos graxos em suínos (DING et al., 2000; HUANG; KUMMEROW, 1976; MERSMANN et al., 1973, 1976; MILDNER; CLARKE, 1991; O'HEA; LEVEILLE, 1969). *In vitro*, a atividade da ACoAC, FAS, citrato liase, malato-desidrogenase, G6PDH e 6-fosfogliconato-desidrogenase foi, consideravelmente, mais elevada no tecido adiposo suíno do que em outros tecidos testados (intestino delgado, fígado, coração e tecido aórtico), em paralelo com a sua elevada capacidade lipogênica (HUANG; KUMMEROW, 1976). Outra investigação *in vitro* demonstrou que a atividade das enzimas desidrogenases da via das pentoses e da ME são elevadas no tecido adiposo subcutâneo e abdominal de suínos e que o tecido adiposo subcutâneo parece ter uma capacidade lipogênica superior àquela obtida na gordura mesentérica (O'HEA; LEVEILLE, 1968).

Todavia, o tecido adiposo subcutâneo de suínos é heterogêneo, com algumas áreas exibindo taxas lipogênicas baixas e alta deposição lipídica por meio da importação de TAGs de outras áreas com alta lipogênese. Assim, as atividades das enzimas ACoAC, ME e G6PDH foram mensuradas em sete sítios anatômicos diferentes (5 subcutâneos, 1 visceral e 1 intermuscular) de suínos Large White (LW) em crescimento (20-120 kg de peso). As três atividades enzimáticas aumentaram até que os animais atingissem 40-60 kg de peso e, em seguida, diminuíram; com a ME se tornando o principal produtor de NADPH, independentemente do sítio adiposo. As atividades de todas as enzimas foram menores no pescoço e na garganta, mais altas no toucinho, pernil e gordura mesentérica, e intermediárias na barriga e no tecido adiposo intermuscular do pernil. O tecido adiposo subcutâneo da área do pescoço foi muito mais espesso e exibiu atividades enzimáticas lipogênicas muito mais baixas do que o toucinho (MOUROT; KOUBA; PEINIAU, 1995).

Também já está estabelecido que a capacidade lipogênica do tecido adiposo de suínos aumenta após o desmame. Uma investigação avaliou os efeitos do desmame de suínos com 2 ou 5 semanas de idade sobre o desempenho pós-desmame e o metabolismo da gordura. A capacidade lipogênica foi avaliada pela incorporação de acetato na fração lipídica total em

cortes de fígado e tecido adiposo ou pelo monitoramento da atividade da ATP-citrato-liase no fígado. Os autores relataram que a lipogênese foi maior no fígado do que no tecido adiposo em suínos com 2 a 5 semanas de idade, mas, na 5ª semana de idade do grupo desmamado precocemente e na 7ª semana do grupo desmamado mais tarde, a atividade lipogênica do tecido adiposo aumentou drasticamente (FENTON et al., 1985). Mersmann et al. (1973) examinaram a síntese de lipídeos, *in vitro*, em preparações de tecido adiposo e fígado de leitões com 2 a 60 dias de idade. No tecido adiposo, a incorporação de glicose ou acetato no lipídeo foi baixa até o desmame e marcadamente aumentada após. Além disso, as atividades das ME e ATP-citrato-liase foram baixas ao nascimento e aumentaram notavelmente após o desmame.

Em suínos, muitas investigações estabeleceram que a glicose é a principal fonte de carbono para a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo (MARTIN; HERBEIN, 1976; MERSMANN et al., 1973; O'HEA; LEVEILLE, 1968). De acordo com Etherton, Donkin e Bauman (1995), 80% da lipogênese *de novo*, em suínos, utiliza a glicose como substrato e apenas 20% da gordura sintetizada tem sua origem a partir de ácidos graxos presentes na dieta. Dunshea et al. (1992) demonstraram que mais de 40% do *turnover* da glicose é usado no tecido adiposo suíno para a lipogênese.

Em suínos, a síntese e a deposição da gordura ocorrem nos adipócitos (BERTECHINI, 2012). Assim, para a produção específica de VLDL hepática nesses animais, os ácidos graxos são liberados a partir de reservas do tecido adiposo, pela lipólise. Portanto, a síntese *de novo* de lipídeos e a síntese de lipoproteínas são, funcionalmente e anatomicamente, separadas em suínos (DODSON et al., 2010).

2.3.3 Regulação da lipogênese

Mecanismos genéticos, nutricionais e hormonais estão envolvidos na regulação do metabolismo lipídico (DING et al., 2000; GONDRET; FERRÉ; DUGAIL 2001; GONTIER et al., 2013; RESNYK et al., 2015). Em uma visão geral, a lipogênese é estimulada por uma dieta rica em carboidratos, ao passo que é inibida por PUFA's, por catecolaminas e pelo jejum. Estes efeitos são, em parte, mediados por hormônios, que inibem (hormônio do crescimento, leptina) ou estimulam (insulina) a lipogênese. Em função tanto da dieta quanto dos hormônios, as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são reguladas em nível transcricional, como por exemplo ACoAC, FAS, ME e G6PDH. Diversos fatores de transcrição estão envolvidos em tal regulação, tais como as proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs), fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1) e os receptores ativados por

proliferadores de peroxissoma (PPARs) (DING et al., 2000; GONDRET; FERRÉ; DUGAIL, 2001; KERSTEN, 2001).

2.3.3.1 Efeito do genótipo e/ou fenótipo sobre a lipogênese

Atividades das enzimas ACoAC, EM e G6PDH foram mensuradas em seis sítios anatômicos de suínos Meishan (20-100 kg de peso) e comparadas com dados previamente obtidos pela mesma equipe para suínos Large White (MOUROT; KOUBA; PEINIAU, 1995; MOUROT; KOUBA; BONNEAU, 1996). As atividades das enzimas G6PDH e EM foram maiores nos suínos Meishan do que nos Large White (LW). Em suínos Meishan, as atividades enzimáticas geralmente diminuíram com o peso, em contraste com o padrão de aumento-pico-diminuição, descrito para os animais LW. A G6PDH foi a principal produtora de NADPH, em suínos Meishan, enquanto que nos LW foi a EM. A atividade da ACoAC foi maior em animais mais leves Meishan (< 40 kg) do que nos LW, ao passo que o inverso foi observado nos suínos mais pesados. Como a taxa de lipogênese no tecido adiposo está estreitamente correlacionada com a atividade da ACoAC, este último resultado indica que o desenvolvimento do tecido adiposo ocorre muito mais cedo em animais Meishan do que nos LW (MOUROT; KOUBA; BONNEAU, 1996).

Muñoz et al. (2013) investigaram (1) se a seleção genética para a diminuição da espessura de toucinho com gordura intramuscular constante afeta a expressão de enzimas lipogênicas no fígado de suínos e (2) se a expressão hepática das enzimas lipogênicas está relacionada com o perfil de ácidos graxos na gordura subcutânea e intramuscular. As enzimas investigadas foram a FAS, estearoil-CoA-dessaturase e $\Delta 6$ -dessaturase ($\Delta 6d$). Os experimentos foram realizados em 30 machos castrados (15 controles e 15 selecionados). Os suínos selecionados apresentaram menor espessura de toucinho, que foi acompanhada por uma expressão reduzida de FAS e $\Delta 6d$ hepáticas, quando comparados ao grupo controle. Houve tendência a uma relação positiva entre a expressão da proteína FAS e $\Delta 6d$ e o conteúdo de ácidos graxos saturados (SFA) e PUFAS, respectivamente, na gordura subcutânea, mas não no músculo. Concluiu-se que a seleção contra a espessura de toucinho está associada a alterações na expressão das proteínas FAS e $\Delta 6d$ hepáticas. As alterações na expressão proteica não influenciaram significativamente a composição de ácidos graxos teciduais, sob estas condições.

Corominas et al. (2013) utilizaram a técnica de sequenciamento de alto rendimento de RNA para gerar um transcriptoma de caracterização do tecido adiposo (toucinho) de seis suínos mestiços Ibéricos x Landrace, com fenótipos divergentes para composição de ácidos graxos

intramusculares (três por grupo). A análise da expressão diferencial identificou 396 genes candidatos entre os animais divergentes para composição de ácidos graxos intramusculares. Sessenta e dois por cento destes genes (247/396) apresentaram maior expressão no grupo de suínos com maior teor de SFAs intramusculares e ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), enquanto que os 149 remanescentes mostraram expressão mais elevada no grupo com maior teor de PUFA. A análise de vias relacionou esses genes a funções biológicas e vias canônicas que controlam o metabolismo lipídico e de ácidos graxos. Em concordância com a classificação fenotípica dos animais, a principal via metabólica diferencialmente modulada entre os grupos foi a lipogênese *de novo*, sendo o grupo com mais PUFA o que apresentou menor expressão de genes lipogênicos.

Tomados em conjunto, os dados indicam que o genótipo e a especificidade tecidual influenciam os mecanismos de deposição de gordura em suínos, e estão associados com a regulação da expressão dos genes lipogênicos chave.

2.3.3.2 Regulação nutricional da lipogênese

2.3.3.2.1 Efeito do teor e tipo de carboidratos sobre a lipogênese

Dietas ricas em carboidratos estimulam a lipogênese, tanto no fígado quanto no tecido adiposo, conduzindo a elevados níveis plasmáticos de TAGs pós-prandiais (BRAUGE; CORRAZE; MEDALE, 1995; CATA CUTAN; COLOSO, 1997). Os níveis plasmáticos de glicose estimulam a lipogênese, por meio de vários mecanismos. Em primeiro lugar, a própria glicose é um substrato para a lipogênese, ao ser convertida em acetil-CoA pela via glicolítica. Em segundo lugar, a glicose induz a expressão de genes lipogênicos. Finalmente, a glicose estimula a liberação de insulina e inibe a de glucagon pelo pâncreas, favorecendo ainda mais a deposição de gordura (KERSTEN, 2001).

Além do teor, os diferentes tipos de carboidratos também podem influenciar o metabolismo lipídico. Dezesesseis leitões desmamados foram alimentados com dietas contendo amido de mandioca (80% de amilopectina e 20% de amilose) ou amido de milho (70% de amilopectina e 30% de amilose). Os resultados deste estudo mostraram que o amido de mandioca aumentou o teor de lipídeos no tecido hepático e as concentrações séricas de colesterol e insulina. Essas respostas metabólicas foram associadas a maiores concentrações de enzimas lipogênicas no fígado, tais como a FAS e a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase. Assim, este estudo sugere que a ingestão de amidos com alto teor de amilopectina pode produzir

uma resposta insulinêmica mais forte e aumentar a regulação da lipogênese hepática (HE et al., 2011). Outra investigação recente, conduzida por Yang et al. (2015), avaliou o efeito da relação amilose/amilopectina na alimentação de suínos em terminação. Os autores encontraram respostas semelhantes ao estudo anterior, com redução no teor de lipídeos hepáticos e nas concentrações plasmáticas de TAG e colesterol para a dieta com alta proporção amilose/amilopectina. Além disso, a ingestão dessa dieta resultou em regulação negativa do gene da FAS no fígado e no músculo longíssimo. Estes resultados sugerem que uma dieta com maior teor de amilose em detrimento de amilopectina é útil para reduzir a lipogênese, tanto no fígado, quanto nos músculos.

2.3.3.2.2 Efeito do teor de gordura e perfil de ácidos graxos sobre a lipogênese

Em contrapartida aos carboidratos, o aumento da gordura dietética, sem alteração na concentração da energia digestível, diminui a síntese *de novo* de ácidos graxos, no tecido adiposo e no fígado, e a atividade das enzimas relacionadas (BEE; GEBERT; MESSIKOMMER, 2002; BENMANSOUR et al., 1991; BRAUGE; CORRAZE; MEDALE, 1995; CATA CUTAN; COLOSO, 1997; GONDRET et al., 2014; O'HEA; LEVEILLE; SUGAHARA, 1970). A lipogênese *in vitro* foi estudada em amostras de tecido adiposo obtidos de suínos alimentados com diferentes níveis de gordura ou proteína na dieta. Os resultados mostraram que o aumento do nível de gordura dietética de 2,4 para 13,4% foi associado a uma redução média na síntese de ácidos graxos em 66%. Além disso, a relação inversa entre o teor de proteína na dieta e a lipogênese também foi observada. Tais alterações foram decorrentes da redução das atividades da enzima G6PDH e ME, nos animais que receberam dietas com alto conteúdo de proteína ou gordura (O'HEA; LEVEILLE; SUGAHARA, 1970).

Gondret et al. (2014) compararam uma dieta com baixo teor de gordura e baixa fibra (LF) e uma dieta com elevado teor de gordura e rica em fibras (HF), fornecidas a suínos LW. Os resultados mostraram que as atividades das enzimas lipogênicas (FAS, ME e G6PDH) no toucinho, gordura perirenal e músculo longíssimo foram muito menores nos suínos alimentados com a dieta HF do que naqueles alimentados com a dieta LF. Estes dados corroboram a observação de que a gordura dietética inibe a lipogênese em adipócitos isolados de suínos (BENMANSOUR et al., 1991). No fígado, a atividade da FAS foi reduzida em 32% nos suínos alimentados com HF em comparação com suínos que receberam a dieta LF, mas as atividades hepáticas de ME e G6PDH não diferiram entre as dietas (GONDRET et al., 2014). Estes dados coincidem com a descoberta de que a redução da espessura de toucinho está associada à redução

na expressão hepática de FAS (MUÑOZ et al., 2013), de modo que o fígado pode ter um contributo para o metabolismo lipídico e composição corporal.

Diferentes pesquisas avaliaram as respostas do metabolismo lipídico a diferentes fontes e tipos de ácidos graxos dietéticos. De maneira geral, dietas ricas em PUFAs da série ômega-3 podem diminuir a síntese lipídica, no fígado e tecido adiposo, ao suprimir a expressão de genes lipogênicos, tais como FAS, ACoAC e esteroil-CoA-dessaturase (SCD), melhorando a composição lipídica da carcaça (BENÍTEZ et al., 2015; KERSTEN, 2001; NIELSEN et al., 2005). Segundo estes autores, a supressão da transcrição dos genes que codificam enzimas da via de síntese de ácidos graxos é consistente com a menor necessidade de síntese de gordura pela via *de novo* em animais que já apresentam altas taxas de síntese de gordura a partir de ácidos graxos pré-formados (LANNA; HAYASHI; JOSÉ, 2001).

Estudos também avaliaram a inclusão do ácido linoleico conjugado (CLA) na dieta sobre a composição corporal e o metabolismo lipídico de suínos. Em um deles, o CLA reduziu o acréscimo de gordura corporal, independentemente do teor de gordura da dieta e sem influenciar no ganho de peso diário. Em paralelo, a expressão gênica de acetil CoA carboxilase alfa (ACACA) e da lipase lipoproteica (LPL), no tecido adiposo, também foi significativamente reduzida pelo tratamento com CLA, indicando que a inibição da captação e da síntese de ácidos graxos pelo tecido adiposo, e não o aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado ou no músculo foi responsável pela redução da deposição de gordura corporal (CORL et al., 2008). A adição de CLA na dieta de fêmeas suínas em lactação aumentou o consumo alimentar e o ganho de peso dos leitões no período pós-desmama. Além disso, o autor demonstrou um aumento na atividade da enzima G6PDH e ME no tecido adiposo, mas não na atividade da FAS, quando os leitões receberam uma dieta inicial com adição de CLA (BEE, 2000).

2.3.3.2.3 Efeito do teor de proteína e perfil de aminoácidos sobre a lipogênese

A produção de carne suína com grandes quantidades de gordura intramuscular (GIM), a chamada gordura de marmoreio, sem um aumento da gordura subcutânea é altamente desejável para a indústria e para os consumidores. A proporção de energia da proteína na dieta de suínos em fase de terminação pode ter impacto sobre o conteúdo de GIM, com consequências sobre a qualidade da carne. Assim, os estudos da última década têm focado sua atenção nos impactos do teor de proteína e tipos de aminoácidos sobre a lipogênese (HAMILL et al., 2013; KATSUMATA et al., 2011; LOPES et al., 2014; MADEIRA et al., 2013; MADEIRA et al., 2014).

Estudos demonstraram que dietas reduzidas em proteína promovem aumento do teor de GIM e que tal aumento é acompanhado por elevação dos níveis de mRNA para a FAS, SCD e PPAR γ (MADEIRA et al., 2013 e 2014).

O metabolismo lipídico no tecido adiposo e no músculo esqueléticos de suínos é afetado pelo perfil de aminoácidos dietéticos de diferentes maneiras e intensidades. Assim, faz-se necessário a descrição individual para os principais aminoácidos que influenciam tais parâmetros.

Os efeitos dos níveis de lisina (Lys) em suínos foram revisados por Katsumata et al. (2011). Os dados compilados mostram que dietas com baixas concentrações de Lys aumentam a expressão de mRNA para o transportador de glicose-4 (GLUT-4) e a proporção de fibras oxidativas nos músculos longíssimo e rombóide. Devido ao fato de que a maior capacidade oxidativa está associada a um maior teor de GIM, os autores hipotetizaram que a dieta baixa em Lys promoveria o acúmulo de GIM. Tal hipótese foi apoiada pela maior abundância muscular de mRNA para o PPAR- γ , um regulador chave da adipogênese e lipogênese, induzida pela dieta baixa em Lys.

Um aumento da taxa de deposição lipídica tem sido relatado em suínos em crescimento, alimentados com uma dieta deficiente em metionina (MR) (ZHOU et al., 2016). Por exemplo, uma composição lipídica superior e um menor ganho de peso corporal foram observados em suínos alimentados com dieta MR comparados àqueles que receberam dieta basal (CONDE-AGUILERA et al., 2010). Além disso, suínos alimentados com dieta MR apresentaram aumento do teor de TAGs no tecido adiposo subcutâneo, mas não no plasma (CASTELLANO et al., 2015). Estas alterações ocorreram em paralelo ao aumento da expressão de genes e proteínas envolvidos na lipogênese (ME, FAS, G6PDH, GLUT-4) mas também na lipólise (LPL, lipase de triacilglicerol do adipócito – ATGL), sugerindo aumento do *turnover* lipídico nesses animais. Diferente das modificações no tecido adiposo, parece não haver nenhuma alteração no metabolismo lipídico do fígado de suínos em resposta à dieta MR. Não foram observadas alterações hepáticas no conteúdo de lipídeos, FAS e atividades de enzimas oxidativas, como a citrato-sintase e a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, em suínos alimentados com a dieta MR (CASTELLANO et al., 2015; CONDE-AGUILERA et al., 2010). Uma possível razão para isto é a de que a contribuição hepática para a lipogênese, em suínos, é muito menor do que a do tecido adiposo (ZHOU et al., 2016).

No tecido adiposo de suínos, a arginina regulou negativamente a expressão de genes lipogênicos, tais como LPL e ACACA, e aumentou a expressão de genes lipolíticos, incluindo a HSL. Já no músculo, a atividade da LPL e a relação de mRNA para FAS e HSL foram mais

altas, conduzindo a um aumento no teor de GIM. Além disso, a diminuição da expressão do GLUT-4 no tecido adiposo sugere que os substratos energéticos são preferencialmente direcionados para o músculo esquelético, em vez do tecido adiposo branco (TAN et al., 2011). No fígado, a arginina aumentou a expressão da carnitina-palmitoil-transferase 1 (CPT-1), coativador do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma -1 α (PGC-1 α) e malonil-CoA descarboxilase (MCD) e deprimiu a expressão da FAS e SCD1 (JOBGEN, 2007 citado por TAN et al., 2012). Esses resultados indicam que a arginina regula diferencialmente a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo esquelético, no tecido adiposo branco e no fígado, favorecendo a lipogênese no músculo, mas a lipólise no tecido adiposo, enquanto que no fígado, inibe a síntese de ácidos graxos a partir da glicose.

A betaína (trimetilglicina ou glicina betaína) é um análogo da glicina, amplamente distribuído na natureza. Quimicamente, a betaína é um composto de amônio quaternário, caracterizada como uma metilamina, devido aos seus três grupos metil quimicamente reativos. A betaína pode funcionar como um osmoprotetor orgânico ou como um doador de grupos metil, por meio da transmetilação. Desta forma, tal composto pode reduzir parcialmente os requisitos de outros doadores metil (por exemplo, metionina, colina) e participar do metabolismo proteico e lipídico (HUANG et al., 2006). Estudos indicam que a betaína pode diminuir a deposição de gordura na carcaça de suínos (CASARIN; FORAT; ZABARAS-KRICK, 1997; HUANG et al., 2006; HUANG et al., 2008) e aumentar a massa magra (CASARIN; FORAT; ZABARAS-KRICK, 1997; CROMWELL et al., 1999; HUANG et al., 2006). No tecido adiposo subcutâneo de suínos em terminação, as atividades das ME, G6PDH, ACoAC e FAS, além do conteúdo de mRNA para FAS, reduziram com a suplementação de betaína, enquanto que a atividade da HSL aumentou significativamente (HUANG et al., 2006; HUANG et al., 2008). No fígado de leitões, a lipogênese também foi atenuada pela suplementação de betaína, como demonstrado pelas menores expressões hepáticas dos genes para ACoAC, FAS, SCD e SREBP-1c (CAI et al., 2016).

2.3.3.3 Regulação hormonal da lipogênese

2.3.3.3.1 Regulação pela insulina

A estimulação da síntese *de novo* de ácidos graxos pela insulina no tecido adiposo suíno, *in vitro* e *in vivo*, já foi documentada por muitos autores (BUDD et al., 1994; MILLS, 1999; O'HEA; LEVEILLE, 1970; SOMER et al., 1976; SOMER; SCHWARTZ, 1976; WALTON;

EHTERTON, 1986). A insulina estimula a lipogênese aumentando a captação de glicose pelo adipócito, via recrutamento de transportadores de glicose para a membrana plasmática, e ativando enzimas glicolíticas e lipogênicas, por meio de modificações covalentes. Tais efeitos são alcançados por meio da ligação da insulina ao receptor de insulina na superfície celular, ativando, assim, a atividade da tirosina-quinase e, conseqüentemente, a cascata de sinalização por meio da fosforilação da tirosina (KERSTEN, 2001). A insulina também apresenta efeitos a longo prazo na expressão de genes lipogênicos, tais como GLUT-4, FAS e ACoAC, provavelmente por meio da SREBP-1 (ASSIMACOPOULOS-JEANNET et al., 1995; FORETZ et al., 1999).

2.3.3.3.2 Regulação pelo hormônio do crescimento ou somatotropina

O hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina (ST) é outro importante hormônio relacionado ao metabolismo lipídico. O GH reduz drasticamente a lipogênese no tecido adiposo, resultando em perda significativa de gordura, com ganho de massa muscular concomitante. Tais efeitos são decorrentes de uma série de eventos biológicos que modulam a partição de nutrientes entre o tecido adiposo e o músculo esquelético (ETHERTON, 2001). Estes eventos incluem diminuição da sensibilidade do tecido adiposo à insulina, inibição da lipogênese, e, talvez, estímulo à lipólise. Embora a ST aumente a lipólise em suínos em crescimento, seu maior efeito é a diminuição da lipogênese (DUNSHEA, 1993). Os resultados relatados por Donkin et al. (1996) sugerem que a pST age diminuindo a atividade da proteína GLUT4 e/ou sua distribuição entre a membrana plasmática e o pool intracelular, com pouca alteração na expressão gênica ou proteica de GLUT4.

Apoiando esta informação, Lee et al. (2000) encontraram redução de 70 a 86% na taxa de oxidação de glicose e lactato e suas incorporações em lipídeos do tecido adiposo, 44% de redução na esterificação do palmitato e nenhuma alteração em sua oxidação, nos suínos tratados com somatotropina suína (pST). Além disso, os autores relataram que a eficiência alimentar melhorou 27% e a espessura de toucinho diminuiu 43%. Um resultado semelhante foi obtido por Dunshea et al. (1992), em que a incorporação de glicose basal em lipídeos, particularmente em ácidos graxos, foi marcadamente reduzida (mais de 90%) durante o tratamento com a pST.

Em sua pesquisa, Lee et al. (2000) relataram que a maioria das alterações metabólicas em resposta a pST ocorre dentro de uma semana de tratamento e regressa aos valores pré-tratamento após 7 dias de retirada do tratamento. Este prazo pode estar relacionado ao tempo requerido para a ST alterar a atividade de enzimas-chave da via lipogênica.

Estudos demonstraram redução na expressão de mRNA ou da atividade enzimática da FAS com o tratamento com ST (DONKIN et al., 1996; KRAMER et al., 1993; LEE et al., 2000; LOUVEAU; GONDRET, 2004). Resultados obtidos por Donkin et al. (1996) mostram níveis reduzidos de mRNA para FAS em até 85% pela pST. Além disso, a ME teve sua atividade reduzida em suínos submetidos ao tratamento com pST. Por fim, a pST diminuiu a porcentagem de lipídeos e aumentou a de proteínas e água nos depósitos de tecido adiposo intermuscular, subcutâneo e intrafascicular e alterou ligeiramente o perfil de ácidos graxos do tecido adiposo subcutâneo e intrafascicular do músculo longíssimo (KRAMER et al., 1993).

O mecanismo pelo qual o GH antagoniza a estimulação insulínica da lipogênese ainda precisa ser esclarecido, uma vez que não é mediado pela proteína quinase A, proteína quinase C ou Janus quinase-2 em nível de sinalização, ou em nível da SREBP-1 (LOUVEAU; GONDRET, 2004).

2.3.3.3.3 Regulação pelas catecolaminas e seus análogos sintéticos

Os hormônios adrenalina (epinefrina) e glucagon secretados em resposta a baixos teores de glicemia ativam a adenilato-ciclase na membrana plasmática dos adipócitos. A adenilato-ciclase transforma ATP em adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que, por sua vez, ativa a proteína quinase A. Um conjunto de enzimas pode ser ativado ou desativado pela fosforilação realizada pela proteína quinase A. Dentre as enzimas do metabolismo lipídico reguladas pela adrenalina, destacam-se a ACoAC e a HSL, sendo uma inativada e outra ativada, respectivamente (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009; NELSON; COX, 2014). Assim, foi demonstrado, no toucinho de suínos, *in vitro*, que a epinefrina aumentou a taxa lipolítica, avaliada pela liberação de glicerol e diminuiu a lipogênese na presença de teofilina, avaliada pelo fluxo de glicose (LIU; BOYER; MILLS, 1989; MERSMANN, 1989).

A mensuração da liberação do glicerol tecidual é considerada um importante marcador de lipólise, sendo utilizada rotineiramente para tal finalidade (CHEN; OSAKI; SHIMOTOYODOME, 2015; HAUSMAN et al., 1989; JOCKEN et al., 2008; LIU; BOYER; MILLS, 1989; MERSMANN, 1989). Estudos demonstraram a liberação do glicerol a partir do tecido adiposo (CHEN; OSAKI; SHIMOTOYODOME, 2015; LIU; BOYER; MILLS, 1989; MERSMANN, 1989) e músculo esquelético (JOCKEN et al., 2008), estimulada pela norepinefrina ou um agonista β -adrenérgico não-seletivo, a isoprenalina, respectivamente. Além disso, Maeda et al. (2004) demonstraram que a estimulação com adrenalina gera um

aumento paralelo da liberação de glicerol e dos níveis da AQP7 em adipócitos, um importante canal de glicerol no tecido adiposo.

2.4 Ractopamina

Compostos sintéticos análogos às catecolaminas, os agonistas β -adrenérgicos (β -AA), reduzem a deposição de gordura e favorecem a síntese de proteínas (CARR et al. 2009; COSTA-LIMA et al., 2015; DUNSHEA et al., 1993; GUNAWAN et al., 2007). Aparentemente, o efeito sobre o tecido adiposo ocorre por meio da redução da lipogênese e/ou aumento da lipólise (HAUSMAN et al., 1989; KIM et al., 2010; LIU; BOYER; MILLS, 1989; LIU et al., 2012; MILLS; LIU, 1990; PETERLA; SCANES, 1990). Concomitantemente, ocorre um aumento da massa muscular em decorrência do aumento da síntese proteica e/ou diminuição de sua degradação (ADEOLA; BALL; YOUNG, 1992; ANDERSON et al., 1990; BERGEN et al., 1989; GUNAWAN et al., 2007; SALEM et al., 2006).

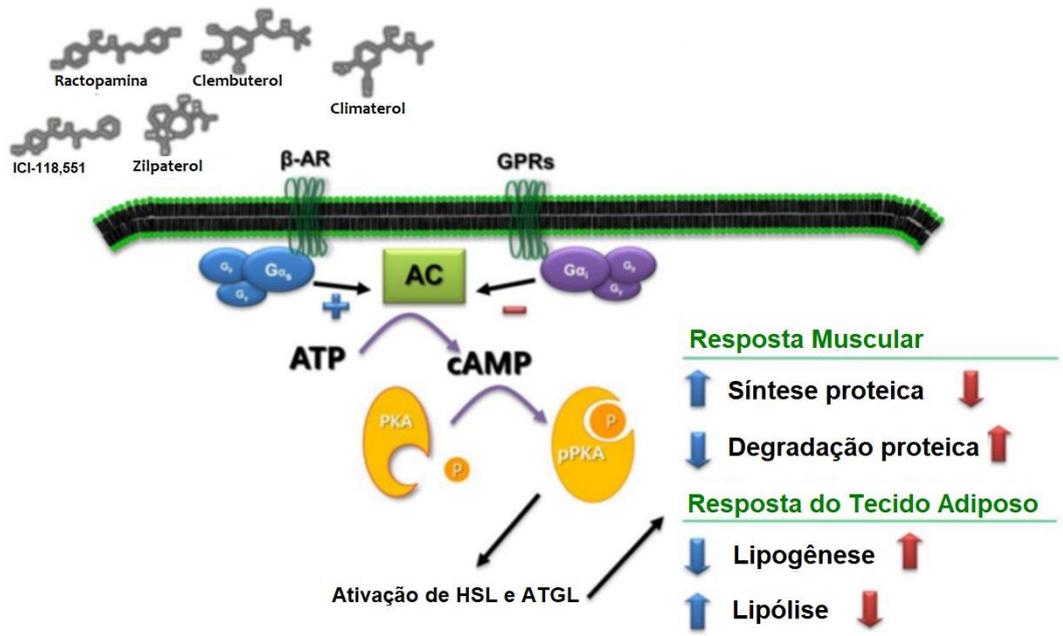
Dentre estes compostos, a ractopamina (RAC) é um fármaco com ampla utilização e comprovada eficiência como modificador do metabolismo animal (ANDRETTA et al., 2012; CARR et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SCHINCKEL et al., 2003; SEE; ARMSTRONG; WELDON, 2004).

2.4.1 Mecanismo de ação da ractopamina

A RAC se liga a receptores β -adrenérgicos (β -AR) na membrana celular, os quais são receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gs). Na forma desativada, a subunidade α da Gs encontra-se ligada ao dímero formado pelas subunidades $\beta\gamma$ e acoplada à guanosina difosfato (GDP). A RAC interage com a proteína G e desloca o GDP, dando lugar à ligação de guanosina trifosfato (GTP), o que configura o estado ativo dessa proteína. Assim, a subunidade α dissocia-se do dímero $\beta\gamma$ e o complexo α -GTP inicia cascatas de sinalização intracelular, estimulando a ação catalítica da adenilato ciclase. A adenilato-ciclase transforma ATP em AMPc, que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (FIGURA 10). Um conjunto de enzimas pode ser ativado ou desativado por meio da fosforilação realizada pela proteína quinase A (MERSMANN, 1998; NELSON; COX, 2007). Dentre as enzimas do metabolismo lipídico reguladas por β -AA, destacam-se a ACoAC e a HSL, sendo uma inativada e outra ativada, respectivamente (MERSMANN, 1998). Assim, como demonstra a Figura 11, a RAC desencadeia a cascata de sinalização de rotas metabólicas que reduzem a deposição de gordura e favorecem a síntese de

proteínas (CARR et al. 2009; COSTA-LIMA et al., 2015; DUNSHEA et al., 1993; GUNAWAN et al., 2007).

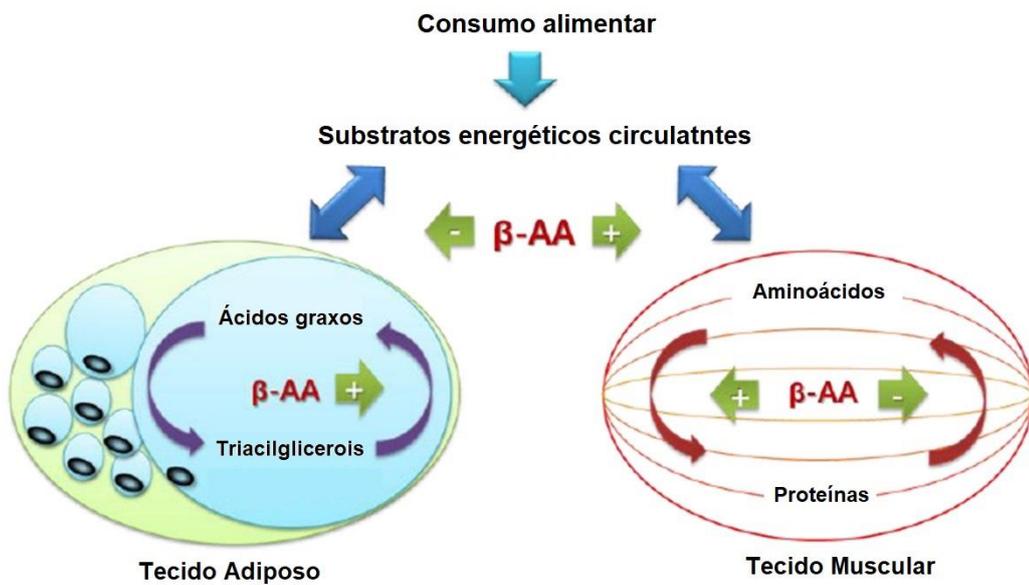
Figura 10: Mecanismo de ação da ractopamina.



Legenda: AC, adenilato ciclase; ATGL, lipase de triacilglicerol do adipócito; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; GPR, receptor acoplado a proteína G; HSL, lipase hormônio sensível; PKA, proteína quinase A.

Fonte: Johnson, Smith e Chung (2014).

Figura 11: Efeitos metabólicos da ractopamina no tecido adiposo e muscular.



Fonte: Johnson, Smith e Chung (2014).

A intensidade dos efeitos da RAC pode variar ao longo do período de sua utilização na dieta de suínos em terminação, iniciando-se rapidamente, seguida de estabilização e decréscimo posterior (ARMSTRONG et al., 2005). A exposição a longo prazo (crônica) a doses elevadas de β -AA leva à internalização ou perda dos receptores da superfície celular e diminuição da concentração de mRNA para os β -AR, processo conhecido como *down-regulation* (GUNAWAN et al., 2007; SPURLOCK et al., 1994). Essas mudanças parecem ser irreversíveis, pelo menos, a curto prazo (JOHNSON; SMITH; CHUNG, 2014).

2.4.2 Efeito da ractopamina sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de suínos em terminação

O desempenho e as características de carcaça de suínos suplementados com RAC têm sido extensivamente investigados ao longo de anos. Estudos comprovam o efeito positivo de tal aditivo sobre o ganho de peso, a eficiência alimentar e o rendimento de carcaça (FELDPAUSCH et al., 2016; GARBOSSA et al., 2013; GRAHAM et al., 2014; MENDOZA et al., 2017; PAULK et al., 2015a; PAULK et al., 2015b; PETERSON et al., 2015; PILCHER; ARENTSON; PATIENCE, 2015; POMPEU et al., 2017; PULS et al., 2014; PULS et al., 2015). Adicionalmente, o aumento na porcentagem de carne magra, na profundidade e área de olho de lombo em detrimento da deposição de gordura e da espessura de toucinho também são constantemente relatados (CANTARELLI et al., 2009; FELDPAUSCH et al., 2016; FERREIRA et al., 2011; MENDOZA et al., 2017; NEEDHAM; HOFFMAN, 2015a; PAULK et al., 2015a; PAULK et al., 2015b; POMPEU et al., 2017; PULS et al., 2015).

Características que afetam a qualidade da carne, como pH, cor, força de cisalhamento e marmoreio também foram avaliadas em carcaças de suínos suplementados com RAC (GARBOSSA et al., 2013; NEEDHAM; HOFFMAN, 2015b; PATIENCE et al., 2009; POMPEU et al., 2017; PULS et al., 2015). De forma geral, todos esses autores relatam que alterações em tais parâmetros, quando presentes, são mínimas e, na maioria das vezes, não notadas pelos consumidores.

Dentre os estudos sobre desempenho, características da carcaça e qualidade da carne de suínos em terminação suplementados com RAC, vale ressaltar uma recente meta-análise de 57 pesquisas publicadas de 2004 a 2016 (POMPEU et al., 2017). As variáveis dependentes analisadas incluíram peso vivo final, ganho de peso diário, consumo de ração diário, conversão alimentar, peso da carcaça quente, rendimento de carcaça, comprimento da carcaça, rendimento de massa magra, espessura de toucinho, área de olho de lombo, profundidade do lombo, pH

post mortem, brilho da carne e intensidade da cor vermelha e amarela. Os autores concluíram que a RAC melhorou a conversão alimentar, aumentou o peso final, o ganho de peso diário, o peso da carcaça quente, o rendimento de massa magra, a profundidade e a área de olho de lombo e que esses efeitos foram lineares, mesmo em concentrações mais altas de RAC (20 mg/kg). Adicionalmente, foi constatado que a suplementação com RAC foi mais efetiva nos animais com maior peso inicial, embora tenham sido observadas diferentes respostas de acordo com o sexo, sendo mais eficientes em machos do que fêmeas. Por fim, os autores ressaltam que o efeito sobre a qualidade da carne suína foi relativamente limitado.

2.4.3 Efeito da ractopamina sobre o metabolismo do tecido adiposo

In vitro, foi demonstrado que a RAC foi capaz tanto de inibir a lipogênese quanto de estimular a lipólise (LIU; BOYER; MILLS, 1989; MILLS; LIU, 1990; PETERLA; SCANES, 1990). Entretanto, mesmo reconhecendo seu valor científico para a demonstração de um evento biológico, tais resultados não devem ser extrapolados para um ser vivo de forma direta, pois as interações que ocorrem entre as diversas vias metabólicas são, de fato, complexas (FERREIRA et al., 2013).

Dados de estudos *in vivo* compilados em uma revisão sistemática mostram que a ação da RAC sobre a redução da deposição lipídica na carcaça de suínos é devida, principalmente, à maior inibição da lipogênese do que a uma maior estimulação da lipólise (FERREIRA et al., 2013). Por exemplo, Mills et al. (1990) relataram redução na atividade da ME e na sensibilidade à insulina em adipócitos de suínos alimentados com RAC, mostrando, assim, que a RAC é capaz de inibir a lipogênese.

A expressão de genes associados ao metabolismo lipídico anabólico (FAS, GLUT-4, SCD, SREBP-1, leptina) e ao metabolismo lipídico catabólico (carnitina palmitoil-transferase-1B e acil-CoA desidrogenase) no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado foi estudada em dois genótipos divergentes de suínos alimentados com RAC. No tecido adiposo dos animais que receberam RAC, os autores encontraram redução na concentração de mRNA relacionado às vias lipogênicas (FAS, SCD e SREBP-1), assim como para o GLUT-4. Como o GLUT-4 é o responsável pelo transporte de glicose para o interior dos adipócitos, a redução da expressão gênica deste transportador implica na menor captação da glicose circulante pela célula, contribuindo para a redução da deposição de gordura no tecido adiposo. No músculo esquelético, também foi observado uma diminuição nos teores de GLUT-4, enquanto que as expressões de carnitina palmitoil-transferase-1B e acil-CoA desidrogenase aumentaram com a

RAC. A expressão de acil-CoA desidrogenase hepática também foi maior com a RAC, entretanto, neste tecido, foi observada uma interação com o genótipo, sendo difícil atribuir um efeito direto da RAC (REITER et al., 2007).

Halsey et al. (2011) também avaliaram a expressão de SREBP-1, PPAR α , PPAR γ 2, FAS, GLUT4 e SCD (genes lipogênicos) no tecido adiposo de suínos suplementados com RAC (20 e 60 mg/kg). A expressão de SREBP-1 e PPAR γ 2 diminuiu com a RAC aos 28 e 42 dias, enquanto que a expressão de PPAR α aumentou nos dias 14, 28 e 42. Depois de 14 dias, a expressão de FAS e GLUT4 reduziu com 60 mg/kg de RAC, enquanto que ambas as concentrações de RAC atenuaram a expressão de FAS nos dias 28 e 42. No geral, a expressão de SCD no tecido adiposo não foi afetada pela RAC, embora tenha sido observada uma tendência à diminuição aos 28 dias com 60 mg/kg de RAC. Os autores concluíram que mesmo após 42 dias, a RAC ainda diminuiu a expressão de genes lipogênicos no tecido adiposo.

Por outro lado, Liu et al. (1994) não observaram efeitos sobre as atividades das enzimas ACoAC e ME e não encontraram alterações nas concentrações de mRNA para ACoAC, GLUT-1 e GLUT-4, no tecido adiposo de leitões mestiços alimentados com RAC. Em sua revisão sistemática, Ferreira et al. (2013) sugerem que este resultado pode estar relacionado, especificamente, à quantificação das enzimas, já que outros autores também avaliaram enzimas-chave no processo da lipogênese que foram negativamente afetadas pela RAC.

2.4.4 Efeito da ractopamina sobre o metabolismo do tecido muscular

De acordo com alguns autores, a RAC pode causar hipertrofia das fibras musculares em decorrência do aumento da síntese proteica e/ou diminuição de sua degradação (ADEOLA; BALL; YOUNG, 1992; ANDERSON et al., 1990; BERGEN et al., 1989; GUNAWAN et al., 2007; SALEM et al., 2006). Foi demonstrado que tanto o clenbuterol quanto a ractopamina aumentaram significativamente os transcritos de mRNA dos genes que codificam a cadeia pesada de miosina de contração rápida e a proteína citoesquelética, β -actina em truta arco-íris, sugerindo um papel anabólico dos β -AA nas proteínas miofibrilar e citoesquelética (SALEM et al., 2006). Em cultura de células musculares de ratos, a ractopamina aumentou a incorporação de metionina, aumentou a taxa aparente de síntese proteica das proteínas de 43 kDa e da cadeia pesada de miosina (ANDERSON et al., 1990). A taxa de síntese proteica também foi maior em suínos alimentados com ractopamina (6,1%/dia), comparados ao controle (4,4%/dia), explicando a hipertrofia muscular observada (BERGEN et al., 1989). Quando uma dieta contendo 170 g de proteína/kg foi suplementada com RAC, os suínos apresentaram maiores

teores proteicos e taxas fracionais de síntese de proteínas miofibrilares nos músculos longíssimo e bíceps femoral (ADEOLA; BALL; YOUNG, 1992). Ainda em suínos, Gunawan et al. (2007) mostraram que os genes que codificam as isoformas de cadeia pesada de miosina são regulados diferencialmente pela RAC e sugerem que o efeito de repartição induzido pelo β -AA é, em parte, mediado pela alteração da expressão gênica do tipo de fibra muscular, talvez através do receptor adrenérgico β_2 (β_2 -AR).

Há ainda a hipótese de que a RAC possa aumentar a atividade da calpastatina, enzima que inibe a atividade das calpaínas, as quais são responsáveis pela degradação de miofibrilas, o que culminaria em maiores massas musculares (JOHNSON; SMITH; CHUNG, 2014). De fato, Wheeler e Koohmaraie (1992) demonstraram um aumento da atividade da calpastatina em decorrência do uso de RAC dietética. Entretanto, em outras investigações, apesar dos autores terem observado um aumento na concentração de mRNA (SALEM et al., 2006) ou na atividade (STRYDOM et al., 2009) da calpastatina em resposta à RAC, a atividade enzimática da calpaína não foi alterada. Esses resultados indicam que, embora a via calpastatina/calpaína responda à administração de um β -AA, pode não ser a principal mediadora dos efeitos desses compostos no músculo.

Existem poucos estudos acerca da influência da RAC sobre o perfil de expressão do tecido muscular de suínos, especialmente das enzimas envolvidas no metabolismo energético. Assim, Costa-Lima et al. (2015) examinaram o proteoma sarcoplasmático do músculo *Longissimus thoracis* de suínos alimentados com RAC. Nove proteínas foram diferencialmente expressas entre os grupos RAC e controle. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e fosfoglicomutase-1 foram mais abundantes nos animais do grupo controle, enquanto que a albumina sérica, anidrase carbônica 3, L-lactato desidrogenase A, frutose-bifosfato-aldolase A e a cadeia leve da miosina foram mais expressas nos animais alimentados com RAC. Estes resultados sugerem que a RAC também influencia a abundância de enzimas envolvidas no metabolismo glicolítico.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A glicerina é um importante ingrediente alternativo na dieta de suínos devido ao seu alto valor energético e viabilidade econômica, contudo pesquisas indicam que o aproveitamento de altos níveis de glicerina dietética pode ser limitado metabolicamente. O desempenho, as características de carcaça e a qualidade da carne de suínos suplementados com RAC têm sido extensivamente investigados ao longo de anos, com resultados positivos comprovados em tais parâmetros. Entretanto, pouco se conhece sobre o metabolismo do glicerol em suínos alimentados com dietas contendo glicerina bruta mista e cloridrato de ractopamina. Tal compreensão contribuirá para a formulação de dietas mais balanceadas e adequadas nutricionalmente.

REFERÊNCIAS

- ADEOLA, O.; BALL, R. O.; YOUNG, L. G. Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine. **The Journal of nutrition**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 488-495, Mar. 1992.
- AMEER, F. et al. *De novo* lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, Philadelphia, v. 63, n. 7, p. 895-902, Jul. 2014.
- ANDERSON, P. T. et al. Ractopamine increases total and myofibrillar protein synthesis in cultured rat myotubes. **The Journal of nutrition**, Rockville, v. 120, n. 12, p. 1677-1683, Dec. 1990.
- ANDRETTA, I. et al. Meta-analysis of the relationship between ractopamine and dietary lysine levels on carcass characteristics in pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v.143, n.1. p. 91-96, Jan. 2012.
- ANP – **Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Microsoft%2BWord%2B-%2BResolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2Bn%25C2%25BA%2B387%2Bde%2B05%2Bde%2Bagosto%2Bde%2B1999.pdf/1240800a-0d4b-4cc9-8d9c-5211e9c3fb93>> . Acesso em: 15 jul. 2016.
- ARAÚJO, T. S. et al. Ractopamine effect on lipid metabolism and GLUT4 amount of finishing pigs. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 38, n. 1, p. 54-62, Jul. 2014.
- ARMSTRONG, T. A. et al. Effects of ractopamine step-up use programs on finishing pigs fed under commercial conditions. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 13, n. 2, p. 66-71, Mar./Apr. 2005.
- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. et al. *In vivo* effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. **Metabolism**, Philadelphia, v. 44, n. 2, p. 228–233, Feb. 1995.
- BABA, H.; ZHANG, X. J.; WOLFE, R. R. Glycerol gluconeogenesis in fasting humans. **Nutrition**, Tarrytown, v. 11, n. 2, p. 149–153, Mar./Apr. 1995.
- BEE, G. Dietary conjugated Linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition in weaned pigs. **Journal Nutrition**, Rockville, v. 130, n. 12, p. 2981-2989, Dec. 2000.
- BEE, G.; GEBERT, S.; MESSIKOMMER, R. Effect of dietary energy supply and fat source on the fatty acid pattern of adipose and lean tissues and lipogenesis in the pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1564–1574, Jun. 2002.

- BENÍTEZ, R. et al. Effects of dietary fat saturation on fatty acid composition and gene transcription in different tissues of Iberian pigs. **Meat Science**, Oxford, v. 102, p. 59–68, Apr. 2015.
- BENMANSOUR, N. M. et al. Effects of dietary fat and adipose tissue location on insulin action in young boar adipocytes. **The International Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 499–506, 1991.
- BERGEN, W. G. et al. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **Journal of animal science**, Champaign, v. 67, n. 9, p. 2255-2262, Sep. 1989.
- BERENCHTEIN, B. et al. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.7, p.1491-1496, Jul. 2010.
- BERNARDINO, V. M. P. et al. Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of glycerine. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 328-37, Apr. 2014.
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. 2. ed. Editora UFLA: Universidade Federal de Lavras. 2012. 373p.
- BORTZ, W. M. et al. Glycerol turnover and oxidation in man. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 51, n. 6, p. 1537–1546, Jun. 1972.
- BRAUGE, C.; CORRAZE, G.; MEDALE, F. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, New York, v. 111A, n. 1, 117– 124, May 1995.
- BUDD, T. J. et al. Effect of insulin and isoproterenol on lipid metabolism in porcine adipose tissue from different depots. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 137-143, Jul. 1994.
- CAI, D. et al. Gestational dietary betaine supplementation suppresses hepatic expression of lipogenic genes in neonatal piglets through epigenetic and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1861, n. 1, p. 41–50, Jan. 2016.
- CALAMITA, G. et al. Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol. **Biology of the Cell**, Chichester, v. 104, n. 6, p. 342–351, Jun. 2012.
- CANTARELLI, V. S. et al. Características da carcaça e viabilidade econômica do uso de cloridrato de ractopamina para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, May/Jun. 2009.
- CARBREY, J. M. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 5, p. 2945–2950, Mar. 2003.

CARR, S. N. et al. The effect of ractopamine hydrochloride (Paylean®) on lean carcass yields and pork quality characteristics of heavy pigs fed normal and amino acid fortified diets. **Meat Science**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 533-539, May 2009.

CARVALHO, P. L. O. et al. Crude glycerine in growing and finishing pigs feeding. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1399-1410, 2013.

CASARIN, A; FORAT, M.; ZABARAS-KRICK, B. J. Interrelationships between betaine (Betafin-BCR) and level of feed intake on the performance parameters and carcass characteristics of growing–finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75 (Suppl. 1), p. 75, 1997.

CASTELLANO, R. et al. A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 7, e0130514, Jul. 2015.

CATACUTAN, M. R; COLOSO, R. M. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 137–144, Mar. 1997.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 528 p.

CHAVES, V. E. et al. Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. **Journal of Nutritional**, Rockville, v. 136, n. 10, p. 2475–2480, Oct. 2006.

CHEN, S.; OSAKI, N.; SHIMOTOYODOME, A. Green tea catechins enhance norepinephrine-induced lipolysis via a protein kinase A-dependent pathway in adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, Orlando, v. 461, n. 1, p. 1-7, May 2015.

CONDE-AGUILERA, J. A.; BAREA, R.; LE FLOCH, N.; LEFAUCHEUR, L.; VAN MILGEN, J. A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 1349–1358, Aug. 2010.

CORL, B. A. et al. Conjugated Linoleic Acid Reduces Body Fat Accretion and Lipogenic Gene Expression in Neonatal Pigs Fed Low- or High-Fat Formulas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 138, n. 3, p. 449-54, Mar. 2008.

COSTA, D. V. da. et al. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed glycerol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 5, p. 347-354, May 2015 .

COSTA-LIMA, B. R. et al. Dietary ractopamine influences sarcoplasmic proteome profile of pork *Longissimus thoracis*. **Meat Science**, Oxford, v. 103, p. 7-12, May 2015.

CROMWELL, G. L. et al. Efficacy of betaine as a carcass modifier in finishing pigs fed normal and reduced energy diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, n. 77, Suppl. 1, p. 179, 1999.

- DASARI, M. A. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 79, n. 43, p. 1-3, Jan. 2007.
- DING, S. et al. Expression of porcine transcription factors and genes related to fatty acid metabolism in different tissues and genetic populations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 8, p. 2127–2134, Aug. 2000.
- DODSON, M. V. et al. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 6, n. 7, p. 691-699, Nov. 2010.
- DONKIN, S. S. Et al. Porcine somatotrophin differentially down-regulates expression of the GLUT4 and fatty acid synthase genes in pig adipose tissue. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 126, n. 10, p. 2568–2577. Oct. 1996.
- DUNSHEA, F. R. Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 7, p. 1966-1977, Jul. 1993.
- DUNSHEA, F. R. et al. Effect of porcine somatotropin on *In vivo* glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 141-151, Jan. 1992.
- DUNSHEA, F. R. et al. Interrelationships between sex and ractopamine on protein and lipid deposition in rapidly growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2919-2930, Nov. 1993.
- DUTTLINGER, A. J. et al. Effects of increasing crude glycerol and dried distillers grains with solubles on growth performance, carcass characteristics, and carcass fat quality of finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 840-852, Mar. 2012.
- ETHERTON, T. D. Porcine Growth Hormone: A Central Metabolic Hormone Involved in the Regulation of Adipose Tissue Growth. **Nutrition**, New York, v. 17, n. 10, v. 789 –792, Oct. 2001.
- ETHERTON, T. D.; DONKIN, S. S.; BAUMAN, D. E. Mechanisms by which porcine somatotropin (pST) decreases adipose tissue growth in growing pigs. In: SMITH, S.B.; SMITH, D.R.; CHAMPAIGN, I. L. (Eds.). **The Biology of Fat in Meat Animals**. American Society of Animal Science. 1995. p. 53-69.
- FELDPAUSCH, J. A. et al. Effects of dietary copper, zinc, and ractopamine hydrochloride on finishing pig growth performance, carcass characteristics, and antimicrobial susceptibility of enteric bacteria. **Journal of animal science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3278-3293, Aug. 2016.
- FENTON, J. P. et al. Effect of Swine Weaning Age on Body Fat and Lipogenic Activity in Liver and Adipose Tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 1, p. 190-199, Jan. 1985.
- FERREIRA, M. S. S. et al. Cloridrato de ractopamina em dietas para suínos em terminação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 25-32, out.-dez. 2011.

FERREIRA, M. S. S. et al. Effect of ractopamine on lipid metabolism *in vivo* – a systematic review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 1, p. 35-43, Jan./Feb. 2013.

FORETZ, M.; FOUFELLE, F.; FERRÉ, P. Polyunsaturated fatty acids inhibit fatty acid synthase and spot-14-protein gene expression in cultured rat hepatocytes by a peroxidative mechanism. **The Biochemical Journal**, London, v. 341, n. Pt2, p. 371–376, Jul. 1999.

GARBOSSA, C. A. P. et al. Ractopamine levels on performance, carcass characteristics and quality of pig meat. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 42, n. 5, p. 325-333, May 2013.

GOMIDE, A. P. C. et al. Substituição de milho por glicerina bruta em dietas para suínos em terminação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1309-1316, Oct. 2012.

GONCALVES, L. M. P. et al. Semi purified glycerins in growing and finishing pigs feeding (30-90 kg). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 15, n. 1, p. 221-236, Mar. 2014.

GONDRET, F. et al. Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 4865–4877, Nov. 2014.

GONDRET, F.; FERRÉ, P.; DUGAIL, I. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 42, n. 1, p. 106–113, Jan. 2001.

GONTIER, K. et al. Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 164, n. 3, p. 499–505, Mar. 2013.

GRAHAM, A. B. et al. The interactive effects of high-fat, high-fiber diets and ractopamine HCl on finishing pig growth performance, carcass characteristics, and carcass fat quality. **Journal of animal science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4585-4597, Oct. 2014.

GUNAWAN, A. M. Ractopamine induces differential gene expression in porcine skeletal muscles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2115-24, Sep. 2007.

HALSEY, C. H. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1011-1019, Apr. 2011.

HAMILL, R. M. et al. Transcriptome analysis of porcine M. semimembranosus divergent in intramuscular fat as a consequence of dietary protein restriction. **BMC Genomics**, v. 14, p. 453, Jul. 2013.

HANSEN, C. F. et al. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 49, n. 2, p. 154-161, Jan. 2009.

- HARA-CHIKUMA, M. et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7- deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 16, p. 15493–15496, Apr. 2005.
- HAUSMAN, D. B. et al. Effect of ractopamine on insulin sensitivity and response of isolated rat adipocytes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 1455-1464, Jun. 1989.
- HE, J. et al. A high-amylopectin diet caused hepatic steatosis associated with more lipogenic enzymes and increased serum insulin concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 10, p. 1470–1475, Nov. 2011.
- HIBUSE, T. et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 10993–10998. Aug. 2005.
- HIBUSE, T. et al. Aquaporins and glycerol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1758, n. 8, p. 1004–1011. Aug. 2006.
- HUANG, Q. C. et al. Changes in hormones, growth factor and lipid metabolism in finishing pigs fed betaine. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 105, n. 1-3, p. 78–85, Dec. 2006.
- HUANG, Q. C. et al. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 365-375, Jan. 2008.
- HUANG, W. Y.; KUMMEROW, F. A. Cholesterol and fatty acid synthesis in swine. **Lipids**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 34-41, Jan. 1976.
- JELLEN, S. et al. Aquaporin-9 protein is the primary route of hepatocyte glycerol uptake for glycerol gluconeogenesis in mice. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 52, p. 44319–44325, Dec. 2011.
- JOCKEN, J. W. E. et al. Hormone-sensitive lipase serine phosphorylation and glycerol exchange across skeletal muscle in lean and obese subjects: effect of β -adrenergic stimulation. **Diabetes**, Alexandria, v. 57, n. 7, p. 1834-1841, Jul. 2008.
- JOHNSON, B. J.; SMITH, S. B.; CHUNG, K. Y. Historical overview of the effect of β -adrenergic agonists on beef cattle production. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, Seoul, v. 27, n. 5, p. 757, May 2014.
- KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 106, n. 4, p. 473–481, Aug. 2000.
- KATSUMATA, M. Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. **Animal Science Journal**, Richmond, v. 82, n. 1, p. 17-25, Feb. 2011.
- KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO Reports**, London, v. 2, n. 4, p. 282-286, Apr. 2001.

- KIJORA, C. et al. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Archiv für Tierernährung**, Berlin, v. 47, n. 4, p.345-360, 1995.
- KIM, H. et al. Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 66, n. 3, p. 197-203, Sep. 2010.
- KISHIDA, K. et al. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 27, p. 20896–20902, Jul. 2000.
- KISHIDA, K. et al. Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 51, p. 48572–48579, Dec. 2001a.
- KISHIDA, K. et al. Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 39, p. 36251–36260. Sep. 2001b.
- KOVÁCS, P. et al. Apparent digestible and metabolizable energy content of glycerol in feed of growing pigs. **Livestock Science**, Wageningen, v. 142, n. 1, p. 229-234, Dec. 2011.
- KRAMER, S. A. et al. Fatty acid profiles, lipogenesis, and lipolysis in lipid depots in finishing pigs treated with recombinant porcine somatotropin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2066-2072, Aug. 1993.
- KURIYAMA, H. et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. **Diabetes**, Alexandria, v. 51, n. 10, p. 2915–2921, Oct. 2002.
- LANDAU, B. R. et al. Glycerol production and utilization in humans: sites and quantitation. *American Journal of Physiology*. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 271, n. 6 Pt 1, p. E1110–E1117, Dec. 1996.
- LANNA, D. P. D.; HAYASHI, A.; JOSÉ, A. A. F. B. V. Nutrientes, hormônios e genes: exemplos da regulação e oportunidades para alterar a síntese de gordura. In: 2ª CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2001, Concórdia. **Anais...** Concórdia, 2001.
- LEBECK, J. Metabolic impact of the glycerol channels AQP7 and AQP9 in adipose tissue and liver. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 52, n. 2, p. R165-R178, Mar. 2014.
- LEE, K. C. et al. Somatotropin and adipose tissue metabolism: Substrate and temporal effects. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1236–1246, May 2000.
- LI, X. et al. Molecular characterization, chromosomal and expression patterns of three aquaglyceroporins (AQP3, 7, 9) from pig. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 149, n. 3, p. 468–476, Dec. 2008.
- LIN, E. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, Jun. 1977.

LIU, C. Y. et al. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

LIU, C. Y.; BOYER, J. L.; MILLS, S. E. Acute effects of beta-adrenergic agonists on porcine adipocyte metabolism *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2930-2936, Nov. 1989.

LIU, Q. et al. Identifying lipid metabolism genes in pig liver after clenbuterol administration. **Frontiers in Bioscience**, Irvine, v. 4, p. 2605-2616, Jun. 2012.

LOPES, M. et al. Glicerina na alimentação de frangos de corte. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 34, p. 1-14, 2012.

LOPES, P. A. et al. Contrasting cellularity on fat deposition in the subcutaneous adipose tissue and longissimus lumborum muscle from lean and fat pigs under dietary protein reduction. **Animal**, v. 8, n. 4, p. 629–637, Apr. 2014.

LOUVEAU, I.; GONDRET, F. Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 27, n. 3, p. 241–255, Oct. 2004.

MADEIRA, M. S. et al. Combined effects of dietary arginine, leucine and protein levels on fatty acid composition and gene expression in the muscle and subcutaneous adipose tissue of crossbred pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1521–1535, May 2014.

MADEIRA, M. S. et al. Differential effects of reduced protein diets on fatty acid composition and gene expression in muscle and subcutaneous adipose tissue of Alentejana purebred and Large White × Landrace × Pietrain crossbred pigs. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 110, n. 2, p. 216-229, Jul. 2013.

MADRID, J. et al. Effect of crude glycerin on feed manufacturing, growth performance, plasma metabolites, and nutrient digestibility of growing-finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 91, n. 8, p. 3788-3795, Aug. 2013.

MAEDA, N. Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, p. 101, p. 51, p. 17801–17806, Dec. 2004.

MAEDA, N. Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 33, n. 5-6, p. 665–675, Oct.-Dec. 2012.

MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I. Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9. **Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism**, London, v. 4, n. 11, p. 627–634, Nov. 2008.

MAEDA, N.; HIBUSE, T.; FUNAHASHI, T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin, v. 190, p. 233–249, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa de N° 42**. 16 dez. 2010.

MARTIN, R. J.; HERBEIN, J. H. A comparison of the enzyme levels and the *in vitro* utilization of various substrates for lipogenesis in pair-fed lean and obese pigs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 151, n. 1, p. 231–235, Jan. 1976.

MELO, D. S. **Viabilidade da glicerina bruta na alimentação de suínos em terminação**. 2012. 107p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MENDOZA, O. F. et al. Metabolizable energy content of refined glycerin and its effects on growth performance and carcass and pork quality characteristics of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 3887-3895, Dec. 2010.

MENDOZA, S. M. et al. Effect of natural betaine and ractopamine HCl on whole-body and carcass growth in pigs housed under high ambient temperatures. **Journal of animal science**, Champaign, v. 95, n. 7, p. 3047-3056, Jul. 2017.

MENTEN, J. F. M.; ZAVARIZE, K. C.; SILVA, C. L. S. **Biodiesel: oportunidades do uso de glicerina na nutrição avícola**. In: IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal (CLANA). Estância de São Pedro, São Paulo, Brasil: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p. 43-56, 2010.

MERSMANN, H. J. et al. Effect of age, weaning and diet on swine adipose tissue and liver lipogenesis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, n. 1, p. 140-150, Jul. 1976.

MERSMANN, H. J. et al. Lipogenesis by *in vitro* liver and adipose tissue preparations from neonatal swine. **American Journal of Physiology**, v. 224, n. 1123-1129, May 1973.

MERSMANN, Harry J. Inhibition of porcine adipose tissue lipogenesis by β -adrenergic agonists. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 619-623, 1989.

MERSMANN, H. J. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of animal science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 160-172, Jan. 1998.

MILDNER, A. M.; CLARKE, S. D. Porcine fatty acid synthase: cloning of a complementary DNA, tissue distribution of its mRNA and suppression of expression by somatotropin and dietary protein. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 121, n. 6, p. 900–907, Jun. 1991.

MILLS, S. E. et al. Effects of ractopamine on adipose tissue metabolism and insulin binding in finishing hogs. Interaction with genotype and slaughter weight. **Domest Animal Endocrinology**, Stoneham, p. 7, n. 2, p. 251-264, Apr. 1990.

MILLS, S. E. Regulation of porcine adipocyte metabolism by insulin and adenosine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 12, p. 3201–3207, Dec. 1999.

- MILLS, S. E.; LIU, C. Y. Sensitivity of lipolysis and lipogenesis to dibutyryl-cAMP and β -adrenergic agonists in swine adipocytes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 4, p. 1017-1023, Apr. 1990.
- MORENO, F. N. Regulação hormonal da gliceroneogênese. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 161-173, jan./abr. 2012.
- 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**, Gilles, v. 38, n. 3, p.237-244, Apr. 1994.
- MOUROT, J.; KOUBA, M.; BONNEAU, M. Comparative study of *in vitro* lipogenesis in various adipose tissues in the growing meishan pig: Comparison with the large white pig (*Sus domesticus*), **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 115, n. 3, p. 383-388, Nov. 1996.
- MOUROT, J.; KOUBA, M.; PEINIAU, P. Comparative study of *in vitro* lipogenesis in various adipose tissues in the growing domestic pig (*Sus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 111, n. 3, p. 379–384, Jul. 1995.
- MUÑOZ, R. et al. Hepatic lipogenic enzyme expression in pigs is affected by selection for decreased backfat thickness at constant intramuscular fat content. **Meat Science**, Oxford, v. 93, n. 3, p. 746–751, Mar. 2013.
- NEEDHAM, T.; HOFFMAN, L. C. Carcass traits and cutting yields of entire and immunocastrated pigs fed increasing protein levels with and without ractopamine hydrochloride supplementation. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 9, p. 4545-4556, Sep. 2015a.
- NEEDHAM, T.; HOFFMAN, L. C. Physical meat quality and chemical composition of the Longissimus thoracis of entire and immunocastrated pigs fed varying dietary protein levels with and without ractopamine hydrochloride. **Meat science**, v. 110, p. 101-108, Dec. 2015b.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.
- NIELSEN, N.S. et al. Effect of structured lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, n. 1-2, p. 411-423, Nov. 2005.
- NURJHAN, N. et al. Insulin dose–response characteristics for suppression of glycerol release and conversion to glucose in humans. **Diabetes**, Alexandria, v. 35, n. 12, p. 1326–1331, Dec. 1986.
- O'HEA, E. K.; LEVEILLE, G. A. Lipid metabolism in isolated adipose tissue of the domestic pig (*Sus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 1081–1089, Sep. 1968.

O'HEA, E. K.; LEVEILLE, G. A. Significance of adipose tissues and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 99, n. 3, p. 338, Nov. 1969.

O'HEA, E. K.; LEVEILLE, G. A. Studies on the response of pig adipose tissue to insulin. **International Journal of Biochemistry**, Quebec, v. 1, n. 5, p. 605-611, Oct. 1970.

O'HEA, E. K.; LEVEILLE, G. A.; SUGAHARA, M. Lipogenesis and enzyme activity in pig adipose tissue as influenced by dietary protein and fat. **The International Journal of Biochemistry**, Oxford, v.1, n. 2, p. 173-178, Apr. 1970.

PATIENCE, J. F. et al. The effect of ractopamine supplementation at 5 ppm of swine finishing diets on growth performance, carcass composition and ultimate pork quality. **Canadian journal of animal science**, Ottawa, v. 89, n. 1, p. 53-66, 2009.

PAULK, C. B. et al. Effect of added zinc in diets with ractopamine hydrochloride on growth performance, carcass characteristics, and ileal mucosal inflammation mRNA expression of finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 185-196, Jan. 2015a.

PAULK, C. B. et al. Effects of diet mix time and ractopamine hydrochloride on finishing pig growth and carcass performance. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1689-1694, Apr. 2015b.

PETERLA, T. A.; SCANES, C. G. Effect of beta-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 4, p. 1024-1029, Apr. 1990.

PETERSON, C. M. et al. Effect of feeding ractopamine hydrochloride on growth performance and responses to handling and transport in heavy-weight pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1239-1249, Mar. 2015.

PILCHER, C. M.; ARENTSON, R.; PATIENCE, J. F. The interaction of fiber, supplied by distillers dried grains with solubles, with an antimicrobial and a nutrient partitioning agent on nitrogen balance, water utilization, and energy digestibility in finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1124-1132, Mar. 2015.

POMPEU, M. A. et al. A multivariate approach to determine the factors affecting response level of growth, carcass, and meat quality traits in finishing pigs fed ractopamine. **Journal of animal science**, Champaign, v. 95, n. 4, p. 1644-1659, Apr. 2017.

POPP, J. et al. Biofuels and their co-products as livestock feed: global economic and environmental implications. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 3, p. 285, Feb. 2016.

PULS, C. L. et al. Effects of ractopamine on growth performance and carcass characteristics of immunologically and physically castrated barrows and gilts. **Journal of animal science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4725-4732, Oct. 2014.

PULS, C. L. et al. Impact of ractopamine hydrochloride on growth performance, carcass and pork quality characteristics, and responses to handling and transport in finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1229-1238, Mar. 2015.

- REITER, S. S. et al. Lipid metabolism related gene-expression profiling in liver, skeletal muscle and adipose tissue in crossbred Duroc and Pietrain Pigs. **Comparative biochemistry and physiology Part D, Genomics & Proteomics**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 200-206, Sep. 2007.
- RESNYK, C. W. et al. RNA-Seq analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens highlights a divergence in expression of genes controlling adiposity, hemostasis, and lipid metabolism. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, e0139549, p. 1-41, Oct. 2015.
- ROJEK, A. M. et al. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 9, p. 3609–3614, Feb. 2007.
- SALEM, M. et al. Anabolic effects of feeding β 2-adrenergic agonists on rainbow trout muscle proteases and proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 144, n. 2, p. 145-154, Jun. 2006.
- SCHIECK, S. J. et al. Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 3927-3935, Dec. 2010.
- SCHINCKEL, A. P. et al. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1106-1119, May 2003.
- SEE, M. T.; ARMSTRONG, T. A.; WELDON, W. C. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 2474-2480, Aug. 2004.
- SOHARA, E. et al. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, Bethesda, v. 289, n. 6, F1195–1200, Dec. 2005.
- SOMER, J. B. et al. Focal differences in lipid metabolism of the young pig aorta. III. Influence of insulin on lipogenesis from [^{14}C] acetate. **Experimental and Molecular Pathology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 1-12, Feb. 1976.
- SOMER, J. B.; SCHWARTZ, C. J. Focal differences in lipid metabolism of the young pig aorta IV. Influence of insulin and epinephrine on lipogenesis from [^{14}C]-U-glucose. **Experimental and Molecular Pathology**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 129-141, Apr. 1976.
- SPURLOCK, M. E. et al. The effect of ractopamine on beta-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of animal science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 75-80, Jan. 1994.
- STRYDOM, P. E. et al. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 81, n. 3, p. 557-564, Mar. 2009.

- TAN, B. et al. Dietary L-arginine supplementation differentially regulates expression of lipid-metabolic genes in porcine adipose tissue and skeletal muscle. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 441–445, May 2011.
- TAN, B. et al. Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. **Frontiers in Bioscience**, Irvine, v. 17, p. 2237–2246, Jun. 2012.
- TAO, R. C. et al. Glycerol: its metabolism and use as an intravenous energy source. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Thousand Oaks, v. 7, n. 5, p. 479-488, Sep./Oct. 1983.
- VILLELA, C. C. E. J. et al. Effects of adding minimally refined cottonseed oil or crude glycerol to diets containing 40% corn distiller's dried grains with solubles on growth performance, carcass characteristics, and pork fat firmness of growing–finishing pigs. **Journal of animal science**, Champaign, v. 95, n. 7, p. 3057-3067, Jul. 2017.
- WALTON, P. E.; ETHELTON, T. D. Stimulation of lipogenesis by insulin in swine adipose tissue: antagonism by porcine growth hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, n. 6, p. 1584-1595, Jun. 1986.
- WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Effects of the beta-adrenergic agonist L644, 969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 3035-3043, Oct. 1992.
- XUE, L. L.; CHEN, H. H.; JIANG, J. G. Implications of glycerol metabolism for lipid production. **Progress in lipid research**, Yokohama, v. 68, p. 12-25, Oct. 2017.
- YANG, C. Effect of dietary amylose/amylopectin ratio on growth performance, carcass traits, and meat quality in finishing pigs. **Meat Science**, Oxford, v. 108, p. 55–60, Oct. 2015.
- ZHOU, X. et al. Methionine restriction on lipid metabolism and its possible mechanisms. **Amino Acids**, New York, v. 48, n. 7, p. 1533–1540, Jul. 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 1 – Metabolism of glycerol in pigs fed diets containing mixed crude glycerin and β -adrenergic agonist.**

A. B. F. Pinto^A, L. de P. Naves^{A,B}, I. G. Lima^A, C. A. P. Garbossa^C, S. R. Silva Júnior^D, A. M. S. Barbosa^D, C. L. Maluf^A, P. V. Rosa^D, M. G. Zangeronimo^A, V. de S. Cantarelli^D and R. V. Sousa^{1A,E}

**Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Animal Production Science*
(versão preliminar, encaminhada para submissão, sujeita a alterações)**

Summary text for the Table of Contents

The glycerin is an important alternative energy ingredient in the diet of pigs and the ractopamine is a feed additive which has been associated with improvements in animal performance and meat quality. The present study contributes to the advancement of the animal science, because it provides information about a subject still little explored that is the glycerol metabolism in pigs fed diets containing glycerin and ractopamine. Such understanding is necessary to contribute with the formulation of diets nutritionally more adequate.

Abstract. The optimized use of mixed crude glycerin (MCG) and ractopamine hydrochloride (RH) in diets for finishing pigs requires a better understanding of glycerol metabolism. Therefore, this study evaluated the performance, blood parameters, metabolite levels in the *Longissimus lumborum* muscle and the activity of enzymes in the liver, subcutaneous adipose tissue and kidney of pigs fed diets containing MCG and/or RH. According to the initial weight, 64 barrows were distributed in a 4 x 2 factorial design, corresponding to four concentrations of MCG (0, 100, 150, and 200 g/kg) in diets containing 0 or 10 mg/kg RH. There was no MCG x RH interaction for all the evaluated parameters. Moreover, there was no isolated effect of dietary MCG or RH on the weight gain and the blood concentrations of glucose, insulin, triacylglycerols, total cholesterol, total protein, albumin, creatinine, cortisol, and lactate. There was a higher rate of phosphorylation of glycerol in the liver, stimulation of lipogenesis in adipose tissue and a likely increase in the utilization of glycerol by muscle fibers in response to an increased concentration of circulating glycerol from the diet. On the other hand, when the diet contained up to 200 g/kg MCG and 10 mg/kg RH, there were indications of lower utilization of glycerol for the synthesis of triacylglycerols in muscle, liver and adipose tissue, besides increased oxidation of amino acids in the liver followed by improved feed conversion of pigs.

Additional keywords: animal metabolism, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, malic enzyme.

Introduction

Glycerin is a byproduct from biodiesel production which has attracted the attention of researchers and other professionals related to pig production due to its high energy value (Gomide *et al.* 2012; Carvalho *et al.* 2013) and growing market supply (USDA-FAS 2017). Although the purified glycerin usually has a higher energy value, it is more expensive when compared to crude glycerin (Bernardino *et al.* 2014). However, the concentration of crude glycerin included in the diet needs to be considered because it may influence the performance of pigs and the quality of meat (Orengo *et al.* 2014; Faria *et al.* 2015). In turn, the ractopamine hydrochloride (RH) is a beta-adrenergic agonist able to improve performance, carcass characteristics and meat quality in pigs (Puls *et al.* 2015; Mendoza *et al.* 2017). Nevertheless, although one of the RH effects is to reduce fat content in the pig carcass, it is still controversial whether its main action mechanism is based on inhibition of lipogenesis or stimulation of lipolysis (Araújo *et al.* 2014).

Although the metabolism of glycerol is complex, the advancement of this field of knowledge is necessary, because to maximize the dietary glycerin utilization it is important that the concentration of crude glycerin added in the diet does not exceed the capacity of the pigs to metabolize the glycerol. In addition, it is important know if the effects of the RH on metabolism in pigs are altered when the diet contains crude glycerin. Up to the present moment, no study has been found on the RH effects in the metabolism of finishing pigs fed diets containing increasing concentrations of mixed crude glycerin (MCG). Therefore, the present study was performed to evaluate the performance, blood parameters, metabolite levels in the muscle, and

the activity of enzymes in the liver, adipose tissue and kidney of pigs fed diets containing MCG and/or RH.

Materials and methods

All animal procedures used in the present study were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Lavras (Protocol Number 040/15).

Experimental design and diets

The experimental design was in randomized blocks (initial weight of pigs), arranged in a 4 x 2 factorial design with four MCG concentrations (0, 100, 150, and 200 g/kg) in diets containing 0 or 10 mg/kg of RH (Ractosuin[®], Ouro-Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil). The criterion used for the formation of blocks was the animal's initial weight. Each experimental diet was evaluated in eight replicates of one pig (experimental unit).

The MCG was derived from biodiesel production using soybean oil and animal fat (60% and 40%, respectively) as inputs. The chemical composition of MCG (Table 1) was considered during the formulation of the experimental diets (Table 2). Isonutritive and isocaloric diets were formulated to meet the nutritional requirements of pigs, according to the recommendations of Rostagno *et al.* (2011). The MCG was included in the diets as a substitute for maize, considering the metabolizable energy value of 14.55 MJ/kg (Melo *et al.* 2014).

Animals and experimental procedures

The experiment was performed with 64 barrows from the interbreeding of Agroceres PIC 337 boars and Camborough 25 sows, with initial average weight of 77.2 ± 6.0 kg. The pigs were housed individually in pens of concrete floor measuring 2.3 x 1.5 m. Each pen was equipped

with a semiautomatic feeder and a nipple drinker. The minimum temperature of the barn was 20.6 ± 1.1 °C and the maximum temperature was 27.7 ± 1.4 °C.

The experimental period lasted 28 days. The animals received water *ad libitum*. However, once glycerin can affect feed intake (Orengo *et al.* 2014), there was a daily supply of 3 kg of feed for each pig for the first 18 days of the experiment and 4 kg for the next 10 days. These values correspond to the average basal feed intake observed over the years by our research group for pigs under similar genetic, weight, age, and sex conditions. Such control in the feed supply was performed to ensure the MCG ingestion at increasing levels by the pigs. Feeding was performed twice a day. The occasional leftovers were weighed and considered in all the performed feeding. The daily feed intake (DFI) was measured throughout the experimental period. The daily MCG intake was estimated according to the amount of consumed feed and to the MCG concentration in the feed. The pigs were weighed at the beginning and at the end of the experimental period. The feed conversion was evaluated considering the ratio between DFI and daily weight gain.

Collection of blood samples and analyses

On the 27th experimental day, after 8-h fasting, blood was collected through jugular vein catheterization. A total of 18 mL blood was collected from each pig, being 9 mL collected in tube containing sodium fluoride and EDTA (BD Vacutainer, Juiz de Fora, MG, Brazil) and 9 mL collected in tube without anticoagulant (BD Vacutainer, Juiz de Fora, MG, Brazil). Blood samples were centrifuged at 2,000 x g for 15 min to collect the plasma or serum fraction. All the evaluated blood parameters were measured using the PowerWave™ XS Microplate Scaring Spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Potton, United Kingdom).

Plasma was used for the determination of glucose levels (catalog number 1770130, Laborlab, São Paulo, SP, Brazil), creatinine (catalog number 1770100, Laborlab, São Paulo,

SP, Brazil), lactate (catalog number 138, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil), and free glycerol (catalog number MAK117, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Serum was used for the determination of levels of insulin (catalog number RAB0327, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), triacylglycerols (catalog number 1770290, Laborlab, São Paulo, SP, Brazil), total cholesterol (catalog number 743051, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), total protein (catalog number 99, Labtest, Lagoa Santa Maria, MG, Brazil), albumin (catalog number 1770010, Laborlab, São Paulo, SP, Brazil), and cortisol (catalog number SE120037, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Collection of organs and tissues and analyses

At the end of the experimental period (28th day), after 8-h fasting, the pigs were stunned by electronarcosis and slaughtered by bleeding. Throughout the evisceration procedure, samples of muscle tissue (*Longissimus lumborum*), liver, adipose tissue (subcutaneous fat), and kidney were collected. Immediately after collection, the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the analyses were performed.

The concentrations of glycerol and carnitine were measured in muscle tissue. In the liver, the activities of glycerol kinase (GK, EC 2.7.1.30), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH, EC 1.1.1.8), glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2), malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) were determined. In the adipose tissue, the activities of ME and G6PDH were determined. The GK activity was also determined in the kidney. For all the evaluated enzymes, the quantities of proteins in the enzyme extracts were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard protein.

The concentrations of glycerol and carnitine in the muscle extract were determined using the protocols described in kits MAK117 and MAK063 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

Missouri, USA), respectively. The extraction of GK was performed with the methodology adapted from Bernardino *et al.* (2014). Thus, 100 mg liver or kidney tissue were macerated in porcelain grains maintained in an ice bath, in the presence of 1 mL of 25 mM Hepes-KOH buffer and pH 7.2. After complete homogenization, the extracts were centrifuged at 15,000 x g for 10 min at 4°C. The kinetic assay of GK activity in the supernatant was performed according to Kihara *et al.* (2009). The GK activity was expressed as moles of glycerol-3-phosphate formed/min.g protein (U/g protein). Liver extraction and the determination of GPDH activity were performed according to the protocol described in MAK208 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The GPDH activity was expressed in nmol of NADH formed/min.µg protein (U/µg protein). Liver extraction and the determination of GDH activity were performed according to the protocol described in MAK099 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The GDH activity was expressed in nmol of NADH formed/min.g protein (U/g protein).

For the ME, the liver extract was obtained according to Ribeiro *et al.* (2013). For ME in the subcutaneous adipose tissue, the enzyme extract was prepared according to the methodology described by Huang *et al.* (2008). For both types of extracts, the ME activity was determined according to Spina Junior *et al.* (1970) and expressed in µmol of NADPH formed/min.mg protein (U/mg protein). The preparation of the extract and determination of G6PDH activity in the liver were performed according to the protocol described in MAK015 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). For the G6PDH in adipose tissue, the enzyme extract was prepared according to Huang *et al.* (2008) and the activity was determined using the MAK015 kit. For both types of extracts, the G6PDH activity was expressed in nmol of NADPH formed/min.µg protein (U/µg protein).

Statistical analyses

The results of all the parameters were initially evaluated for normality by the Shapiro-Wilk test and the results that did not show normal distribution were transformed by the RANK procedure of SAS (version 9.2, 2009, Cary, NC, USA). The PROC RANK statement with the NORMAL option was used to produce the normalized transformed variables. All data were analyzed using the MIXED procedure of SAS appropriately for a randomized block design (initial weight) by applying a model with MCG (four levels) and RH (two levels) as an interaction. Once no interaction was verified, this effect was discarded from the model. Polynomial regression models ($P < 0.05$) were used to evaluate the effect of MCG concentration in the diet. The significance of the RH effect on the diet was evaluated by the F test at 5% probability.

Results

Performance

There was no MCG x RH interaction for all the evaluated performance parameters ($P > 0.05$). The increase in the dietary MCG concentration affected the DFI (Qua, $P = 0.032$; Table 3) and the daily MCG intake by the pigs (Lin, $P < 0.0001$). On the other hand, the addition of RH in the diet did not alter the DFI and the daily MCG intake ($P > 0.05$). There was no effect of MCG or RH on the final weight of pigs ($P > 0.05$). The addition of up to 200 g MCG/kg of feed did not affect the feed conversion ($P > 0.05$). Regardless of the dietary MCG concentration, the addition of RH (10 mg/kg) improved feed conversion by approximately 5% ($P = 0.039$).

Blood parameters

There was no MCG x RH interaction for all the evaluated blood parameters ($P > 0.05$). There was also no isolated effect of the dietary MCG or RH on the blood concentrations of glucose, insulin, triacylglycerols, total cholesterol, total protein, albumin, creatinine, cortisol, and lactate

($P > 0.05$; Table 4). The plasma glycerol level was not altered by the addition of RH in the diet ($P > 0.05$). On the other hand, the increased concentration of MCG in the diet affected (Qua, $P < 0.0001$) the level of circulating glycerol.

Metabolites and enzymatic activity in organs and tissues

There was no MCG x RH interaction for the concentration of glycerol and carnitine in the loin and the activity of evaluated enzymes ($P > 0.05$). The concentration of glycerol determined in the muscle extract was affected (Qua, $P < 0.0001$) by the concentration of MCG or addition of RH in the diet ($P < 0.0001$) (Table 5). There was no effect of dietary MCG or RH on the concentration of carnitine in the muscle extract ($P > 0.05$). The GK activity in the liver extract increased (Lin, $P = 0.0002$) according to the increase in dietary MCG concentration and reduced due to the addition of RH in the diet ($P < 0.05$). The GPDH activity in the liver extract was also reduced by the addition of RH in the diet ($P < 0.0001$), but it was not affected by the dietary MCG concentration ($P > 0.05$). The activity of liver GDH increased with the addition of RH in the diet ($P < 0.05$) without effect of the dietary MCG concentration ($P > 0.05$). The presence of MCG in the diet tended to increase liver ME activity ($P = 0.068$) without influencing G6PDH activity ($P > 0.05$). The addition of RH in the diet did not alter the activity of ME or G6PDH in the liver ($P > 0.05$). In the adipose tissue, the increased concentration of MCG in the diet increased (Lin, $P < 0.0001$) the ME activity without affecting G6PDH activity ($P > 0.05$). The addition of RH in the diet did not alter the ME activity in the adipose tissue ($P > 0.05$), however, the G6PDH activity was decreased ($P < 0.0001$). The GK activity in the kidneys was affected (Qua, $P < 0.0001$) by dietary MCG concentration; however, it was not influenced by RH ($P > 0.05$).

Discussion

Although daily feed supply was done in a controlled manner (3 kg for each pig for the first 18 days of the experiment and 4 kg for the next 10 days), the MCG concentration in the diet affected the DFI. There was an increase in DFI when the diet contained MCG at the concentration of up to approximately 100 g/kg, similar to that observed by Orengo *et al.* (2014). The DFI tended to be similar for dietary MCG concentrations from 100 to 150 g/kg, with reduction in DFI when 200 g MCG/kg were used. Despite the quadratic effect of dietary MCG concentration on DFI, there was a linear increase in glycerin intake by pigs due to the increased MCG concentration in the diet. The addition of up to 200 g MCG/kg of diet did not reduce pig weight gain and did not worsen feed conversion. Therefore, the MCG can be used as a partial substitute for maize as a strategy to reduce the cost of feed, especially in places with high supply of glycerin and in high cost periods of maize. The RH improved the feed conversion regardless of the dietary MCG concentration, representing an important result, because although the RH is recognized as a performance improver of finishing pigs (Puls *et al.* 2015, Mendoza *et al.* 2017), the occurrence of such beneficial effect in the presence of MCG in the diet was unknown.

With the exception of free glycerol, the concentration of all other compounds measured in blood was not altered by the concentration of MCG or addition of RH in the diet. The mean plasma glucose level (107.23 mg/dL) is in agreement with the reference value for pigs (85 to 150 mg/dL; Kaneko *et al.* 2008). The mean serum insulin concentration (2.94 μ IU/mL) was lower than the determined by Shelton *et al.* (2004), possibly due to differences in pig genetics, diet composition and fasting time prior to blood collection. However, insulin concentration was similar among all the pigs used in the present study. Orengo *et al.* (2014) also observed no effect of dietary glycerin on circulating insulin concentration. Furthermore, the serum levels of triacylglycerols, total cholesterol, total protein and albumin were also similar among all pigs, indicating maintenance of homeostasis, and were in agreement with the reference values for the

species (Klem *et al.* 2010; Perri *et al.* 2017). High plasma creatinine concentrations indicate kidney failure (Braun and Lefebvre, 2008). Therefore, the results indicate that the use of MCG and RH in the diets at the evaluated concentrations throughout the 28-day period did not alter the renal function of pigs, since the average value of creatinine determined in this study (1.41 mg/dL) is in the common range of variation for the species (1 to 2.7 mg/dL; Kaneko *et al.* 2008). In turn, cortisol is a steroid hormone released abundantly in the bloodstream in situations of physical or psychological stress (Athayde *et al.* 2013). The mean cortisol content determined in this study (103.93 ng/mL) was higher than the value reported by Athayde *et al.* (2013) for pigs fed with a diet containing RH (73.4 ng/mL) and lower than the levels reported by Shaw *et al.* (1995) for stressed pigs that developed PSE meat (166.3 ng/mL). In any case, regardless of the determined numerical value, it is important to emphasize that MCG and RH did not show a significant stressor effect for pigs, since blood cortisol concentrations were statistically similar among the evaluated treatments, including diets without MCG or RH. Lactate is also considered as an indicator of physical stress when there is anaerobic metabolic pathway in muscle cells (Athayde *et al.* 2013). The mean lactate content determined in the present study (39.66 mg/dL) was lower than the reported for pigs under physical stress (118.44 to 362.97 mg/dL) (Pérez *et al.* 2002; Athayde *et al.* 2013), indicating that whether there was any physical stress during blood collection in this study, it was minimal and similar among all pigs. Although RH did not affect the glycerol content in the blood, the increased MCG concentration in the diet raised the level of plasma glycerol, corroborating that there is intestinal absorption of glycerol and correlation between the glycerin concentration in the diet and the amount of circulating glycerol in monogastric animals (Hansen *et al.* 2009; Bernardino *et al.* 2014).

Taking into account the three diets containing MCG, the increase in MCG concentration raised the glycerol concentration in *Longissimus lumborum*, demonstrating a direct correlation between glycerol concentration in blood and in skeletal muscle of pigs. After intravenous

administration of glycerol in humans, Samra *et al.* (1996) and Rosdahl *et al.* (1998) concluded that glycerol is transported from the plasma to the interstitial fluid of skeletal muscle as a function of the existing concentration gradient. In addition, Inoue *et al.* (2009) proposed that the uptake of plasma glycerol by the muscle fiber occurs through the aquaglyceroporin 9, after demonstrating its expression in muscle tissue. The phosphorylation from glycerol to glycerol-3-phosphate by GK allows its utilization for lipid synthesis or energy generation according to the animal's energetic state at the given moment (Montell *et al.* 2002). In general, the sites of greatest expression and activity of GK are the liver and kidneys, being the GK activity considered low in skeletal muscle (Seltzer *et al.* 1989). However, Newsholme and Taylor (1969) determined the GK activity in the skeletal muscle of several invertebrates and vertebrates and observed that there is an increase in GK activity as a function of the greater availability of glycerol. Watford (2000) also stated that skeletal muscle of mammals may show considerable GK activity, and Montell *et al.* (2002) demonstrated this activity in cultured human muscle cells. Another way of using glycerol is through the direct acylation of glycerol by the action of the enzyme glycerol:acyl-CoA acyltransferase during the synthesis of triacylglycerols in skeletal muscle of pigs (Lee *et al.* 2001). In addition, the same authors reported that the direct acylation pathway was intensified when glycerol-3-phosphate formation was decreased or when the intracellular concentration of glycerol was increased. Therefore, increased muscle fiber uptake of glycerol from dietary MCG suggests that such cell may metabolize glycerol, although there is a need for further studies with pigs in order to elucidate such mechanisms (via GK activity and/or via direct acylation by glycerol:acyl-CoA acyltransferase). On the other hand, regardless of the MCG concentration in the diet, the use of RH reduced the concentration of muscle glycerol by 21.84%. Similarly, in a recent metabolomic study, the addition of the β -adrenergic agonist clenbuterol in the pig diet also reduced the glycerol concentration in muscle tissue (Li *et al.* 2016). Isoprenaline, a non-selective β -

adrenergic agonist, also stimulated the release of glycerol by skeletal muscle (Jocken *et al.* 2008). Moreover, the mRNA for aquaglyceroporin 7 was determined in skeletal muscles (Kishida *et al.* 2000; Wakayama *et al.* 2004; Skowronski *et al.* 2007), signaling to be an entry and/or exit pathway of glycerol (Skowronski *et al.* 2007). Therefore, the results of the present study demonstrate that when the diet is supplemented with RH there is a decrease at the glycerol concentration in the skeletal muscle, signaling a lesser use of glycerol by muscle fibers for the synthesis of triacylglycerols. On the other hand, it should also be considered that β -adrenergic agonists can make muscle protein turnover more positive (Adeola *et al.* 1992; Gunawan *et al.* 2007; Carr *et al.* 2009; Costa-Lima *et al.* 2015) by hypertrophy of muscle fibers and/or decreased of the myofibrillar proteins degradation (Adeola *et al.* 1992; Gunawan *et al.* 2007). According to Costa-Lima *et al.* (2015), the use of RH in the diet of pigs increased the expression of enzymes involved in energy metabolism (fructose-bisphosphate aldolase and lactate dehydrogenase). Thus, since protein synthesis is a highly anabolic process, RH may have provided greater oxidation of glycerol generating energy for the muscle fiber. Therefore, the concentration of glycerol determined in muscle was lower when the diet contained RH. As future prospects, further studies are necessary in order to verify how much the inhibition of lipogenesis and the protein synthesis contribute to the reduction of glycerol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed diets containing MCG and RH. For the concentration of L-carnitine in the *Longissimus* muscle, there was no effect of the concentration of MCG or the addition of RH in the diet, demonstrating that there was no change in the transport rate of long-chain fatty acids from the cytosol to the mitochondrial matrix, suggesting that there was no increase in the oxidation rate of long-chain fatty acids.

The GK activity in the liver extract increased linearly as a function of the increase of MCG in the diet. These results demonstrate a metabolic adjustment of the liver in response to increased plasma glycerol concentration and still indicate that there was no saturation of liver

GK activity even when the dietary MCG concentration was 200 g/kg. Similarly, studies with broiler chickens (Bernardino *et al.* 2014), fish (Costa *et al.* 2015) and young bulls (Ladeira *et al.* 2016) also showed a positive regulation of liver GK activity as a function of the increase of glycerin in the diet in order to allow a better utilization of the glycerol consumed by the animals. In piglets, the addition of up to 150 g crude glycerin per kg of diet increased liver transcription of the GK gene (Papadomichelakis *et al.* 2012). Already the addition of RH in the diet reduced the GK activity in the liver of pigs. It is important to consider that, regardless of the dietary concentration of MCG, circulating glycerol was mostly derived from the diet and blood glucose level was maintained within the reference values for the species (Kaneko *et al.* 2008), with no difference among the evaluated treatments. Thus, under such conditions, liver stimulation was not expected to increase the rate of glycerol oxidation to produce energy or intensify its use by the gluconeogenic route. Therefore, since glycerol-3-phosphate produced by GK is required for the synthesis of triacylglycerols (Montell *et al.* 2002) and RH can decrease lipogenesis (Ferreira *et al.* 2013), the reduction of liver GK activity by RH can explain, at least partially, one of the mechanisms by which RH inhibits lipogenesis in pigs.

The GPDH is an important enzyme for the metabolism of carbohydrates and lipids, since it catalyzes the reversible conversion between dihydroxyacetone phosphate and glycerol-3-phosphate. The reduction of GPDH activity has been related to the lower synthesis of triacylglycerols (Sato *et al.* 2014). Therefore, the results of the present study indicate that RH can decrease lipogenesis in the liver of pigs because it also reduces the GPDH activity, resulting in the lower supply of glycerol-3-phosphate from glucose to the synthesis of triacylglycerols. On the other hand, the use of MCG in the diet increased the GK activity without altering the GPDH activity, thus suggesting that the glycerol-3-phosphate used for the synthesis of triacylglycerols was predominantly produced by GK from dietary glycerol.

The GDH is a liver-abundant enzyme catalyzing the reversible oxidative deamination from L-glutamate to α -ketoglutarate using NAD^+ and/or NADP^+ as a coenzyme. L-leucine is one of the major activators of GDH (Li *et al.* 2012; Wang *et al.* 2018) and GDH activity needs to be increased when excess amino acids need to be oxidized. Thus, the leucine action as a GDH activator has been justified because leucine is an essential amino acid abundant in dietary proteins and therefore a good indicator of protein consumption (Li *et al.* 2012). In a recent study, it was shown that the addition of clenbuterol in the diet induced an increase of leucine in skeletal muscle and adipose tissue of pigs (Li *et al.* 2016). Therefore, in the present study, it is hypothesized that RH may have increased leucine concentration in extrahepatic tissues of pigs, reflecting the activation of GDH in the liver.

Although there was only a tendency to increase the ME activity in the liver when the diets contained MCG, the ME activity increased linearly in the adipose tissue as a response to the increase of the dietary MCG concentration. Therefore, in as much as blood glycerol concentration increased, the adipocytes increased the synthesis of NADPH from the catalytic action of ME, indicating that the increase of MCG in the diet stimulated the synthesis of triacylglycerol in adipose tissue. A justification for explaining the difference in ME regulation in liver and adipose tissue is because the main site of lipid synthesis in pigs is adipose tissue (Corominas *et al.* 2013). On the other hand, dietary glycerol was not able to influence the G6PDH activity in liver and adipose tissue. In general, the ME activity in adipose tissue was approximately 40 times greater than the ME activity in the liver. Similarly, the G6PDH activity in adipose tissue was almost three times greater than the G6PDH activity in the liver, supporting that lipogenesis in pigs is predominant in adipose tissue (Corominas *et al.* 2013). The addition of RH in the diet did not alter the production of NADPH by ME in liver and adipose tissues and by G6PDH in the liver. Liu *et al.* (1994) also observed no effect of RH on Acetyl-CoA carboxylase and ME activities in adipose tissue of piglets. However, RH reduced the G6PDH

activity in adipose tissue, indicating that the inhibition of lipogenesis by the addition of RH in the diet (Ferreira *et al.* 2013) may be related to the effect of RH in reducing G6PDH activity in the adipocyte.

Circulating glycerol is mainly metabolized by the liver and kidneys (Xue *et al.* 2017). In this context, the understanding on the metabolism of dietary glycerol includes the determination of GK activity in the kidneys, since after reabsorption of glycerol by the renal aquaglyceroporin 7, GK performs its phosphorylation to glycerol 3-phosphate, reducing its loss by urine (Sohara *et al.* 2009). In comparison to the diet without MCG, the addition of 100 g MCG per kg of diet increased the GK activity in kidneys by approximately 24.2%, indicating that there was a metabolic regulation to minimize the loss of glycerol by urine. However, when the addition of MCG in the diet ranged from 100 to 200 g/kg, the GK activity in the kidneys showed little variation (9.35 to 9.42 U/g protein, respectively). In a study with pigs, Oliveira *et al.* (2014) reported that the addition of crude glycerin in the diets at concentrations of 90 and 180 g/kg increased the glycerol excretion by urine. Therefore, in the present study, the addition of MCG in the diet at concentrations above 100 g/kg probably resulted in greater loss of glycerol by urine due to saturation of the catalytic capacity of GK in the kidneys.

Conclusions

This study reported that there is a higher rate of phosphorylation of glycerol in the liver, stimulation of lipogenesis in adipose tissue and a likely increase in the utilization of glycerol by muscle fibers in response to an increased concentration of circulating glycerol from the diet. However, when the diet contains up to 200 g/kg MCG and 10 mg/kg RH, there are indications of lower utilization of glycerol for the synthesis of triacylglycerols in muscle, liver and adipose tissue, besides increased oxidation of amino acids in the liver followed by improved feed conversion of pigs.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Petrobras Biocombustível S.A. (Montes Claros, MG, Brazil) for the supply of MCG and Ouro-Fino Saúde Animal for the supply of RH. To the Foundation for Supporting Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) (file no. CVZ - APQ-02766-14), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

References

- Adeola O, Ball RO, Young LG (1992) Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine. *The Journal of Nutrition* **122**, 488–495.
- Araújo TS, Porto LCJ, Mario EG, Pereira LJ, Ferreira MSS, Zangeronimo MG, Napimoga MH, Botion LM, Sousa RV (2014) Ractopamine effect on lipid metabolism and GLUT4 amount of finishing pigs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **38**, 54–62.
- Athayde NB, Dalla Costa OA, Roça RO, Guidoni AL, Ludtke CB, Oba E, Takahira RK, Lima GJMM (2013) Stress susceptibility in pigs supplemented with ractopamine. *Journal of Animal Science* **91**, 4180–4187.
- Bernardino VMP, Rodrigues PB, Naves L de P, Rosa PV, Zangeronimo MG, Gomide EM, Saldanha MM, Alvarenga RR (2014) Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of glycerine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **98**, 328–337.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Braun JP, Lefebvre HP (2008) Kidney function and damage. In ‘Clinical biochemistry of domestic animals’. (Eds. JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss), pp. 485–528. (Elsevier: London UK).
- Carr SN, Hamilton DN, Miller KD, Schroeder AL, Fernández-Dueñas D, Killefer J, Ellis M, McKeith FK (2009) The effect of ractopamine hydrochloride (Paylean[®]) on lean carcass yields and pork quality characteristics of heavy pigs fed normal and amino acid fortified diets. *Meat Science* **81**, 533–539.
- Carvalho PLO, Moreira I, Scapinello C, Piano LM, Gallego AG, Moresco G (2013) Crude glycerine in growing and finishing pigs feeding. *Semina: Ciências Agrárias* **34**, 1399–1410.
- Corominas J, Ramayo-Caldas Y, Puig-Oliveras A, Estellé J, Castelló A, Alves E, Pena RN, Ballester M, Folch JM (2013) Analysis of porcine adipose tissue transcriptome reveals differences in de novo fatty acid synthesis in pigs with divergent muscle fatty acid composition. *BMC Genomics* **14**, 843.
- Costa-Lima BR, Suman SP, Li S, Beach CM, Silva TJ, Silveira ET, Bohrer BM, Boler DD (2015) Dietary ractopamine influences sarcoplasmic proteome profile of pork *Longissimus thoracis*. *Meat Science* **103**, 7–12.
- Faria PB, Cantarelli VS, Fialho ET, Pinto AMBG, Faria JH, Rocha MFM, Guerreiro MC, Bressan MC (2015) Lipid profile and cholesterol of pork with the use of glycerin in feeding. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **67**, 535–546.

- Ferreira MSS, Garbossa CAP, Oberlender G, Pereira LJ, Zangeronimo MG, Sousa RV, Cantarelli VS (2013) Effect of ractopamine on lipid metabolism in vivo – a systematic review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **56**, 35–43.
- Gomide APC, Brustolini PC, Ferreira AS, Paulino PVR, Lima AL, Scottá BA, Rodrigues VV, Câmara LRA, Moita AMS, Oliveira Júnior GM, Ferreira RC, Formigoni AS (2012) Substitution of corn for crude glycerin in diets for finishing pigs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **64**, 1309–1316.
- Gunawan AM, Richert BT, Schinckel AP, Grant AL, Gerrard DE (2007) Ractopamine induces differential gene expression in porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* **85**, 2115–2124.
- Hansen CF, Hernandez A, Mullan BP, Moore K, Trezona-Murray M, King RH, Pluske JR (2009) A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Animal Production Science* **49**, 154–161.
- Huang QC, Xu ZR, Han XY, Li WF (2008) Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology* **140**, 365–375.
- Inoue M, Wakayama Y, Kojima H, Shibuya S, Jimi T, Hara H, Iijima S, Masaki H, Oniki H, Matsuzaki Y (2009) Aquaporin 9 expression and its localization in normal skeletal myofiber. *Journal of Molecular Histology* **40**, 165–170.
- Jocken JW, Roepstorff C, Goossens GH, van der Baan P, van Baak M, Saris WH, Kiens B, Blaak EE (2008) Hormone-sensitive lipase serine phosphorylation and glycerol exchange across skeletal muscle in lean and obese subjects: effect of β -adrenergic stimulation. *Diabetes* **57**, 1834–1841.

- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (2008) Appendix VII. In 'Clinical biochemistry of domestic animals'. (Eds. JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss), pp. 882–888. (Elsevier: London UK).
- Kihara F, Itoh K, Iwasaka M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T (2009) Glycerol kinase activity and glycerol kinase-3 gene are up-regulated by acclimation to 5°C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 763–769.
- Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y (2000) Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 20896–20902.
- Klem TB, Bleken E, Morberg H, Thoresen SI, Framstad T (2010) Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbreed grower pigs. *Veterinary Clinical Pathology* **39**, 221–226.
- Ladeira MM, Carvalho JRR, Chizzotti ML, Teixeira PD, Dias JCO, Gionbelli TR, Rodrigues AC, Oliveira DM (2016) Effect of increasing levels of glycerin on growth rate, carcass traits and liver gluconeogenesis in young bulls. *Animal Feed Science and Technology* **219**, 241–248.
- Lee DP, Deonarine AS, Kienetz M, Zhu Q, Skrzypczak M, Chan M, Choy PC (2001) A novel pathway for lipid biosynthesis: the direct acylation of glycerol. *Journal of Lipid Research* **42**, 1979–1986.
- Li G, Fu Y, Han X, Li X, Li C (2016) Metabolomic investigation of porcine muscle and fatty tissue after Clenbuterol treatment using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1456**, 242–248.

- Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ (2012) The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **519**, 69–80.
- Liu CY, Grant AL, Kim KH, Ji SQ, Hancock DL, Anderson DB, Mills SE (1994) Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. *Journal of Animal Science* **72**, 62–67.
- Melo DS, Faria PB, Cantarelli VS, Rocha MFM, Pinto AMBG, Ramos EM (2014) Meat quality of swine with the use of glycerine in feeding. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **66**, 583–592.
- Mendoza SM, Boyd RD, Zier-Rush CE, Ferket PR, Haydon KD, van Heugten E (2017) Effect of natural betaine and ractopamine HCl on whole-body and carcass growth in pigs housed under high ambient temperatures. *Journal of Animal Science* **95**, 3047–3056.
- Montell E, Lerín C, Newgard CB, Gómez-Foix AM (2002) Effects of modulation of glycerol kinase expression on lipid and carbohydrate metabolism in human muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2682–2686.
- Newsholme EA, Taylor K (1969) Glycerol kinase activities in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal* **112**, 465–474.
- Oliveira L, Madrid J, Ramis G, Martínez S, Orengo J, Villodre C, Valera L, López MJ, Palláres FL, Quereda JJ, Mendonça L, Hernández F (2014) Adding crude glycerin to nursery pig diet: Effect on nutrient digestibility, metabolic status, intestinal morphology and intestinal cytokine expression. *Livestock Science* **167**, 227–235.
- Orengo J, Villodre C, Madrid J, Martínez S, López MJ, Megías MD, Valera L, Hernández F (2014) Effect of dietary crude glycerin on growth performance, nutrient digestibility and hormone levels of Iberian crossbred pigs from 50 to 100 kg body weight. *Livestock Science* **165**, 95–99.

- Papadomichelakis G, Zoidis E, Mountzouris KC, Lippas T, Fegeros K (2012) Glycerine kinase gene expression, nutrient digestibility and gut microbiota composition in post-weaned pigs fed diets with increasing crude glycerine levels. *Animal Feed Science and Technology* **177**, 247–252.
- Pérez MP, Palacio J, Santolaria MP, Aceña MC, Chacón G, Gascón M, Calvo JH, Zaragoza P, Beltran JA, Garcia-Belenguer S (2002) Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs. *Meat Science* **61**, 425–433.
- Perri AM, O’Sullivan TL, Harding JC, Wood RD, Friendship RM (2017) Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. *The Canadian Veterinary Journal* **58**, 371.
- Puls CL, Trout WE, Ritter MJ, McKeith FK, Carr SN, Ellis M (2015) Impact of ractopamine hydrochloride on growth performance, carcass and pork quality characteristics and responses to handling and transport in finishing pigs. *Journal of Animal Science* **93**, 1229–1238.
- Ribeiro PAP, Costa LS, Pereira RT, Murgas LDS, Rosa PV (2013) Metabolic parameters of pacu fed different oil sources. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **48**, 1035–1042.
- Rosdahl H, Hamrin K, Ungerstedt U, Henriksson J (1998) Metabolite levels in human skeletal muscle and adipose tissue studied with microdialysis at low perfusion flow. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **274**, E936–E945.
- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, Ferreira AS, Barreto SLT, Euclides RF (2011) ‘Brazilian tables for poultry and swine: Composition of feedstuffs and nutritional requirements.’ (Federal University of Viçosa: Minas Gerais, Brazil).

- Samra JS, Ravell CL, Giles SL, Arner P, Frayn KN (1996) Interstitial glycerol concentration in human skeletal muscle and adipose tissue is close to the concentration in blood. *Clinical Science* **90**, 453–456.
- Sato T, Morita A, Mori N, Miura S (2014) The role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 in the progression of fatty liver after acute ethanol administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **444**, 525–30.
- Seltzer WK, Angelini C, Dhariwal G, Ringel SP, McCabe ER (1989) Muscle glycerol kinase in Duchenne dystrophy and glycerol kinase deficiency. *Muscle and Nerve* **12**, 307–313.
- Shaw FD, Trout GR, McPhee CP (1995) Plasma and muscle cortisol measurements as indicators of meat quality and stress in pigs. *Meat Science* **39**, 237–246.
- Shelton JL, Matthews JO, Southern LL, Higbie AD, Bidner TD, Fernandez JM, Pontif JE (2004) Effect of nonwaxy and waxy sorghum on growth, carcass traits, and glucose and insulin kinetics of growing-finishing barrows and gilts. *Journal of Animal Science* **82**, 1699–1706.
- Skowronski MT, Lebeck J, Rojek A, Praetorius J, Fuchtbauer EM, Frøkiær J, Nielsen S (2007) AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* **292**, F956–F965.
- Sohara E, Uchida S, Sasaki S (2009) Function of Aquaporin-7 in the Kidney and the Male Reproductive System. In ‘Aquaporins. Handbook of Experimental Pharmacology’. (ED Beitz E) pp. 219–231. (Springer: Heidelberg Germany).
- Spina Junior J, Bright HJ, Rosenbloom J (1970) Purification and properties of L-malic enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **9**, 3794–3801.

- United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service (USDA–FAS) (2017) EU-28 Biofuels Annual Report 2017. GAIN Report NL7015. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, DC.
- Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Jimi T, Shibuya S, Hara H, Oniki H (2004) Expression and localization of aquaporin 7 in normal skeletal myofiber. *Cell and Tissue Research* **316**, 123–129.
- Wang T, Yao W, He Q, Shao Y, Zheng R, Huang F (2018) L-leucine stimulates glutamate dehydrogenase activity and glutamate synthesis by regulating mTORC1/SIRT4 pathway in pig liver. *Animal Nutrition Journal* (Accepted Manuscript), doi: 10.1016/j.aninu.2017.12.002.
- Watford M (2000) Functional glycerol kinase activity and the possibility of a major role for glyceroneogenesis in mammalian skeletal muscle. *Nutrition Reviews* **58**, 145–148.
- Xue Lu-Lu, Chen Hao-Hong, Jiang Jian-Guo (2017). Implications of glycerol metabolism for lipid production. *Progress in Lipid Research* **68**, 12–25.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas

Table 1. Chemical composition of mixed crude glycerin¹ (as-fed basis)

Chemical composition	Analyzed composition ²
Nutritional characteristics (g/kg)	
Moisture and volatiles	132.9
Glycerol	803.0
Crude protein	0.35
Ashes	52.4
Sodium	19.7
Potassium	0.5
Methanol (g/kg)	12.0
pH	7.0

¹Mixed crude glycerin (MCG) from soybean oil and animal fat.

²Chemical analyses performed by the CBO Analysis Laboratory (Campinas, SP, Brazil).

Table 2. Ingredients and chemical composition of experimental diets (as-fed basis)

MCG, mixed crude glycerin; RH, ractopamine hydrochloride

	MCG (0 g/kg)		MCG (100 g/kg)		MCG (150 g/kg)		MCG (200 g/kg)	
	Without RH	With RH	Without RH	With RH	Without RH	With RH	Without RH	With RH
Ingredients (g/kg)								
Maize	763.0	763.0	654.5	654.5	599.0	599.0	541.5	541.5
Glycerin	0.0	0.0	100.0	100.0	150.0	150.0	200.0	200.0
Soybean meal	191.5	191.5	210.6	210.6	220.4	220.4	230.7	230.7
Soybean oil	14.0	14.0	9.1	9.1	7.0	7.0	5.6	5.6
Dicalcium phosphate	8.5	8.5	8.5	8.5	8.6	8.6	8.7	8.7
Limestone	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6
Sodium chloride	9.8	9.8	4.9	4.9	2.5	2.5	0.0	0.0
Mineral-vitamin supplement ¹	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
L-lysine HCl	2.5	2.5	2.2	2.2	2.0	2.0	1.8	1.8
DL-methionine	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
L-threonine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ractopamine hydrochloride 2% ²	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5

Kaolin (inert ingredient)	2.1	1.6	1.6	1.1	1.8	1.3	3.0	2.5
Calculated nutritional composition (g/kg)								
Glycerin	0.0	0.0	100.0	100.0	150.0	150.0	200.0	200.0
Glycerol ³	0.0	0.0	80.3	80.3	120.5	120.5	160.6	160.6
Ractopamine (mg/kg)	0	10	0	10	0	10	0	10
Crude Protein (N x 6.25)	150	150	150	150	150	150	150	150
Metabolizable energy (MJ/kg)	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8
Calcium	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Available phosphorus	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Sodium	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Methionine + cystine	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Lysine	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
Threonine	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6

¹Qualitec S. Acabamento® (Trouw Nutrition, São Paulo, Brazil). The supplement contained (per kg): 2500000 IU vitamin A; 250 mg vitamin B1; 5,000 mcg vitamin B12; 1200 mg vitamin B2; 400 mg vitamin B6; 300,000 IU vitamin D3; 4,000 IU vitamin E; 500 mg vitamin K3; 5 mg biotin; 32.5 g choline; 7,500 mg niacin; 3600 mg pantothenic acid; 100 mg cobalt; 22.5 g copper; 40 g iron; 100 mg iodine; 21 g manganese; 75 mg selenium; 40 g zinc; 113.1 g lysine; *Bacillus subtilis* 75 x 10⁹ CFU.

²Ractopamine hydrochloride (Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil).

³Estimated according to the glycerin level in the diet and the glycerol content determined in glycerin (803 g/kg; Table 1).

Table 3. Effects of dietary mixed crude glycerin (MCG) and ractopamine hydrochloride (RH) concentration on performance

Description	MCG (g/kg)				RH		SEM	<i>P</i> -value ²	
	0	100	150	200	Without RH	With RH ¹		MCG	RH
Daily feed intake (kg)	2.868	2.979	2.981	2.893	2.928	2.933	0.04	0.032 ³	0.732
Daily consumption of MCG (kg)	0.000	0.298	0.447	0.575	0.328	0.333	0.004	<0.0001 ⁴	0.122
Initial weight (kg)	77.0	76.9	76.9	76.9	77.2	76.7	2.79	0.999	0.299
Final weight (kg)	104.0	104.9	103.8	102.8	103.2	104.5	2.59	0.439	0.155
Feed conversion	2.90	2.90	3.04	3.05	3.04 ^a	2.90 ^b	0.09	0.239	0.039

Averages followed by different superscript letters on the row differ among themselves ($P < 0.05$).

¹RH was added in the feed at the concentration of 10 mg/kg.

² P -value was > 0.05 for the MCG x RH interaction.

³Quadratic effect of dietary MCG addition level on daily feed intake: $y = -0.000011x^2 + 0.002273x + 2.866518$ ($R^2 = 0.98$).

⁴Linear effect of MCG addition level in the diet on daily intake of MCG: $y = 0.002896x + 0.004200$ ($R^2 = 0.99$).

Table 4. Effects of dietary mixed crude glycerin (MCG) and ractopamine hydrochloride (RH) concentration on blood parameters

Description	MCG (g/kg)				RAC		SEM	<i>P</i> -value ²	
	0	100	150	200	Without RH	With RH ¹		MCG	RH
Glucose (mg/dL plasma)	106.76	107.55	107.42	107.19	107.21	107.25	0.76	0.893	0.966
Insulin (μIU/mL serum)	2.83	2.88	3.00	3.06	2.97	2.91	0.09	0.262	0.504
Triacylglycerols (mg/dL serum)	191.96	194.9	195.67	200.38	195.85	195.61	2.28	0.078	0.917
Total cholesterol (mg/dL serum)	121.42	122.83	132.73	128.76	127.23	125.63	6.61	0.573	0.648
Total protein (g/dL serum)	4.89	4.87	4.83	4.87	4.85	4.88	0.16	0.994	0.895
Albumin (g/dL serum)	3.44	3.45	3.42	3.40	3.44	3.42	0.02	0.234	0.250
Creatinine (mg/dL plasma)	1.55	1.54	1.20	1.34	1.33	1.48	0.15	0.399	0.418
Cortisol (ng/mL serum)	100.56	104.28	106.25	104.62	103.35	104.50	10.36	0.962	0.988
Lactate (mg/dL plasma)	39.67	39.48	39.81	39.68	39.92	39.40	0.41	0.842	0.218
Glycerol (mg/dL plasma)	0.15	0.19	0.68	2.74	1.13	0.75	0.14	<0.0001 ³	0.991

¹RH was added in the feed at the concentration of 10 mg/kg.

²*P*-value was > 0.05 for the MCG x RH interaction.

³Quadratic effect of dietary MCG addition level on plasma glycerol concentration: $y = 0.0001x^2 - 0.0163x + 0.1843$ ($R^2 = 0.97$).

Table 5. Effects of dietary mixed crude glycerin (MCG) and ractopamine hydrochloride (RH) concentration on compounds dosed in *Longissimus lumborum* and the enzymatic activity in liver, subcutaneous fat and kidney

GK, glycerol kinase; GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; ME, malic enzyme; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GDH, glutamate dehydrogenase

Description	MCG (g/kg)				RAC		SEM	P-value ²	
	0	100	150	200	Without RH	With RH ¹		MCG	RH
Muscle extract									
Glycerol (mg/dL)	2.60	1.51	2.53	4.61	3.16 ^a	2.47 ^b	0.15	<0.0001 ³	<0.0001
Carnitine (ng/ μ L)	13.92	13.36	13.07	12.75	13.76	12.79	0.66	0.609	0.129
Liver extract									
GK (U/g protein)	5.38	5.82	6.03	6.26	6.07 ^a	5.68 ^b	0.086	0.0002 ⁴	0.015
GPDH (U/ μ g protein)	0.031	0.026	0.027	0.027	0.031 ^a	0.025 ^b	0.031	0.219	<0.0001
GDH (U/g protein)	58.31	59.04	59.35	60.15	53.60 ^b	64.82 ^a	0.045	0.941	0.015
ME (U/mg protein)	0.021	0.025	0.024	0.024	0.024	0.023	0.0009	0.068	0.402
G6PDH (U/ μ g protein)	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.945	0.757
Adipose tissue extract									
ME (U/mg protein)	0.847	0.984	1.066	1.127	0.988	1.024	0.03	<0.0001 ⁵	0.277

G6PDH (U/μg protein)	0.035	0.036	0.034	0.035	0.038 ^a	0.033 ^b	0.027	0.734	<0.0001
Kidney extract									
GK (U/g protein)	7.53	9.35	9.37	9.42	8.94	8.89	0.11	<0.0001 ⁶	0.914

Averages followed by different superscript letters on the row differ among themselves (P < 0.05).

¹RH was added in the feed at the concentration of 10 mg/kg.

²P-value was > 0.05 for the MCG x RH interaction.

³Quadratic effect of the MCG addition level on the glycerol concentration in the muscle extract: $y = 0.0002x^2 - 0.0319x + 2.6005$ ($R^2 = 1.00$).

⁴Linear effect of the dietary MCG addition level on GK activity in the liver: $y = 0.0044x + 5.3779$ ($R^2 = 0.99$).

⁵Linear effect of dietary MCG addition level on ME activity in adipose tissue: $y = 0.0014x + 0.8463$ ($R^2 = 0.99$).

⁶Quadratic effect of the dietary MCG addition level on the GK activity in the kidney: $y = -0.00008x^2 + 0.02494x + 7.5415$ ($R^2 = 0.99$).