



DIEGO VICENTE DA COSTA

**PARTIÇÃO E DESTINO METABÓLICO DO ¹⁴C-
GLICEROL DIETÉTICO EM TECIDOS-ALVO
DE JUVENIS DE TILÁPIA**

LAVRAS – MG

2015

DIEGO VICENTE DA COSTA

**PARTIÇÃO E DESTINO METABÓLICO DO ¹⁴C-GLICEROL
DIETÉTICO EM TECIDOS-ALVO DE JUVENIS DE TILÁPIA**

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

Orientadora
Dra. Priscila Vieira e Rosa

**LAVRAS - MG
2015**

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

Costa, Diego Vicente da.

Partição e destino metabólico do ^{14}C -glicerol dietético em tecidos-alvo de juvenis de tilápia / Diego Vicente da Costa. –
Lavras : UFLA, 2015.

62 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. Alimentos alternativos. 2. Glicerol. 3. Nutrição. 4. Peixes. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

DIEGO VICENTE DA COSTA

**PARTIÇÃO E DESTINO METABÓLICO DO ¹⁴C-GLICEROL
DIETÉTICO EM TECIDOS-ALVO DE JUVENIS DE TILÁPIA**

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

APROVADA em 22 de junho de 2015.

Dr. Luciano José Pereira	UFLA
Dr ^a . Lígia Uribe Gonçalves	INPA
Dr. José Cleto da Silva Filho	UFLA
Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA

Prof. Dr^a. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS - MG

2015

"A espantosa realidade das cousas
É a minha descoberta de todos os dias.
Cada cousa é o que é,
E é difícil explicar a alguém quanto isso me alegra,
E quanto isso me basta."

"Poemas Inconjuntos" de Alberto Caeiro.
Fernando Pessoa, 1946.

RESUMO GERAL

A aquicultura nos últimos anos, em contraste à estagnação da produção de pescado de origem extrativista, vem se desenvolvendo cada vez mais e pode ser beneficiada com o corrente excesso de glicerol oriundo da produção do biodiesel no mercado. O glicerol, por sua vez, pode ser utilizado como uma fonte dietética de energia na nutrição dos peixes, em alternativa às fontes convencionalmente utilizadas. Assim, este estudo aborda no Capítulo 1 alguns aspectos relacionados à disponibilidade de glicerol no mercado, a utilização e o metabolismo do glicerol dietético em peixes, bem como as bases teóricas das técnicas experimentais utilizadas no Capítulo 2. Este último capítulo teve como objetivo avaliar qual o destino metabólico do glicerol da dieta e como os juvenis de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) utilizam este novo ingrediente. As dietas experimentais foram formuladas para conter 0% (G0), 5% (G5) e 15% (G15) de glicerol purificado e foram fornecidas por 40 dias até a saciedade aparente, três vezes ao dia. Para os ensaios de metabolismo, seis peixes de cada tratamento foram aleatoriamente escolhidos e foram fornecidos, por alimentação forçada, cinco peletes unitariamente marcados com alíquotas de radioatividade conhecidas de ^{14}C -glicerol ($[^{14}\text{C}(\text{U})$, 9.25MBq, Perkin Elmer, EUA). Foram avaliadas a digestibilidade do glicerol, catabolismo, retenção e partição do nutriente no músculo e no fígado dos peixes. Não houve diferenças entre os tratamentos para a absorção e evacuação do ^{14}C -glicerol. Os peixes do tratamento G5 apresentaram o maior percentual de retenção de ^{14}C -glicerol e o menor percentual de catabolismo, além de maior contagem de radioatividade no extrato não-lipídico e não-proteico. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as quantidades totais de ^{14}C -lipídeos e ^{14}C -proteína. O tratamento G0 apresentou o maior nível de ^{14}C -lipídeos no músculo, no entanto não foram encontradas diferenças no fígado dos peixes. O tratamento G15 apresentou o menor nível de ^{14}C -proteína no músculo, não havendo diferenças nas quantidades de ^{14}C -proteína hepática. O extrato não-lipídico e não-proteico apresentou a maior contagem de radioatividade no fígado dos peixes do tratamento G5, porém não foram encontradas diferenças entre os tratamentos no músculo peixes. Os juvenis de tilápia são capazes de metabolizar o glicerol dietético em lipídeos, proteína e carboidratos, no fígado e no músculo. O glicerol dietético pode ser uma fonte de energia eficaz para juvenis de tilápia, nos níveis de inclusão estudados.

Palavras-chave: Nutrição. Peixes. Radioisótopo. Via metabólica.

GENERAL ABSTRACT

Aquaculture, as opposed to stagnating extractive fish production, has greatly developed worldwide in recent years and may benefit from the current excess of glycerol in the biodiesel market. Glycerol may be used as an energy source in fish diet as alternative to the conventional sources used. This study discusses in Chapter 1 some aspects related to the availability of this nutrient in the market, the use and the metabolism of dietary glycerol in fish, as well as the theoretical basis of the experimental techniques used in Chapter 2. This last chapter aimed to evaluate how the inclusion of glycerol in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) could affect the juveniles metabolism and how the fish use this new ingredient. The experimental diets were formulated to contain 0% (G0), 5% (G5) and 15% (G15) of purified glycerol and were provided for 40 days to apparent satiation, 3 times a day. For the metabolism trials, six fish from each treatment were randomly chosen and force-fed with five pellets unitarily labeled with known radioactivity rates of ^{14}C -glycerol ($[^{14}\text{C}(\text{U})$, 9.25MBq, Perkin Elmer, USA). It was evaluated the nutrient digestibility, catabolism, retention and partition of the nutrient in the muscle and liver. There were no differences between treatments for ^{14}C -glycerol absorption and evacuation. The treatment G5 presented the highest percentage of ^{14}C -glycerol retention and the lowest percentage of catabolism. There was no difference for total ^{14}C -lipid and ^{14}C -protein. Compared to other treatments, treatment G5 presented the highest radioactivity counting in the non-lipid and non-protein extract. Treatment G0 presented the highest level of ^{14}C -lipid in muscle, however no differences were found in fish liver. Treatment G15 presented the lowest level of ^{14}C -protein in muscle, however no differences were found between treatments in fish liver. The non-lipid and non-protein fraction presented the highest radioactivity counting in the liver of fish from treatment G5, however there were no differences in fish muscle. Juveniles tilapia are able to metabolize the ^{14}C -retained glycerol into lipid, protein and carbohydrate, in both liver and muscle. Dietary glycerol may be an effective energy source for tilapia juveniles, according to the inclusion levels studied.

Keywords: Fish. Metabolic pathway. Nutrition. Radioisotope.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figure 1	Equipamento utilizado na técnica <i>hot chase</i>	24
----------	---	----

CAPÍTULO 2

Figure 1	Percentage of absorption and evacuation of different levels of dietary glycerol provided to juveniles tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	44
Figure 2	Percentage of catabolism and retention of different levels of dietary glycerol provided to juveniles tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	45
Figure 3	Percentage of total ¹⁴ C-glycerol derived metabolites of tilapia fed different levels of glycerol.....	45
Figure 4	Percentage of ¹⁴ C-lipid in muscle and liver of juveniles tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>) fed different levels of glycerol	46
Figure 5	Percentage of ¹⁴ C-protein in muscle and liver of juveniles tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>) fed different levels of glycerol	47
Figure 6	Percentage of ¹⁴ C-carbohydrate in muscle and liver of juveniles tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>) fed different levels of glycerol	48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1	Percentage composition of experimental diets	39
---------	--	----

APÊNDICES

Tabela 1	Análise de variância da absorção de glicerol	58
Tabela 2	Análise de variância da evacuação de glicerol	58
Tabela 3	Análise de variância da retenção de glicerol	58
Tabela 4	Análise de variância do catabolismo do glicerol	58
Tabela 5	Análise de variância da concentração de lipídeo hepático	59
Tabela 6	Análise de variância da concentração de lipídeo muscular	59
Tabela 7	Análise de variância da concentração de lipídeos totais	59
Tabela 8	Análise de variância da concentração de proteína hepática	59
Tabela 9	Análise de variância da concentração de proteína no músculo	60
Tabela 10	Análise de variância da concentração de proteína total.....	60
Tabela 11	Análise de variância da concentração de carboidrato hepático	60
Tabela 12	Análise de variância da concentração de carboidrato muscular	60
Tabela 13	Análise de variância da concentração de carboidratos totais	61

LISTA DE ABREVIACÕES

AQP	AQUAGLICEROPORINA
DHA	DIHIDROXICETONA
DHAP	DIHIDROXICETONA-FOSFATO
EB	ENERGIA BRUTA
G3P	GLICEROL-3-FOSFATO
G6PD	GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE
GK	GLICEROL QUIINASE
NADPH	NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO FOSFATO
PB	PROTEÍNA BRUTA
TAG	TRIACILGLICEROL

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução Geral	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Disponibilidade de glicerol no mercado	13
2.2	Metabolismo do glicerol	14
2.3	Glicerol na nutrição de peixes	16
2.4	Conceitualização e terminologia das técnicas experimentais	22
2.5	A técnica hot chase	24
2.6	Importância da tilápia	26
	REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2	Partition and metabolic fate of dietary glycerol in target tissues of juvenile tilapia	36
1	INTRODUCTION	37
2	MATERIALS AND METHODS	39
3	RESULTS AND DISCUSSION	48
4	CONCLUSION	53
	REFERENCES	54
	APÊNDICES	58

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

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

A aquicultura, cada vez mais, tem contribuído para o fornecimento mundial de alimentos de origem animal, apresentando índices consideráveis de crescimento em detrimento ao pescado de origem extrativista. Contudo, a aquicultura, ainda, depara-se com alguns obstáculos que dificultam sua expansão, como a dependência de alimentos pouco abundantes e que oneram a produção, já que a alimentação representa a maior parcela dos custos de produção do pescado em cativeiro.

Além dos principais insumos utilizados na alimentação animal geralmente serem *commodities* agrícolas, que possuem o preço regulado pela inconstante oferta e demanda global, são ainda comumente disputados no mercado para outros fins, tais como, alimentação humana e produção de biocombustíveis. Ademais, podem possuir padrão de qualidade variável e escassez de oferta, o que remete à dificuldade de manufatura e altos preços. Sendo assim, tornam-se necessárias pesquisas para avaliar a inclusão de alimentos alternativos aos convencionalmente utilizados na alimentação animal.

Uma potencial fonte alternativa de energia dietética provém da produção do biodiesel. A fim de minimizar a dependência de recursos energéticos extinguíveis, a produção mundial de biocombustíveis encontra-se em franco crescimento. O governo brasileiro, por sua vez, tornou obrigatória a adição de

5% de mistura de biodiesel ao óleo diesel. Contudo, a produção desse biocombustível gera considerável quantidade de glicerina ou glicerol bruto, representando, aproximadamente, 10% do total da produção. Isto tornou o glicerol um coproduto abundante no mercado, despertando interesse de estudá-lo como um ingrediente energético na nutrição de algumas criações animais, tais como bovinocultura, avicultura, suinocultura e piscicultura.

Apesar do glicerol ser geralmente considerado como seguro, quando utilizado em conformidade com as boas práticas de manufatura e de alimentação, ainda são poucos e inconclusivos os trabalhos a respeito de sua utilização em dietas para peixes. Isto remete à importância de se utilizar uma fonte purificada de glicerol, para conhecimento incipiente, a fim de compreender a influência do principal componente da glicerina e eliminar o efeito de suas impurezas, que, além de conter de 65 a 80% de glicerol, contém também ácidos graxos livres, sais, ésteres e álcool residual.

Assim, com o atual panorama mercadológico favorável tanto para o crescimento da aquicultura quanto para a disponibilidade de glicerol, faz-se necessário o levantamento de informações sobre como os peixes utilizam esse nutriente e quais seus possíveis destinos metabólicos, de acordo com os diferentes níveis de inclusão na dieta, em substituição às fontes de energia dietéticas convencionalmente utilizadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Disponibilidade de glicerol no mercado

A produção de biocombustíveis tem aumentado constantemente no mundo e visa fornecer uma fonte de combustível renovável que reduza a dependência do petróleo (DOZIER et al., 2008). Desde 1º de novembro de 2014, todo óleo diesel comercializado no Brasil deve conter obrigatoriamente 7% de biodiesel, de acordo com a Lei Nº 13.033, de 24 de setembro de 2014 (BRASIL, 2014). As políticas públicas de incentivo à produção de biodiesel tornaram o Brasil um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com produção anual em 2013, de 2,9 bilhões de litros. Até o presente momento, existem 58 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 20.853,51 m³/dia (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP, 2015).

De acordo com Swiatkiewicz et al. (2009), a cada 1000 kg de óleo utilizado na produção de biodiesel, são produzidos de 90 a 110 kg de glicerina, cerca de 10% do peso total de óleo utilizado na produção de biodiesel. Tal glicerina bruta possui valor muito baixo por causa das impurezas (THOMPSON & HE, 2006) como água, catalisador (alcalino ou ácido), álcool, ácidos graxos, ésteres, propanodióis, monoéteres, oligômeros e polímeros de glicerina (PINTO et al., 2005). A quantidade de impurezas na glicerina varia de acordo com o processo de fabricação. Os teores de glicerol podem variar de 46 a 89% (LAGE et al., 2010). Vale ressaltar que o termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, o 1,2,3-propanotriol (MORRISON, 1994). Desde 2010, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autorizou a utilização da glicerina na

alimentação animal, desde que esteja dentro dos padrões: glicerol mínimo de 800 g/ kg; umidade máxima de 120 g/ kg e metanol máximo de 150 mg /kg.

Com a demanda e a produção de biodiesel crescentes, a quantidade de glicerina gerada será considerável, e sua utilização se tornará um tema importante (THOMPSON & HE, 2006).

2.2 Metabolismo do glicerol

Ainda são escassos na literatura os trabalhos que dizem respeito ao metabolismo do glicerol em peixes, quais as rotas e destinos metabólicos desse nutriente, e os efeitos da suplementação dietética nas diferentes espécies e fases de vida dos peixes. Por isso, algumas informações, presentes neste estudo, a respeito do metabolismo do glicerol, foram baseadas em outras espécies de animais monogástricos.

O transporte de glicerol ocorre principalmente por difusão passiva nas células com baixas taxas de absorção. Embora seja provável que alguma difusão passiva ocorra em todos os tipos celulares, as altas taxas de absorção de glicerol estão associadas com a presença de mecanismos de transporte facilitado (CLOW; DRIEDZIC, 2012). Em ratos, o glicerol é absorvido via transportador dependente de Na^+ e transporte ativo secundário mediado por carreador no estômago e intestino delgado (KATO et al., 2004). Em *Osmerus mordax*, o glicerol é transportado via difusão passiva no coração e por transporte facilitado nos eritrócitos (CLOW; DRIEDZIC, 2012). Fujiyoshi et al. (2002) relataram a identificação de subgrupos de aquaporinas, denominadas aquagliceroporinas (AQP), as quais atuam como facilitadoras no transporte de água e glicerol sérico. A AQP 9 é uma proteína da membrana celular que atua como um canal permeável à água e, também, a pequenos solutos, como o glicerol, sendo

expressa em diversos tecidos de mamíferos (Gambardela et al., 2012) e recentemente identificada no fígado de peixes (Tingaud-Sequeira et al., 2010).

Após absorvido, o glicerol é fosforilado a glicerol-3-fosfato (G3P) pela enzima glicerol quinase. Segundo Robergs and Griffin (1998), o G3P é bioquimicamente a forma mais importante de glicerol, atuando como elo de distintas vias metabólicas, a citar, a via gliconeogênica para formação de glicose (MOUROT et al., 1994), ser esterificado a ácidos graxos para síntese de triacilgliceróis (NYE; HANSON; KALHAN, 2008), ser acilado a ácido fosfatídico pela acil-CoA sintetase (NELSON; COX, 2006), ser oxidado por meio da glicólise no ciclo do ácido cítrico (ROSEBROUGH et al., 1980) ou por meio da gliconeogênese na via da pentose fosfato (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009), ou ainda exercer função proteogênica, como demonstrado no presente estudo.

Em mamíferos, Lin (1977) relata que o fígado é responsável por três quartos do total da capacidade de metabolização de glicerol no organismo e que quando os níveis séricos são menores ou igual a 1 mM, o glicerol pode ser completamente utilizado. Todavia, em altos níveis de glicerol sérico, a utilização do glicerol não é total e está relacionada com sua concentração no sangue. Simon, Bergner e Schwabe (1996) encontraram em frangos nível de 0,65 mM de glicerol plasmático. A concentração aumentou para 4,36 mM com o fornecimento de 5% de glicerol na dieta e variou de 11 a 54 mM com a suplementação de 10% de glicerol na dieta. Simon, Schwabe e Bergner (1997) relataram que, em frangos recebendo 10% de glicerol na dieta, a concentração de glicerol no músculo do peito aumentou de 0,4 $\mu\text{mol/g}$ para 7,7 $\mu\text{mol/g}$, enquanto que no fígado aumentou de 18 $\mu\text{mol/g}$ para 40 $\mu\text{mol/g}$. Ditlecadet e Driedzic (2013) relataram que, em uma pequena população do peixe rainbow smelt *Osmerus mordax* no Canadá, as concentrações de glicerol sérico seguem um ciclo previsível que começa com um período de acumulação no final do outono

(<5 mM) até o meio de fevereiro (> 200 mM), consoante com a diminuição da temperatura da água. Alguns peixes osmerídeos são conhecidos por acumular níveis de glicerol tão elevados como 400 mM nos fluidos corporais, durante períodos de temperaturas próximas ou inferiores a 0°C (RAYMOND, 1992).

Em síntese, os fatores que irão definir quais vias metabólicas o glicerol irá seguir são a condição fisiológica em que o animal se encontra e a quantidade de glicerol disponível para o metabolismo. Vale ressaltar também que o metabolismo do glicerol é espécie-específico e órgão-específico. No entanto, ainda existe pouca informação sobre as vias metabólicas do glicerol e as implicações de sua suplementação na dieta de peixes.

2.3 Glicerol na nutrição de peixes

No Brasil, o uso da glicerina na alimentação animal é regulamentado pelo MAPA desde 2010, o qual estabelece os níveis de garantia de 800g de glicerol/kg de glicerina; máximo de 12% de umidade e máximo de 150 mg de metanol/kg.

A glicerina, entretanto, não apresenta padronização em sua composição, a qual varia de acordo com os insumos e processos químicos empregados na produção do biodiesel. A falta de padronização e a presença de resíduos, tais como metanol e sais de sódio ou potássio, dificultam a inclusão da glicerina como ingrediente energético na dieta animal, bem como a comparação dos dados obtidos nos estudos já conduzidos. O metanol é um resíduo potencialmente tóxicos pois é convertido em ácido fórmico no fígado. O excesso de metanol pode causar depressão do sistema nervoso, alteração motora e acidose metabólica, no entanto esse resíduo pode ser eliminado pelas altas temperaturas do processo de extrusão da ração. Os sais de sódio ou potássio, resíduos do processo de transesterificação da obtenção do biodiesel, são eletrólitos atuantes

no equilíbrio osmótico do organismo e em excesso podem afetar o desempenho produtivo dos peixes. Por isso, torna-se importante avaliar o glicerol purificado na alimentação dos peixes a fim de eliminar a influência dos resíduos presentes na glicerina e conhecer os efeitos do seu principal constituinte, o glicerol, no metabolismo. A partir de então, torna-se possível constituir uma base sólida de conhecimento que possibilite compreender os efeitos da glicerina na nutrição dos peixes e estabelecer níveis seguros para sua inclusão como uma fonte de energia dietética.

Atualmente, o crescimento da disponibilidade da glicerina no mercado, oriunda da produção de biodiesel, tornou-a novamente alvo de estudo dos pesquisadores, levando-os a avaliarem sua inclusão na dieta de diversas espécies animais. A glicerina, além de potencial fonte de energia na dieta animal, pode aumentar a durabilidade dos peletes, melhorar a eficiência do moinho e peletizadora, diminuindo assim o gasto energético desses maquinários no processamento das dietas. Nos animais não-ruminantes, já foi estudado como ingrediente energético em dietas para aves (BERNARDINO et al., 2014; LAMMERS et al., 2008; LIMA et al., 2012;); suínos (GOMIDE et al., 2012; GROESBECK; MCKINNEY; DEROUCHÉY, 2008); coelhos (RETORE et al., 2012) e cães (LIMA et al., 2014).

Em peixes, ainda são escassos e incipientes os trabalhos publicados utilizando o glicerol como fonte de energia dietética, sendo estudado em espécies como truta arco-íris *Salmo gairdneri* (MENTON; SLINGER; HILTON, 1986); tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (COSTA et al., 2015; GONÇALVES et al. 2015; MEURER et al., 2012; NEU et al., 2013); dourada *Sparus aurata* (SILVA et al., 2012b); bagre do canal *Ictalurus punctatus* (LI et al., 2010); pacu *Piaractus mesopotamicus* e jundiá *Rhamdia quelen* (BALEN et al., 2014).

O estudo do glicerol no metabolismo de peixes não é recente (LECH, 1970). O referido autor relata que a truta é capaz de metabolizar grande quantidade de glicerol *in vivo* e que o fígado dessa espécie é capaz de metabolizar glicerol em CO₂, glicogênio e lipídeos *in vitro*.

O glicerol dietético foi avaliado como fonte de energia para truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e constatou-se que a utilização de glicerol em níveis de até 12%, não afetou o crescimento dos peixes, a conversão alimentar e composição da carcaça. Foi relatado, ainda, que trutas alimentadas com dietas de 6 e 12% de glicerol apresentaram um aumento do nível de glicose no plasma, mas não houve diferença na concentração de glicogênio hepático. Os autores sugeriram que a truta arco-íris não utiliza de forma eficiente o glicerol como fonte de energia (MENTON; SLINGER; HILTON, 1986).

Em um estudo sobre a adição de glicerina como fonte de energia em dietas de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), Li et al. (2010) avaliaram cinco dietas experimentais, com os níveis de 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina bruta, em substituição ao milho. Os autores não encontraram diferenças significativas no consumo alimentar, ganho de peso, taxa de eficiência alimentar e níveis de lipídeos no sangue dos peixes alimentados com as dietas de 0, 5 e 10% de glicerina. Entretanto, os peixes alimentados com ração contendo 15 e 20% de glicerina bruta apresentaram redução no ganho de peso, na eficiência alimentar e no teor de lipídeos no fígado. No que diz respeito às análises teciduais, os autores não verificaram diferenças estatísticas no teor de proteína bruta do filé, porém observaram um decréscimo no teor de lipídeos e um aumento no teor da umidade, quando se aumentava o nível de glicerina na dieta. Os peixes alimentados com 5% de glicerina na dieta apresentaram maiores níveis de glicemia do que os peixes alimentados com a dieta controle. Quando se elevou os níveis de glicerol na dieta para 10, 15 e 20%, o nível de glicose no plasma, em geral, diminuiu. Foi concluído que o catfish pode utilizar cerca de 10% de

glicerina bruta na dieta sem que os peixes apresentem efeitos adversos sobre os parâmetros avaliados.

A digestibilidade aparente da energia do glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel, foi avaliada por Meurer et al. (2012) em dietas para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 25 peixes com peso médio inicial de $120 \pm 4,5$ g. Os autores relataram que o glicerol bruto apresenta coeficiente de digestibilidade aparente de 0,89 e 13,09 MJ kg⁻¹ de energia digestível, aproximadamente 3131 kcal de energia kg⁻¹, com base na matéria natural. Assim, os autores concluem que o glicerol bruto apresenta-se como uma potencial fonte de energia para tilápia.

A suplementação do glicerol como ferramenta dietética para modular o armazenamento de glicogênio muscular em dourada (*Sparus aurata*) foi estudada por Silva et al. (2012). Os autores relatam que o processo de decomposição da carne pode ser exacerbado pela depleção de energia, assim, a qualidade e a vida de prateleira de produtos oriundos de carne de peixe dependem do estado energético do músculo esquelético durante o abate. Neste estudo, testou-se o glicerol dietético como uma forma de reposição das reservas de glicogênio muscular de dourada. Os resultados mostram que a inclusão de 5% de glicerol bruto em dietas para dourada induz o aumento do glicogênio muscular, os níveis de ATP e firmeza do filé, sem efeitos deletérios em termos de crescimento do peixe, composição centesimal da carcaça, perfil de ácidos graxos, estado oxidativo e propriedades organolépticas (aroma e cor) do filé. Com a análise proteômica foi possível mostrar um baixo impacto da suplementação do glicerol bruto no metabolismo muscular, sendo a maioria das mudanças provavelmente reflexo do aumento da capacidade dos peixes alimentados com glicerol em lidar com estresse. Isto sugere que a inclusão do glicerol bruto em dietas de dourada *Sparus aurata*, particularmente na fase de terminação, parece ser uma estratégia viável para aumentar a deposição de

glicogênio muscular sem afetar negativamente o bem-estar e qualidade do pescado.

Foram estudados também os efeitos da inclusão de glicerol (25 g kg⁻¹, 50 g kg⁻¹, 75 g kg⁻¹ e 100 g kg⁻¹) na dieta de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Neu et al. (2013) relataram que os parâmetros de desempenho não diferiram entre os tratamentos aplicados. Com relação aos parâmetros bioquímicos, a lipoproteína HDL foi superior no grupo de peixes alimentados com 0,0 e 75 g kg⁻¹, não diferindo dos animais que foram alimentados com 50 g kg⁻¹ e 100 g kg⁻¹. Para a composição centesimal dos juvenis de tilápia, não foi verificada diferença significativa, com exceção dos lipídeos que tiveram os maiores valores nos peixes alimentados com 50 g kg⁻¹ de glicerol, e os menores valores nos peixes alimentados com 100 g kg⁻¹ do nutriente na dieta. Os autores concluíram que o glicerol pode ser adicionado na ração de tilápias do Nilo no nível de até 100 g.kg⁻¹, sem causar danos para o desempenho zootécnico, composição bioquímica e centesimal dos peixes.

Em outro estudo com para avaliar a influência de diferentes níveis inclusão de glicerol dietético (0, 5, 10 e 15%) sobre o metabolismo energético de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Costa et al. (2015) relataram que níveis de glicerol da dieta não influenciaram as variáveis de desempenho, a quantidade de proteína muscular, plasmática e hepática, bem como a quantidade de triacilgliceróis plasmáticos. Entretanto, o tratamento com 15% de glicerol na dieta resultou em maiores níveis de triacilgliceróis musculares e hepáticos. O tratamento com 0% de glicerol apresentou maior glicose hepática, comparado ao tratamento com 15%. Os tratamentos com 10 e 15% de glicerol apresentaram maiores atividades da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), comparados ao tratamento com 5% de glicerol, todavia não houve diferença significativa entre os tratamentos para as atividades das enzimas málica e glicerol quinase. A atividade da enzima glicerol quinase ajustou uma regressão

linear significativa de acordo com o aumento dos níveis de glicerol da dieta. Os autores concluíram que a tilápia do Nilo é hábil em metabolizar o glicerol dietético, sendo potencialmente lipogênico em níveis acima de 10% da dieta.

O efeito de dietas contendo 0, 4, 8, 12 and 16% de glicerina bruta sobre as variáveis de desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e composição da carcaça da tilápia-do-Nilo foi avaliado por Gonçalves et al. (2015). O consumo de ração e conversão alimentar aumentaram com o aumento dos níveis glicerina na dieta. O ganho de peso e eficiência de retenção proteica ajustaram uma curva de segundo grau. A composição centesimal da carcaça e os parâmetros hematológicos não foram afetados pelos tratamentos. Os autores ainda relataram que os níveis ótimos estimados de glicerina bruta dietética para ganho de peso e eficiência de retenção proteica foram de 5,9% e 4,3%, respectivamente. Concluiu-se que a glicerina pode ser considerada uma fonte de energia alternativa segura para a tilápia-do-Nilo.

A digestibilidade aparente da glicerina também foi avaliada em alguns estudos com tilápia (Neu et al., 2012; Meurer et al., 2012; Gonçalves et al., 2015). Neu et al., (2012) avaliaram o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de diferentes fontes de gliceras em tilápias-do-Nilo. As fontes testadas foram glicerol bruto vegetal (GBV) de soja, glicerol semipurificado misto (GSM) de aproximadamente 80% de gordura animal e 20% de óleo de soja e glicerol semipurificado vegetal (GSV). Os CDA da energia encontrados foram 58,29%; 81,15% e 46,67%, para GBV, GSM, GSV, respectivamente. Meurer et al. (2012) e Gonçalves et al. (2015) relataram que, em tilápias-do-Nilo, o CDA da energia da glicerina foi de 89% e 79,41%, respectivamente.

Em síntese, são encontrados na literatura poucos estudos sobre o glicerol na nutrição de peixes, sendo inconclusivas e, algumas vezes contraditórias, as inferências realizadas a respeito de sua utilização como fonte de energia, o que torna importante a realização de estudos que avaliem de maneira mais precisa a

capacidade de utilização do glicerol da dieta pelos peixes e os possíveis destinos metabólicos desse nutriente.

De maneira geral, os estudos até agora realizados com glicerol na dieta de peixes avaliaram os parâmetros de desempenho, digestibilidade, composição de carcaça, níveis de metabólitos circulantes e teciduais, propriedades organolépticas e atividades enzimáticas, sendo, com base nessas análises, preconizada a adição de até 10% de glicerol na dieta em substituição às fontes de energia dietéticas convencionais, tais como milho, sorgo e trigo.

Ainda não há um consenso entre os pesquisadores quanto ao destino metabólico do glicerol dietético, sendo aludido nos trabalhos até então publicados como um intermediário das vias lipogênica, glicolítica e gliconeogênica. As divergências nos dados encontrados na literatura, provavelmente, são advindas das diferenças entre as espécies estudadas, fases de vida do peixe e metodologia utilizada mensuração dos parâmetros. Sendo assim, faz-se necessário aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo do glicerol e como esse nutriente é utilizado pelos peixes, fazendo uso de técnicas mais precisas de avaliação em detrimento às inferências já realizadas.

2.4 Conceitualização e terminologia das técnicas experimentais

A utilização de moléculas marcadas isotopicamente, denominadas marcadores ou "*tracers*", na dieta de peixes, possibilita quantificar o consumo de alimento, a digestão, absorção e utilização dos nutrientes pelos peixes tanto na fase adulta como na fase larval.

Um marcador adequado é caracterizado por ser passível de rastreamento, ser quimicamente idêntico à molécula de interesse, ou "*tracee*", porém distinto em alguma característica peculiar que permita sua quantificação exata (WOLFE,

1992). Além disso, o metabolismo do peixe não pode ser hábil em distinguir o *tracer* do *tracee*.

Marcadores isotópicos possuem um ou mais átomos que ocorrem naturalmente na molécula de interesse - *tracee*, substituídos em uma posição específica por um isótopo de um átomo menos abundante. Ambas moléculas de marcadores estáveis, por exemplo contendo ^{13}C ou ^{15}N , ou radioativos, por exemplo, contendo ^{14}C , ^{35}S ou ^3H , são válidas. A única diferença entre o *tracer* e *tracee* é o número de nêutrons nos átomos isotópicos e, portanto, na sua massa molecular (WOLFE, 1992).

Marcadores radioativos podem ser perigosos para a saúde humana e animal, assim, sua utilização tem sido amplamente substituída por marcadores de isótopos estáveis em estudos relacionados ao metabolismo humano e animal nos últimos 30 anos. No entanto, a sensibilidade de detecção dos isótopos estáveis é menor, o que limita a sua utilização em estudos de larvas de peixes. Além disso, a utilização de isótopos estáveis tende a ser mais cara e demorada. Considerando-se as pequenas quantidades de radioatividade normalmente exigidas nos ensaios com marcadores radioativos e a questão da sensibilidade, a utilização de marcadores radioativos nos estudos com peixes é aceitável, desde que as devidas precauções sejam tomadas (CONCEIÇÃO; MORAIS; RØNNESTAD, 2007).

2.5 A técnica *hot chase*

A abordagem usualmente designada por *hot chase* é um método de balanço de massa que permite a análise de fluxo de nutrientes, a qual consiste em seguir e quantificar a distribuição de um radioisótopo (por exemplo, ^{14}C , ^{35}S , ^3H) em diferentes compartimentos.

Um compartimento pode ser uma estrutura anatômica ou órgão fisicamente distinto ou ainda um pool de componentes específicos desses compartimentos, que pode ser isolado e analisado por meio de análise química, por exemplo, aminoácidos livres ou ligados a proteínas.

No método *hot chase*, o nutriente marcado radioativamente é administrado na ração pela técnica de *force-feeding*, para garantir que todos os peletes marcados seguirão para o trato gastrointestinal dos peixes. A distribuição do radioisótopo é analisada em diferentes compartimentos (que permite avaliar a absorção ou retenção do radioisótopo), na água de incubação dos peixes (que permite avaliar a evacuação do nutriente) e em uma câmara metabólica (para avaliar a oxidação do nutriente). Deste modo, esse método possibilita estudos de digestibilidade, assim como estimativas de taxas de absorção intestinal, catabolismo e retenção de diferentes nutrientes. Vale ressaltar que o método *hot chase* possui alguns inconvenientes como por exemplo a limitação a estudos em volumes pequenos e confinados, por razões econômicas e sobretudo de segurança, no que tange à utilização de material radioativo.

No método mais simples, o conteúdo do radioisótopo é quantificado por cintilação líquida no peixe e na água, uma vez terminado o processo digestivo, isto é, quando o tubo digestivo se encontra vazio, permitindo, assim, calcular a sua absorção (RUST, 1995; RUST; HARDY; STICKNEY, 1993). Este modelo simples, baseado em apenas dois compartimentos e com um único ponto final de amostragem, pode adquirir diferentes graus de complexidade, ao incluir mais compartimentos e cinéticas de transferência entre compartimentos corporais ou ainda componentes específicos desses compartimentos, por exemplo, ácidos graxos livres, proteínas e carboidratos (ARAGÃO et al., 2004; CONCEIÇÃO; RØNNESTAD; TONHEIM, 2002; MORAIS et al., 2005a, 2005b, 2005c; ROJAS-GARCÍA; RØNNESTAD, 2003; RØNNESTAD et al., 2000, 2001a, 2001b; RØNNESTAD; PERÉZ DOMINGUEZ; TANAKA, 2000; TONHEIM et

al., 2004, 2005). Quando marcadores com ^{14}C são utilizados nos estudos, é importante incluir uma armadilha metabólica para capturar o $^{14}\text{CO}_2$ na câmara de incubação (Figura 1), caso contrário, a absorção de nutrientes será subestimada (RØNNESTAD et al., 2001b). A armadilha metabólica permite separar o ^{14}C oriundo do glicerol não absorvido (evacuado) do ^{14}C oriundo do glicerol catabolizado.

Após o *force-feeding*, os peixes são transferidos para as câmaras de incubação individuais que são seladas e um fluxo de ar suave (aproximadamente 2 ml/min) é introduzido no espaço de ar acima da água de incubação. O ar é então direcionado por meio de um capilar para uma armadilha (5 ml de KOH 0,5M) em que o CO_2 difundido para o espaço de ar durante a incubação é aprisionado por conversão à HCO_3^- .

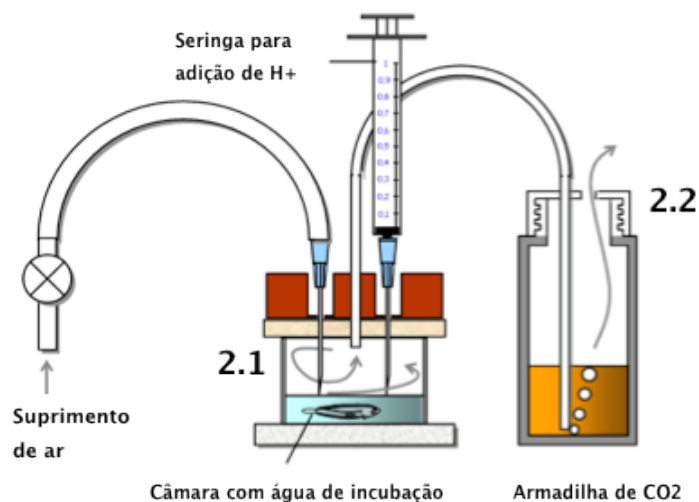


FIGURA 1. Equipamento utilizado na técnica *hot chase*. Adaptado de Ronnestad et al (2001b).

Uma vez terminado o período de incubação e o peixe removido, a câmara é novamente selada e é adicionado ácido (50 μl de HCl 1M) à água de incubação. O pH reduzido leva à rápida difusão do CO_2 remanescente na água e

o conduz para dentro da armadilha. Finalmente, tanto a água de incubação quanto o KOH da armadilha de CO₂ são transferidos para frascos de cintilação, onde é adicionado o coquetel de cintilação e as amostras são contadas com um contador de cintilação líquida, permitindo a mensuração da radioatividade oriunda do glicerol dietético nos diferentes compartimentos.

2.6 Importância da tilápia

A tilápia é um ciclídeo africano de água doce do gênero *Oreochromis*, com mais de 70 espécies conhecidas, sendo uma das mais importantes a espécie *Oreochromis niloticus* (EL-SAYED, 2006). As tilápias constituem o segundo grupo de peixes de maior importância em termos de produtividade na aquicultura mundial, atrás somente das carpas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2014).

O Brasil é o segundo maior produtor de peixe das Américas, correspondendo a 22,2% da produção dentro do continente, mas ocupa apenas o 11º lugar, com 1,1% da produção mundial (FAO, 2014). A tilápia é o segundo grupo de peixes mais produzido no mundo e o mais cultivado no Brasil. Estima-se que a produção brasileira no ano de 2013 foi de aproximadamente 170 mil toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS - IBGE, 2014). Destaca-se, ainda, que o Brasil é o sexto maior produtor de tilápias do mundo (FAO, 2014).

A tilápia possui características vantajosas para o cultivo, tais como: plasticidade, rusticidade, precocidade, facilidade de comercialização, facilidade de adaptação às condições adversas de cultivo, filé de alta qualidade, resistência ao estresse, às parasitoses e a presença de poluentes de natureza variada (EL-SAYED, 2006). Imediatamente após a absorção do saco vitelino, já aceita

alimentos artificiais. Para o crescimento ideal da tilápia-do-nylo, a temperatura adequada está entre 27 a 30 °C e pH próximo ao neutro (El-Sayed, 2006).

A tilápia apresenta algumas vantagens na alimentação por ser uma espécie de hábito alimentar onívoro, a qual possui adaptações morfológicas e fisiológicas que possibilitam utilizar os carboidratos da dieta de maneira eficiente (TENGJAROENKUL et al., 2000). Nas fases iniciais de cultivo, em que requer maior aporte nutricional, a tilápia tem exigência de 35,0% de proteína bruta e 4007 Kcal de energia digestível (FURUYA; HAYASHI; FURUYA, 2000).

A boa aceitação da tilápia à ampla variedade de alimentos tem levado aos nutricionistas o desafio de produzir dietas economicamente viáveis, substituindo nas formulações os ingredientes que oneram o custo da ração, por alimentos alternativos que também atendam às exigências de produção, sem afetar negativamente o desempenho produtivo e higidez dos animais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Boletim mensal do biodiesel**. Brasília, 2015.

Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/?pg=75971&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1434304232442>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

ARAGÃO, C. et al. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1/4, p. 293-304, Apr. 2004.

BALEN, R. E. et al. Digestible energy of crude glycerol for pacu and silver cat fish. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1448-1451, jan. 2014.

BERNARDINO, V. M. P. et al. Activity of glutamate dehydrogenase and protein content in the breast of broilers fed diets containing different sources and levels of glycerine. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, n. 3, p. 559-568, 2014.

BRASIL. **Lei nº 13.033**, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. Brasília, 2014. Disponível em:
<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm>. Acesso em: 11 jun. 2015.

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

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

CONCEIÇÃO, L. E. C.; MORAIS, S.; RØNNESTAD, I. Tracers in fish larvae nutrition: A review of methods and applications. **Aquaculture**, v. 267, n. 1-4, p. 62–75, Jul. 2007.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; RØNNESTAD, I.; TONHEIM, S. K. Metabolic budgets for lysine and glutamate in unfed herring (*Clupea harengus*) larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 206, n. 3/4, p. 305-312, Apr. 2002.

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

DITLECADET, D.; DRIEDZIC, W. R. Glycerol-3-phosphatase and not lipid recycling is the primary pathway in the accumulation of high concentrations of glycerol in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Baltimore, v. 304, n. 4, p. R304-R312, 2013.

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

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. Wallingford: CABI, 2006. 277 p.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2014. 223 p.

FUJIYOSHI, Y. et al. Structure and function of water channels. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 12, n. 4, p. 509-515, 2002.

FURUYA, W. M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V. R. B. Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 1912-1917, ago. 2000.

GAMBARDELLA, C. et al. Fasting and re-feeding impact on leptin and aquaglyceroporin 9 in the liver of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 354/355, p. 1-6, July 2012.

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, out. 2012.

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

GROESBECK, C. N.; MCKINNEY, L. J.; DEROCHE, J. M. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2228-2236, Sept. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Produção e consumo de pescado no Brasil**. Brasília, 2014. 60 p.

KATO, T. et al. Glycerol absorption by Na⁺-dependent carrier-mediated transport in the closed loop of the rat small intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 553-555, Mar. 2004.

LAGE, J. F. et al. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 9, p. 1012-1020, set. 2010.

LAMMERS, P. et al. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, Jan. 2008.

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

LI, H. M. et al. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, n. 1, p. 130-136, Feb. 2010.

LIMA, D. C. et al. Digestibilidade e energia metabolizável da glicerina em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1452-1456, 2014.

LIMA, E. M. C. et al. The energy value of biodiesel glycerine products fed to broilers at different ages. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 4, p. 896-903, Aug. 2012.

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

MENTON, D. J.; SLINGER, S. J.; HILTON, J. W. Utilization of free glycerol as a source of dietary energy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 56, n. 3/4, p. 215-227, 1986.

MEURER, F. et al. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1734-1737, 2012.

MORAIS, S. et al. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1/4, p. 347-357, May 2005a.

MORAIS, S. et al. Dietary protein: lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 6, p. 813-820, June 2005b.

MORAIS, S. et al. Digestion and absorption of a pure triacylglycerol and a free fatty acid by *Clupea harengus* L. larvae. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, n. 1, p. 223-238, July 2005c.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: **ENCYCLOPEDIA of chemical technology**. New York: Wiley, 1994. p. 921-932.

MOUROT, J. et al. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig: consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 237-244, Apr. 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NEU, D. H. et al. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 211-217, Apr. 2013.

NYE, C. K.; HANSON, R. W.; KALHAN, S. C. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 41, p. 27565-27574, 2008.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6, p. 1313-1330, 2005.

RAYMOND, J. A. Glycerol is a colligative antifreeze in some northern fishes. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 262, n. 3, p. 347-352, June 1992.

RETORE, M. et al. Nutritional evaluation of vegetable and mixed crude glycerin in the diet of growing rabbits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 41, n. 2, p. 333-34, 2012.

ROBERGS, R. A.; GRIFFIN, S. E. Glycerol: biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. **Sports Medicine**, Auckland, v. 26, n. 3, p. 145-167, Sept. 1998.

ROJAS-GARCÍA, C. R.; RØNNESTAD, I. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Marine Biology**, Berlin, v. 142, n. 4, p. 801-808, Apr. 2003.

RØNNESTAD, I. et al. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 130, n. 4, p. 461-466, 2001a.

RØNNESTAD, I. et al. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 11, p. 2809-281, Nov. 2000.

RØNNESTAD, I. et al. In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 1/2, p. 161-175, Sept. 2001b.

RØNNESTAD, I.; PERÉZ DOMINGUEZ, R.; TANAKA, M. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 225-235, Apr. 2000.

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

RUST, M. B. **Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae**. 1995. 150 p. Thesis (Ph.D. in Fisheries) - University of Washington, Washington, 1995.

RUST, M. B.; HARDY, R. W.; STICKNEY, R. R. A new method for force-feeding larval fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 341-352, Oct. 1993.

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

SIMON, A.; BERGNER, H.; SCHWABE, M. Glycerol as a feed ingredient for broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 103-112, 1996.

SIMON, A.; SCHWABE, M.; BERGNER, H. Glycerol supplementation in broiler rations with low crude protein content. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 50, n. 3, p. 271-282, 1997.

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

TENGJAROENKUL, B. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 3/4, p. 317-327, Feb. 2000.

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

TINGAUD-SEQUEIRA, A. et al. The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 38-56, Jan. 2010.

TONHEIM, S. K. et al. In vivo incorporation of [U]-¹⁴C-amino acids: an alternative protein labeling procedure for use in examining larval digestive physiology. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 235, n. 1/4, p. 553-567, June 2004.

TONHEIM, S. K. et al. Pre-hydrolysis improves utilization of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 321, n. 1, p. 19-34, July 2005.

WOLFE, R. R. **Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine:** principles and practice of kinetic analysis. New York: Wiley-Liss, 1992. 474 p.

CAPÍTULO 2 Partition and metabolic fate of dietary glycerol in target tissues of juvenile tilapia

ABSTRACT

Aquaculture may benefit from the current excess of glycerol in the biodiesel market including it as an energy source in aquafeeds. Thus, this study aimed to evaluate how the inclusion of glycerol in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) could affect the juveniles metabolism and how the fish use this new ingredient. The experimental diets were formulated to contain 0% (G0), 5% (G5) and 15% (G15) of purified glycerol and were provided for 40 days to apparent satiation, 3 times a day. For the metabolism trials, six fish from each treatment were randomly chosen and force-fed with five pellets unitarily labeled with ^{14}C -glycerol ($[^{14}\text{C}(\text{U})$, 9.25MBq, Perkin Elmer, USA) in order to evaluate the glycerol digestibility, catabolism, retention and partition in the muscle and liver. There were no differences for ^{14}C -glycerol absorption and evacuation. G5 presented the highest percentage of ^{14}C -glycerol retention and the lowest percentage of catabolism. There was no difference for total ^{14}C -lipid and ^{14}C -protein. Compared to other treatments, G5 presented the highest radioactivity counting in the non-lipid and non-protein extract. G0 presented the highest level of ^{14}C -lipid in muscle, however no differences were found in fish liver. G15 presented the lowest level of ^{14}C -protein in muscle, however no differences were found in the amount of ^{14}C -protein in fish liver. The non-lipid and non-protein fraction presented the highest radioactivity counting in the liver of fish from G5, however there were no differences in fish muscle. Juveniles tilapia are able to metabolize the ^{14}C -retained glycerol into lipid, protein and carbohydrate, in both liver and muscle. Dietary glycerol may be an effective energy source for tilapia juveniles

Keywords: Fish. Metabolic pathway. Nutrition. Radioisotope.

1 INTRODUCTION

The inclusion of new ingredients in fish nutrition aims to replace scarce or expensive feeds with no adverse effect on fish growth and healthiness. The main ingredients traditionally used in fish feeding are commonly agricultural commodities, which have the price set by the inconstant global supply and demand. They may also be played in market for other purposes, such as human feeding, oil production and biofuel, which generate ingredients with shortage of supply and high prices. Thus, studies to identify alternative ingredient sources become necessary to minimize the dependence on the scarce or expensive feedstuff available.

Glycerol is a simple polyol compound, colorless, odorless, sweet-tasting and generally considered as safe for consumption when used in accordance with good manufacturing or feeding practice (CFR, 2013). This nutrient is the main co-product and represents approximately 10% of the total production of biodiesel. The recent increase in worldwide biodiesel production has generated an excess of crude glycerol (or glycerin) in the market and aquaculture may benefit from the current excess including it as a dietary energy source for fish.

However, glycerin presents impurities such as water, salts, esters, alcohol and residual oil. The percentage of glycerol in the mixture ranges from 65 to 70% (w/w) and most of the impurities is formed by reaction of free fatty acids with alcohol and in presence of catalyst, creating a problem of standardization on the process of synthesis of the co-product and hence, hindering their application in animal nutrition. Neu et al. (2012) showed that different sources of glycerin present different apparent digestibility coefficient (ADC) for Nile tilapia. The present study evaluated a purified source of glycerol in order to nullify the effects of glycerin impurities and to understand the effect of its main component on fish metabolism.

The reported ADC of the glycerin for Nile tilapia ranged from 0.89 (Meurer et al., 2012) to 0.79 (Gonçalves et al., 2015). Those studies evaluated distinct sources of glycerin, which had different quantities of glycerol and residual fatty acids. Balen et al. (2014) reported an ADC of 0.97 and 0.89, for tropical fish *Piaractus mesopotamicus* and *Rhamdia quelen*, respectively. The aforementioned studies adopted the chromic oxide as an inert marker to assess the nutrient digestibility and none of them studied the utilization of a purified source of glycerol. The "hot chase" approach is a useful method for investigating the total digestibility, gut absorption rates, catabolism and retention (assimilation) of nutrients (Conceição et al., 2007). This method consists of a mass balance method that follows the compartmental distribution of a specific radioactive tracer, in this case, ^{14}C -glycerol.

Liver slices from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) were able to metabolize ^{14}C -glycerol to CO_2 , and to incorporate the ^{14}C into glycogen and lipids *in vitro* (Lech, 1970). Even though a few studies were carried out to assess the digestibility dietary glycerol and the influence on metabolic parameters, it remains to be assessed the bioavailability and metabolic fate of the dietary glycerol in tilapia, since this specie is one of the major inland fish specie produced worldwide (FAO, 2014). Thus, this study aimed to evaluate how the inclusion of glycerol in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) could affect the juveniles metabolism and how the fish use this new ingredient.

2 MATERIALS AND METHODS

It was used 60 juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*) obtained from UTAD, Portugal, with initial average weight of 8.53 ± 1.27 g, in order to have plenty of tilapia juveniles for metabolic assays. The rearing was carried out in the Experimental Laboratory of Aquatic Organism of the Algarve University, Faro, Portugal.

Fish were randomly divided into 3 fiberglass cylindro-conical tanks in a water recirculation system, equipped with fiber mesh pad filter, submerged biological filter and an ultraviolet filter (TMC, London, UK). Temperature was maintained at $25.17 \pm 0.13^\circ\text{C}$ and water renewal was 1.5 times/ hour/ tank. Oxygen saturation in the water was $87.21 \pm 2.81\%$, ammonia was 0.24 ± 0.19 ppm and nitrite was 0.3 ± 0.1 ppm. A 12h light/dark cycle was adopted. The experimental adaptation period of the animals to laboratory conditions was ten days in which fish fed a basal diet without glycerol. The experimental diets were pelleted (2 mm) isoproteic and isocaloric with 38% CP and 20 MJ of gross energy Kg^{-1} , respectively, and formulated to contain 0% (G0), 5% (G5) and 15% (G15) of purified glycerol (Table 1).

Table 1. Composition and nutritional value of experimental diets provided to juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*).

Ingredients (%)	Treatments		
	G0	G5	G15
Fishmeal	7.5	7.5	7.5
Soy protein concentrate	11.0	12.5	16.0
Corn gluten	5.0	5.0	5.0
Soybean meal 48	18.0	18.0	18.0

Rapeseed meal	10.0	10.0	10.0
Sunflower meal	7.0	7.0	7.0
Wheat bran	15.0	8.0	0.0
Rice bran full fat	8.0	8.0	0.0
Corn meal	8.0	8.0	8.7
Soybean oil	4.0	4.5	6.3
Vitamin and Mineral Premix*	1.0	1.0	1.0
Binder (guar gum)	0.5	0.5	0.5
Antioxidant powder	0.2	0.2	0.2
Dicalcium phosphate	1.5	1.5	1.5
Ca carbonate	0.3	0.3	0.3
L-Lysine	0.7	0.7	0.7
L-Threonine	0.3	0.3	0.3
DL-Methionine	2.0	2.0	2.0
Glycerol	0.0	5.0	15.0
TOTAL	100.0	100.0	100.0

Proximate composition (dry matter basis)

Dry matter (%)	93.0	92.7	88.7
Ash (%)	8.9	8.7	8.6
Crude protein (%)	38.0	38.1	38.1
Ether extract (%)	7.9	7.6	7.8
Crude energy (KJ/g)	20.3	20.8	21.3

* Composition of vitamin and mineral supplement (amount / kg): Vitamin A, 1,500 IU; Vitamin B2, 15 mg; Vitamin B3, 1000 IU; Vitamin B12, 1000 IU; Vitamin E, 25 mg; Vitamin PP, 120 g; Colin, 2000 mg; Calcium Pantothenate, 80 mg; Folic Acid, 2mg; BHT, 170 mg; Mn, 80 mg; Fe, 24 mg; Zn, 50 mg; Cu, 8 mg; I, 3 mg; Se 0.10 mg.

The diets were provided 3 times a day for 40 days to apparent satiation for juveniles physiological adaptation. The tanks were siphoned after each feeding to remove excreta and remaining feed. The proximate composition of the diets was assayed according to Association of Official Analytical Chemists standard methods (AOAC 1995). Briefly, dry matter was measured gravimetrically in oven-dried samples (105 °C for 24 h), for ether extract we used the Soxhlet system while ash was processed in muffle at 550 °C for 4 h and crude protein measured by the Kjeldahl method.

For the metabolism trials, six fish from each treatment were randomly chosen and anesthetized with 200 ppm of tricaine (MS-222, Sigma-Aldrich, Germany). Fish were force-fed using a handmade plastic tube (inner diameter of 2.5mm) with a stick placed inside, with five pellets unitarily labeled, with known rates of radioactivity, with ^{14}C -glycerol ($[^{14}\text{C}(\text{U})$, 9.25MBq, Perkin Elmer, USA) and 2 colored pellets. The amount of feed provided corresponds to 0.5% of total fish biomass. After the force-feeding, fish were transferred to incubation chambers, filled with 2L of freshwater, for 18 hours. The setup used for determining the metabolic fate of the dietary glycerol followed the method described by Rønnestad et al. (2001) with minor modifications. The incubation system consisted of an aquarium with 2L capacity, connected to air supplier and three KOH trap to capture radiolabelled $^{14}\text{CO}_2$, avoiding its release into the atmosphere. At the end of the incubation period, oxygen flow was stopped and fish were euthanized inside the chambers with overdose of tricaine. It was added 100 ml of hydrochloric acid (0.1 M HCl) in gradual steps into the incubation water, resulting in a progressive decrease in pH that causes the rapid diffusion of any remaining CO_2 from the water into the metabolic trap (Rønnestad et al. 2001).

Aliquots of 5ml of the incubation water (n=5) and of each KOH trap (n=3) were collected. Then 10 ml of scintillation cocktail (Ultima Gold XR,

Perkin Elmer, USA) was added into vials containing the water and trap samples and counted for radioactivity (DPM, disintegrations per minute).

Fish were dissected and samples of approximately 1g from muscle and liver were collected for nutrients extraction and posterior radioactivity quantification.

In order to verify whether some of the labeled glycerol was converted into lipid, a lipid extraction of the tissue samples was conducted, using a method modified from Bligh and Dyer (1959). Briefly, each tissue sample were grinded in order to obtain a homogenate. It was added 5 ml and 2.5 ml of distilled water, in muscle and liver samples, and they were grinded in an ice bath for 6 and 3 minutes, respectively, using a homogenizer (Ultra-turrax, T-25, IKA, Staufen, Germany). Then was added methanol, chloroform and distilled water (2:2:1, ml) and tissues samples were homogenized again in an ice bath for 2 min. The homogenates were then centrifuged at 2000 G for 10 min. After centrifugation, samples were divided into two layers, the chloroform layer containing the lipid fraction and the methanol-water layer containing all the non-lipid compounds. A purified lipid extract was obtained merely by isolating the chloroform layer using a Pasteur micropipette. The non-lipid fraction were kept on ice for posterior analysis. The lipid extract was transferred into 20 ml vials and 10 ml of scintillation cocktail (Ultima Gold, Perkin Elmer, Waltham, MA , USA) was added to each vial. Samples were kept at room temperature for at least 1h before being counted in a liquid scintillation analyzer (Tri-Carb 2910TR, Perkin Elmer, Waltham, MA , USA).

In order to verify whether some of the labeled glycerol was converted into protein, the non-lipid fraction was submitted to trichloroacetic acid (TCA) solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for protein precipitation and posterior radioactivity counting. It was added approximately 1.3 ml of TCA 24%, according to the sample volume, in order to obtain a final concentration of

6% TCA. The samples were incubated on ice for 1 hour and then centrifuged for 13 min at 5000 G at 4 °C. The supernatant, a TCA-soluble fraction, was removed with a Pasteur micropipette and kept on ice for posterior radioactivity counting. The TCA precipitate was washed with 7.5 ml of acetone, incubated on ice for 15 min and centrifuged for 13 min at 5000 G at 4 °C. The washing process was done twice. The TCA precipitate was then transferred to a clean scintillation vial, to which 1 ml of tissue solubiliser (Solvable, Packard Bioscience) was added. The vials were placed in an oven and incubated at 50 °C for 24h, until completely solubilized. It was added 4 ml of scintillation cocktail (Ultima Gold, Packard Bioscience) to each vial. Samples were kept at room temperature for at least 1h before being counted in a liquid scintillation analyzer (Tri-Carb 2910TR, Perkin Elmer, Waltham, MA , USA).

The TCA-soluble fraction, a non-lipid and non-protein extract, assumed as a carbohydrate fraction, was also counted for radioactivity, after addition of 10 ml of scintillation cocktail (Ultima Gold XR, PerkinElmer, USA).

The sum of the radioactivity counting from CO₂ trap and fish tissues is referred as absorption. The radioactivity counting of the incubation water is referred as evacuation. Absorption and evacuation are expressed in terms of percentage in relation to the total radioactivity counting (DPM -disintegrations per minute). The radioactivity counting of the CO₂ trap and sampled tissues represent the glycerol catabolism and retention, respectively, and are expressed in terms of percentage of each compartment in relation to the total absorption.

Data were arcsin transformed before submitted to one-way analysis of variance (ANOVA). The assumptions for ANOVA were validated by Bartlett's test for homogeneity of variance and the Shapiro-Wilk test for normal distribution of the residuals. The means of treatments were compared by the Tukey test at 5% significance level, using the computational package SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011).

3 RESULTS

There were no significant differences ($P>0.05$) for ^{14}C -glycerol absorption and evacuation (Figure 1).

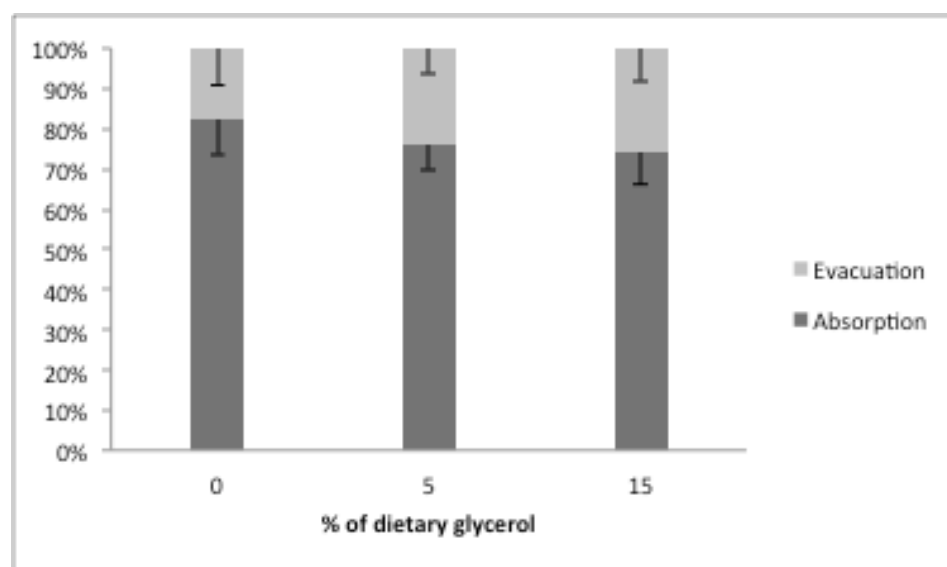


Figure 1. Percentage of absorption and evacuation of different levels of dietary glycerol provided to juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*). (n=6).

Fish fed G5 presented the highest ($P<0.05$) percentage of ^{14}C -glycerol retention, consequently, the lowest ($P<0.05$) catabolism (Figure 2). Fish fed G5 also presented the highest ($P<0.05$) percentage of ^{14}C -carbohydrate. However, no differences were found ($P>0.05$) between treatments in the total amount of ^{14}C -lipids and ^{14}C -protein (Figure 3).

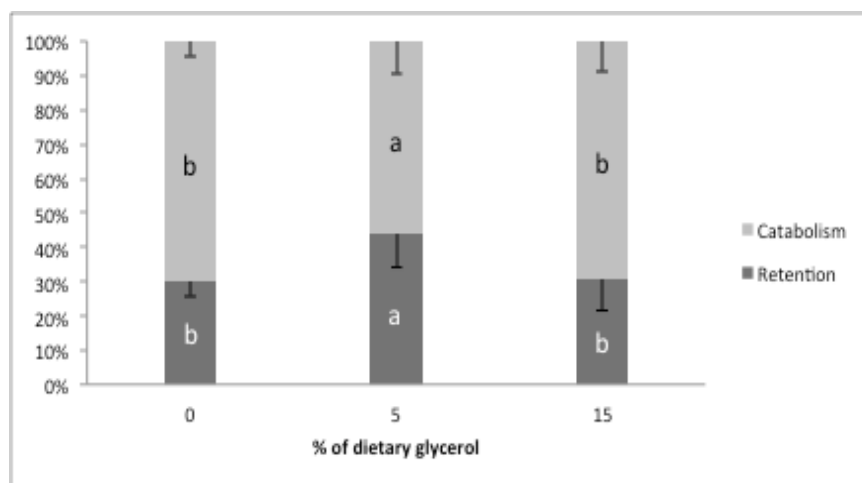


Figure 2. Percentage of catabolism and retention of different levels of dietary glycerol provided to juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*). (n=6). Different letters in each parameter differ significantly by the Tukey test at 5% significance level.

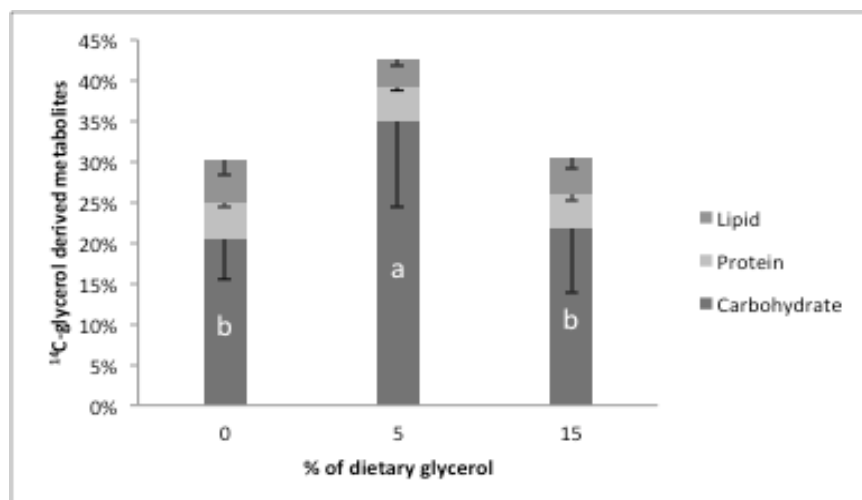


Figure 3. Percentage of total ^{14}C -glycerol derived metabolites of tilapia fed different levels of glycerol. (n=6). Means followed by different letters in each parameter differ significantly by the Tukey test at 5% significance level.

The quantities of ^{14}C -lipid in muscle and liver are presented in Figure 4. Treatment G0 presented the highest level ($P<0.01$) of muscle ^{14}C -lipid, however, no differences were found ($P>0.05$) in fish liver.

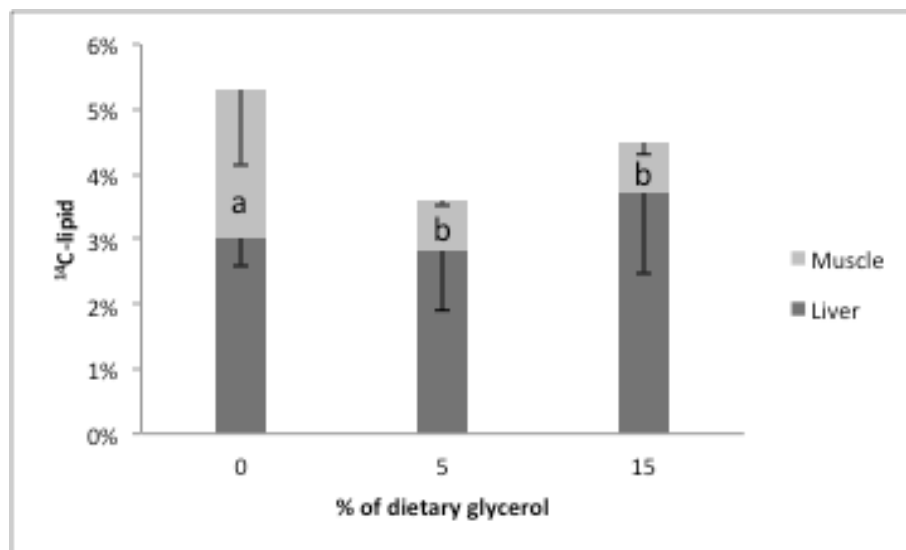


Figure 4. Percentage of ^{14}C -lipid in muscle and liver of juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*) fed different levels of glycerol. ($n=6$). Different letters in each parameter differ significantly by the Tukey test at 5% significance level.

The quantities of ^{14}C -protein in muscle and liver are presented in Figure 5. Fish fed G15 diet presented the lowest level of ^{14}C -protein in muscle ($P<0.01$). However no differences were found ($P>0.05$) in fish liver.

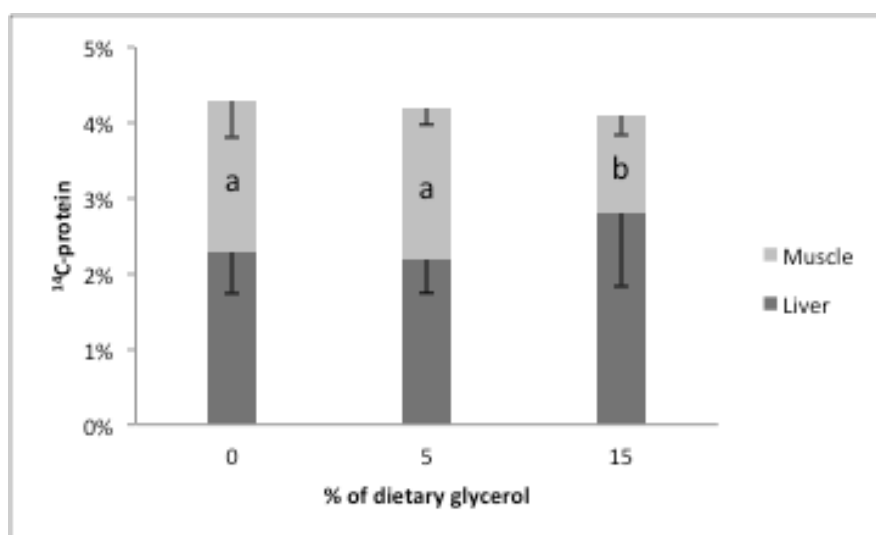


Figure 5. Percentage of ^{14}C -protein in muscle and liver of juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*) fed different levels of glycerol. Different letters in each parameter differ significantly by the Tukey test at 6% significance level. (n=6).

Fish from G5 presented the highest ($P < 0.05$) percentage of ^{14}C -carbohydrate in liver, however no differences were found ($P > 0.05$) in fish muscle (Figure 6).



Figure 6. Percentage of ^{14}C -carbohydrate in muscle and liver of juveniles tilapia (*Oreochromis mossambicus*) fed different levels of glycerol. Different letters in each parameter differ significantly by the Tukey test at 5% significance level. (n=6).

4 DISCUSSION

Glycerol inclusion levels up to 15% in the diet of juvenile tilapia do not influence the nutrient absorption. Intestinal absorption of glycerol in rats ranges from 70 to 89% (Hober and Hober, 1937). Bartelt and Schneider (2002) reported that the intestinal absorption of glycerol might be more than 97% in pigs and laying hens. In the present study, mean absorption of ^{14}C -glycerol was $82,5 \pm 9,1\%$, $76,0 \pm 6,3\%$ and $74,4 \pm 8,2\%$, for treatments G0, G5 and G15, respectively. Those values are close to the reported glycerin apparent digestibility coefficient (ADC) for Nile tilapia juveniles, which range from 79 to 89% (Gonçalves et al., 2015; Meurer et al., 2012), considering that different sources of glycerin present different ADCs in tilapia (Neu et al., 2012). The

highest value of glycerin ADC reported by Meurer et al. (2012), compared to the present study, may be due to the presence of fatty acids in the glycerin, which are known to have high digestibility coefficient in fish (Trullàs et al., 2015; Sarker et al., 2015). When there are increased blood glycerol levels associated with glycerol ingestion in humans, excretion of glycerol in the urine increases (Sommer et al., 1993). Nevertheless, with healthy physiological levels of blood glycerol, urinary excretion may be negligible (Bortz et al., 1972). In the present study, 15% of dietary glycerol did not increase the evacuation compared to other treatments, indicating that this inclusion level did not overload the capacity of fish in using this nutrient.

Once absorbed, glycerol may be directly oxidized via glycolysis in the citric acid cycle or via gluconeogenesis in the pentose phosphate pathway. Each molecule of glycerol that is oxidized gives rise to three molecules of carbon dioxide (Sloviter et al., 1966). It is noteworthy that the present study does not distinguish $^{14}\text{CO}_2$ produced in different pathways of intermediary metabolism. Glycerol catabolism ranged from 57-69% of the total glycerol absorbed. This fact demonstrates that glycerol is a highly available substrate for energy production purposes in juvenile tilapia metabolism. According to Bortz et al. (1972), glycerol oxidation represents 60 and 58% of glycerol metabolic fate for lean and obese men, respectively, which is similar to values found in the present study.

The lowest ^{14}C -glycerol catabolism, and consequently the highest retention, occurred in treatment G5, indicating that dietary glycerol in low levels is retained more than in high levels of inclusion in juvenile tilapia diet. Because of the high rates of absorption and catabolism, dietary glycerol is shown to be an effective dietary energy source for juvenile tilapia. This nutrient may be a suitable alternative to conventional dietary carbohydrate sources, being the economic issues determinant in its inclusion in fish diet. The definition of an

optimal inclusion level of dietary glycerol and its effectiveness as an energy source for different feeding habits fish species and also in different life stages, still remains to be elucidated.

A possible limiting step in the use of the absorbed glycerol is the glycerol kinase enzyme activity. This enzyme catalyzes the phosphorylation of glycerol to glycerol-3-phosphate, the most biochemically important form of glycerol (Robergs and Griffin, 1998), which is a substrate for the synthesis of triglycerides (Nye et al, 2008). Triglyceride and fatty acid cycling require the constant generation of glycerol 3-phosphate for triglyceride synthesis, particularly in situations when cycling is increased (Champe et al., 2009). Therefore, the level of glycerol kinase in the tissue influences the extent of glycerol utilization (Champe et al., 2009). Nonetheless, there is a tendency for increasing glycerol kinase activity with increasing glycerol levels in the diet of Nile tilapia (Costa et al., 2015). Those authors also related a higher level of muscle and hepatic triglycerides in Nile tilapia juveniles fed 15% glycerol, in substitution to dietary starch. In the present study, ^{14}C -glycerol was not effectively incorporated into lipids, being mostly found in the non-lipid and non-protein extract. The amount of ^{14}C -lipids found in fish liver and muscle ranged from 3.7 to 5.3% of the total ^{14}C -glycerol absorbed. Lech (1970) also evidenced a high incorporation of glycerol into glycogen compared to a low incorporation into lipids in trout (*Salmo gairdneri*) liver.

Most of the retained ^{14}C was found in the non-lipid and non-protein extract, presumably the carbohydrate fraction. Fish fed G5 presented approximately 35% of total absorbed ^{14}C -glycerol in that fraction, being mostly deposited in liver. The gluconeogenic role of glycerol have been well established in several fish species (Lech, 1970; Moon, et al., 1985; Menton et al., 1986; Segner et al., 1994; Maurizi et al., 2000; Kam and Milligan, 2006; Silva et al., 2012). ^{14}C -glycerol is rapidly incorporated into glycogen in both muscle and

liver of lamprey *Lampetra fluviatilis* (Savina and Wojtczak, 1977). Besides, in American eel *Anguilla rostrata* hepatocytes, gluconeogenic rates, with glycerol as the substrate, are higher than those obtained with lactate, alanine, or aspartate (Renaud and Moon 1980). Glycerol is a gluconeogenic precursor, with approximately 38 and 79% of total turnover consisting of conversion of glycerol to glucose, in lean and obese humans, respectively (Bortz et al., 1972). Thus, as the gluconeogenic role of glycerol is well established, the authors of the present study presume that the radioactivity of the non-lipid and non-protein extract came from the ^{14}C -carbohydrates. Glycerol may be phosphorylated to glycerol-3-phosphate, by the glycerol kinase, and then be converted, by glycerol-3-phosphate dehydrogenase, to dihydroxyacetone phosphate, an intermediate of gluconeogenic pathway (Salway, 1994). Therefore, dietary glycerol may provide metabolic intermediates for biosynthetic processes besides replenishing the tissue energy storage, which will be used by fish not only *in vivo* but also in the *postmortem* status, improving the final product quality traits (Silva et al., 2012). There are evidences that 3-carbon compounds may have a higher importance than glucose in providing energy and carbon for short-term hepatic glycogen replenishment during feeding-fasting cycles of the marine fish specie *Sparus aurata* (Méton et al., 2003). Moreover, according to Christiansen & Klungsoyr (1987), the usage of liver glycogen is more important as a source of metabolic intermediates for biosynthetic processes rather than an energy source.

The ^{14}C -glycerol was also incorporated into protein in liver and muscle of tilapia juveniles. Fish fed G15 presented the lowest level of ^{14}C -protein in muscle, however no differences were found between treatments in fish liver. The amount of ^{14}C -protein incorporated into juveniles tissue represented approximately 4.2% of the total absorbed ^{14}C -glycerol. To the best knowledge of the authors and to-date, this is the first study reporting the proteogenic role of dietary glycerol in tilapia metabolism. The tissue protein deposition may be

benefit with supplementation of glycerol in the diet of broilers (Bernardino et al., 2014) and rats (Andrade et al., 2015). The incorporation of the ^{14}C derived from dietary glycerol into tissue protein, besides the contribution of glycerol to overall energy supply, suggests a possible protein-sparing effect of dietary glycerol. Jahoor et al. (1990) reported that glycerol competitively inhibited gluconeogenesis from amino acids in humans. Dietary glycerol also may spare glucogenic amino acids, promoting protein deposition in tissues of adult mongrel dogs (Steele et al. 1971). However, the protein-sparing effect of dietary glycerol in fish metabolism still remains to be better elucidated.

5 CONCLUSION

Juvenile tilapia highly absorb and catabolize dietary glycerol to CO₂, within the tested inclusion levels. The referred specie is also able to metabolize the retained fraction of glycerol into lipid, protein and carbohydrate, in both liver and muscle. Dietary glycerol may be an effective energy source for tilapia juveniles.

REFERENCES

- ANDRADE, E. F. et al. Adaptation to physical training in rats orally supplemented with glycerol. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 1, p. 63–69, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC International. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.
- BALEN, R. E. et al. Digestible energy of crude glycerol for pacu and silver cat fish. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1448-1451, jan. 2014.
- BARTELT, J.; SCHNEIDER, D. **Investigation on the energy value of glycerol in the feeding of poultry and pig**. In: _____. Union for the Promotion of Oilseeds. Berlin: Schriften Heft 17, 2002. p. 15-36.
- BERNARDINO, V. M. P. et al. Activity of glutamate dehydrogenase and protein content in the breast of broilers fed diets containing different sources and levels of glycerine. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 3, p. 559–568, 2014.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 2 ago. 1959.
- BORTZ, W. M. et al. Glycerol turnover and oxidation in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 6, p. 1537–1546, 1972.
- CAMPOS, C. et al. Rearing temperature affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae protein metabolic capacity. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1485–1496, 2013.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 528p.
- CHRISTIANSEN, D. C.; KLUNGSØYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 88, n. 3, p. 701–711, 1987.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS. **Part 582, substances generally recognized as safe:** subpart B, general purpose food additives: 21CFR582. Washington, 2003. §582.1320.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; MORAIS, S.; RØNNESTAD, I. Tracers in fish larvae nutrition: A review of methods and applications. **Aquaculture**, v. 267, n. 1-4, p. 62–75, 2007.

COSTA, D. et al. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed with glycerol. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, v. 50, n. 5, 2015.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). The State of World Fisheries and Aquaculture, 2014. Rome. 223 p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

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

HÖBER, R.; HÖBER, J. Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 10, n. 4, p. 401–422, dez. 1937.

JAHOR, F.; PETERS, E. J.; WOLFE, R. R. The relationship between gluconeogenic substrate supply and glucose production in humans. **The American journal of physiology**, v. 258, n. 2 Pt 1, p. E288–96, fev. 1990.

KAM, J. C.; MILLIGAN, C. L. Fuel use during glycogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) white muscle studied in vitro. **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. Pt 5, p. 871–880, 2006.

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

MAURIZI, A. et al. The effect of glycerol dissolved in the rearing water on the transition to exotrophy in gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, v. 189, n. 1-2, p. 119–131, 2000.

MENTON, D. J.; SLINGER, S. J.; HILTON, J. W. Utilization of free glycerol as a source of dietary energy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v. 56, n. 3-4, p. 215–227, 1986.

METÓN, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis–gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 99–107, 2003.

MEURER, F. et al. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, v. 43, n. 11, p. 1734–1737, 2012.

NEU, D. H. et al. Energia digestível de diferentes fontes de glicerol para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 1, p. 174–179, 2012.

NYE, C. K.; HANSON, R. W.; KALHAN, S. C. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27565–27574, 2008.

RENAUD, J. M.; MOON, T. W. Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 135, n. 2, p. 115–125, 1980.

ROBERGS, R. A.; GRIFFIN, S. E. Glycerol: Biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. **Sports Medicine**, v. 26, n. 3, p. 145–167, 1998.

RØNNESTAD, I. et al. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 461–466, 2001.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a Glance**. London: Blackwell Science, 1999.

SARKER, P. K. et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine Schizochytrium sp. and of protein and essential amino acids from freshwater Spirulina sp. feed ingredients. **Aquaculture Nutrition**, in press, 2015.

SAVINA, M. V.; WOJTCZAK, A. B. Enzymes of gluconeogenesis and the synthesis of glycogen from glycerol in (*Lampetra fluviatilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 57, p. 185–190, 1977.

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

SLOVITER, H.A.; SHIMKIN, P.; SUHARA, K. Glycerol as a substrate for brain metabolism. **Nature**, v. 210, p. 1334–1336, 1966.

SOMMER, S. et al. Pharmacokinetics of glycerol administered orally in healthy volunteers. **Arzneimittel-Forschung**, v. 43, n. 7, p. 744–7, jul. 1993.

STEELE, R.; WINKLER, B.; ALTSZULER, N. Inhibition by infused glycerol of gluconeogenesis from other precursors. **The American journal of physiology**, v. 221, n. 3, p. 883–8, set. 1971.

TRULLÀS, C. et al. Vegetable re-esterified oils in diets for rainbow trout: Effects on fatty acid digestibility. **Aquaculture**, v. 444, p. 28–35, 2015.

APÊNDICES

Tabela 1 Análise de variância da absorção de glicerol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.035553	0.017776	2.340	0.1305
erro	15	0.113954	0.007597		

CV (%) = 8.04

Tabela 2 Análise de variância da evacuação de glicerol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.035553	0.017776	2.340	0.1305
erro	15	0.113946	0.007596		

CV (%) = 17.91

Tabela 3 Análise de variância da retenção de glicerol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.067085	0.033543	5.226	0.0190
erro	15	0.096281	0.006419		

CV (%) = 12.81

Tabela 4 Análise de variância do catabolismo do glicerol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.067085	0.033543	5.226	0.0190
erro	15	0.096281	0.006419		

CV (%) = 8.47

Tabela 5 Análise de variância da concentração de lipídeo hepático

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.142734	0.071367	1.424	0.2716
erro	15	0.752018	0.050135		

CV (%) = 11.02

Tabela 6 Análise de variância da concentração de lipídeo muscular

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.783048	0.391524	11.591	0.0009
erro	15	0.506688	0.033779		

CV (%) = 12.30

Tabela 7 Análise de variância da concentração de lipídeos totais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.356759	0.178379	2.592	0.1079
erro	15	1.032304	0.068820		

CV (%) = 11.28

Tabela 8 Análise de variância da concentração de proteína hepática

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.080317	0.040158	1.438	0.2683
erro	15	0.418908	0.027927		

CV (%) = 9.03

Tabela 9 Análise de variância da concentração de proteína muscular

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.171557	0.085779	10.440	0.0014
erro	15	0.123241	0.008216		

CV (%) = 5.45

Tabela 10 Análise de variância da concentração de proteína total

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.002053	0.001026	0.071	0.9319
erro	15	0.217211	0.014481		

CV (%) = 5.27

Tabela 11 Análise de variância da concentração de carboidrato hepático

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	8.417334	4.208667	5.969	0.0124
erro	15	10.576654	0.705110		

CV (%) = 20.91

Tabela 12 Análise de variância da concentração de carboidrato muscular

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	0.050722	0.025361	0.405	0.6741
erro	15	0.939584	0.062639		

CV (%) = 7.70

Tabela 13 Análise de variância da concentração de carboidrato total

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	6.280793	3.140396	6.336	0.0101
erro	15	7.434810	0.495654		

CV (%) = 13.80