

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E  
ENGENHARIA DE PESCA**

**JULIANA KASPER MEWES**

Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo  
com rações contendo glicerina bruta

Toledo

2015

**JULIANA KASPER MEWES**

Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo  
com rações contendo glicerina bruta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Toledo

2015

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**JULIANA KASPER MEWES**

Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo glicerina bruta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

---

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

---

Prof. Dra. Lucélia Tessaro  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

---

Prof. Dra. Thaís Souto Bignotto  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 04 de setembro de 2015.

Local de defesa: Auditório do Gerpel/ UNIOESTE/ *Campus* de Toledo.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais  
*Osmar Mewes e Laurene Kasper Mewes,*  
pelo incentivo a concretizar o mestrado e  
pela doação de cuidados e amor pelo  
Arthur durante essa trajetória e,

Ao meu marido  
*Evaldo Gonçalves de Assis,*  
pela paciência, amor e carinho que dedicou  
a mim e ao nosso filho ao longo desses anos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor e amigo Robie que me incentivou a continuar os estudos, pelo suporte durante o experimento, por ser rígido algumas vezes, mas principalmente pela paciência e compreensão pelas ausências atribuídas à minha responsabilidade maior, Arthur;

Aos meus colegas e amigos “latraquianos”: em especial ao Alexandre Henrique Buzzi que durante minha ausência conduziu o experimento, realizou as análises experimentais e estatísticas e quando voltei ao laboratório me esclareceu a situação e nunca disse não quando precisei de ajuda e esclarecimentos. Ao Giovano Neumann que realizou as análises seminais e espermáticas e também me ajudou com a estatística do trabalho;

À Dra. Lucélia Tessaro por confeccionar minhas lâminas e por elucidar minhas dúvidas milhões de vezes;

À professora Irani Quagio Grassiotto e ao seu laboratório na UNESP por permitir a confecção das lâminas histológicas;

Aos demais colegas que me ajudaram no experimento: Arno Juliano Butzge, Adriano Luis Heinen, Andressa Fierli Dean, Cesar Pereira Rebechi de Toledo, Cintia Nara Buratto, Claudio Lisias Batista Neves, Cleonice Hilbig, Felipe José Santin, Gabriele dos Santos Nogueira, Jacson Pablo Funghetto, Maurício Adames, Mirna Adriane Syperreck, Ramon Acosta, Ricardo Andrei Krause, Rogério Anderson Druzian, Vitor Sendin Magalhães e Werike Gustavo de Oliveira. Como dizia meu amigo Claudio, teve gente “pra peru” que me ajudou nesse experimento;

Ao Prof. Dr. Fábio Meurer por formular as rações experimentais;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de pós Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca (PREP);

Ao CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos;

Por fim, a todos que de algum modo me ajudaram nesta jornada,

*Muito obrigada.*

## Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo glicerina bruta

### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da glicerina bruta nas rações de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o crescimento, as características seminais e espermáticas, alguns parâmetros sanguíneos e aspectos histológicos do tecido hepático e testicular. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por rações isoprotéicas e isoenergéticas contendo 32% de proteína digestível (PD) e 3200 kcal de energia digestível (ED).kg de ração<sup>-1</sup> e, cinco níveis de inclusão de glicerina bruta nas proporções de 0, 4, 8, 12, e 16%. Após dez meses do início do experimento, foram avaliados os parâmetros reprodutivos dos machos. Oito machos de cada unidade experimental foram submetidos à coleta de sangue para quantificação dos níveis de cálcio, triglicerídeos e glicose plasmáticos. Em seguida, todos os machos foram submetidos à eutanásia para dissecação e mensuração individual dos pesos do fígado, das gônadas e das vísceras para avaliação dos parâmetros zootécnicos e somáticos. Também foi avaliada a histologia de gônadas e fígados. Houve redução do volume de sêmen liberado pelos machos, da fecundidade e fecundidade efetiva de forma diretamente proporcional ( $p < 0,05$ ) ao incremento deste alimento nas rações. Os demais parâmetros seminais e espermáticos não foram influenciados. Dentre os parâmetros sanguíneos, somente os níveis de glicose foram influenciados ( $p < 0,05$ ), reduzidos proporcionalmente ao aumento dos níveis de glicerina bruta nas dietas. O desempenho zootécnico não foi influenciado. O índice hepatossomático apresentou um aumento diretamente proporcional ( $p < 0,05$ ) ao nível de inclusão da glicerina bruta nas rações. As áreas média, máxima e mínima dos hepatócitos não foram influenciadas. Na histologia testicular foi verificada a presença de todos os cistos de diferenciação em todos os tratamentos, mas houve maior presença de espermatozoides no tratamento com 0% de glicerina do que nos tratamentos com alta inclusão de glicerina bruta nas rações. Assim, não se recomenda o uso deste subproduto na alimentação de machos reprodutores de tilápia do Nilo, pois prejudica seu desempenho reprodutivo.

**Palavras-chave:** reprodução, nutrição, biodiesel, subproduto.

## Reproductive damages caused by feeding in Nile tilapia males with feed containing crude glycerin

### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effects of the inclusion of crude glycerin in feeds of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock on growth, seminal and sperm characteristics, some blood parameters and histological features of liver and testicular tissue. The animals were distributed in a complete randomized experimental design, composed by five treatments and four replications. The treatments were constituted by lipoprotein and isocaloric feeds containing 32% of digestible protein (DP) and 3200 kcal of digestible energy (DE).kg of feed<sup>-1</sup> and, five levels of inclusion of crude glycerin in the proportions of 0, 4, 8, 12, and 16%. Ten months after the beginning of the experiment, males reproductive parameters were evaluated. Eight males from each experimental unit were submitted to blood collection for quantification of plasmatic calcium, triglycerides and glucose levels. Subsequently, all the males were subjected to euthanasia for dissection and individual measurement of liver, gonads and viscera weights for evaluation of zootechnical and somatic parameters. Gonads and liver histology was also evaluated. There were reduction of the semen volume released by the males, of the fecundity and effective fecundity in a directly proportional manner ( $p < 0,05$ ) to the increase of this food in the feeds. The other seminal and spermatic parameters were not influenced. Among the blood parameters, only the glucose levels were influenced ( $p < 0,05$ ), reduced proportionally to the increase of crude glycerin in the diets. The zootechnical performance was not influenced. The hepatosomatic index showed a directly proportional increase ( $p < 0,05$ ) at the level of inclusion of crude glycerin in the feeds. The medium, maximum and minimum areas of the hepatocytes were not influenced. In the testicular histology, it was verified the presence of all the differentiation cysts in all the treatments, but there was a greater presence of spermatozoids in the treatment with 0% of glycerin than in the treatments with higher inclusion of glycerin in the feeds. Thus, the use of this by-product in the feeding of Nile tilapia broodstock males is not recommended, since it can affect their reproductive performance.

**Keywords:** reproduction, nutrition, biodiesel, by-product.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Animal Reproduction Science*. Disponível em: <http://www.journals.elsevier.com/animal-reproduction-science/>



## SUMÁRIO

<b>Revisão bibliográfica</b> .....	9
Visão geral da piscicultura.....	9
Fontes de proteína e energia de uso convencional nas rações .....	9
Reprodução x nutrição .....	10
Glicerina bruta - resíduo do biodiesel x potencial fonte alimentar .....	12
Metabolismo do glicerol .....	14
Referências.....	16
<b>Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo glicerina bruta</b> .....	<b>19</b>
Introdução .....	19
Material e métodos.....	21
Resultados.....	27
Discussão .....	34
Conclusão.....	38
Referências.....	39

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Visão geral da piscicultura**

O abastecimento global do pescado tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Em 2012 a produção mundial de pescado foi de 158 milhões de toneladas. A previsão é de que até 2030 a demanda internacional aumente em mais de 100 milhões de toneladas por ano, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014).

Contudo, a pesca não sustentável nos estoques pesqueiros naturais ocasionou uma queda na atividade pesqueira, o que resultou em uma grande expansão da aquicultura, sendo o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo (FAO, 2012).

O Brasil é um dos países com grande potencial para expansão da atividade, pois é detentor da maior quantidade de água doce com potencial para aquicultura continental no mundo. Embora possua a maior biodiversidade de ictiofauna do mundo, a piscicultura cresce principalmente pela criação de espécies exóticas, em especial carpas e tilápias (Borghetti et al., 2003).

O cultivo da tilápia tem se mostrado como uma das atividades agropecuárias de maior crescimento em nível mundial, correspondendo ao segundo grupo de peixes de água doce mais cultivado, com produção global de cerca de 3,95 milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2014). Isso se deve, ao conhecimento técnico disponível, tanto no campo da biologia quanto nas técnicas de manejo, como a possibilidade de reversão sexual, introdução de material genético selecionado, adoção de estratégias de produção em tanques-rede e uma intensa difusão e aprimoramento de tecnologias de cultivo e de produção de rações (Nogueira & Rodrigues, 2007).

Tendo em vista que a alimentação representa a maior parcela dos custos de produção na piscicultura, alguns obstáculos dificultam sua expansão, como a dependência de matéria-prima para fabricação de rações pouco abundante ou que oneram o custo de produção. Assim, a cada dia mais, surge a necessidade de avaliar fontes alternativas àquelas convencionalmente utilizadas.

### **Fontes de proteína e energia de uso convencional nas rações**

A proteína é o principal elemento visceral e estrutural do organismo animal e o seu contínuo suprimento alimentar é necessário para atender às suas exigências, pois aminoácidos são usados para construir novas proteínas durante o crescimento e a reprodução (Furuya,

2010). Ainda, o mesmo autor expõe que as rações comerciais para tilápias possuem elevados teores de proteína. A fonte padrão deste nutriente nestas rações é a farinha de peixe, em função do elevado teor proteico com bom balanço de aminoácidos, sendo também alimento palatável com quantidades adequadas de energia, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas. Entretanto, o elevado custo da farinha de peixe no mercado mundial resultou no uso de fontes proteicas de origem vegetal para compor rações comerciais em substituição às farinhas de origem animal.

Dentre as fontes proteicas de origem vegetal o farelo de soja tem-se destacado como a mais promissora, devido ao seu elevado valor nutritivo e a disponibilidade no mercado nacional. Mesmo que possua fatores limitantes ou antinutricionais, como por exemplo, a metionina como aminoácido limitante (Furuya et al., 2001a) e menores valores de energia digestível, cálcio e fósforo em relação a farinha de peixe (Furuya et al., 2001b), o farelo de soja apresenta melhor coeficiente de digestibilidade do que o farelo de algodão (Guimarães, 2008a,b). Outros alimentos proteicos de origem vegetal, como o glúten de milho-60 e o glúten de milho-21, seguidos do farelo de canola também apresentam bons coeficientes de digestibilidade aparente da proteína para a tilápia-do-Nilo (Pezzato et al., 2002).

Dentre os alimentos energéticos, o milho, possui o maior coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta, superior a 90% para a tilápia (Pezzato et al., 2002; Gonçalves et al., 2009), superior ao farelo de trigo (Furuya et al., 2001b). A quirera de arroz e o sorgo também são boas fontes de energia para essa espécie (Guimarães et al., 2008a).

Embora as tilápias utilizem eficientemente carboidratos como fonte de energia, os óleos são reconhecidos como nutriente que proporciona a fonte mais concentrada de energia. Dentre eles, os de maior destaque para pesquisa são o de soja, canola e linhaça (Hayashi et al., 2000). O óleo de soja possui valor de 8.485 kcal ED kg<sup>-1</sup> (Boscolo et al., 2002), o que facilita o aumento da densidade energética para otimização do consumo e energia e nutrientes.

### **Reprodução x nutrição**

A maioria dos nutrientes ofertados na dieta é direcionada para o desenvolvimento das gônadas, espermatozoides, ovócitos e processo de ovulação, assim é fundamental que a nutrição dos reprodutores seja adequada. Segundo Maggioni et al. (2008) os níveis nutricionais podem afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de acarretar alterações do funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução.

Vários estudos elucidaram a influência da nutrição na vitelogênese, interferindo nos níveis de vitelogenina (Fontainhas-Fernandes et al., 1999) e tamanho dos ovócitos (Tyler e

Sumpter, 1996). Além disso, os níveis nutricionais impostos na dieta também alteram a fecundidade das fêmeas (Sink e Lochmann, 2008) e a qualidade das proles (Ng et al., 2011).

No entanto, para machos as informações são escassas, especialmente para tilápia do Nilo. Sabe-se que a inclusão de vitamina C na dieta aumenta a motilidade espermática (Mataveli et al., 2010) e que o uso próximo de 3450 kcal de energia digestível.kg de ração<sup>-1</sup> influencia na produção de espermatozoides e melhora a normalidade da morfologia espermática (Bombardelli et al., 2010). Sendo assim, devem-se ampliar os estudos que visam à melhoria dos gametas masculinos, já que estes contribuem para o sucesso reprodutivo e irão garantir o fornecimento de ovos, larvas e juvenis de qualidade para alcançar a expansão da tilapicultura no mercado mundial.

Ainda, a exigência nutricional para cada fase de crescimento é diferente, inclusive para a fase reprodutiva. Contudo, as formulações de rações existentes no mercado são voltadas para o crescimento e a engorda, não havendo uma ração que atenda aos reprodutores. Como a qualidade dos gametas e das proles está relacionada com a qualidade da nutrição dos reprodutores (Izquierdo et al., 2001; Bombardelli et al., 2010) e interações entre nutrição e os processos reprodutivos não são claros (Tessaro et al., 2012), há grande relevância em estudos voltados a nutrição de reprodutores.

Entretanto, a alimentação representa grande parte do custo na produção de peixes, pois depende fortemente do fornecimento de ração com altos teores proteicos que são maiores para peixes, quando comparados às demais espécies animais, o que torna a atividade ainda mais onerosa. Dessa forma, torna-se necessário a busca por alimentos alternativos que possam diminuir os custos das rações, mas ao mesmo tempo, que tenham qualidade nutricional similar aos alimentos convencionais.

Atualmente, vários resíduos da agroindústria estão sendo testados na alimentação animal (FAO, 2012). Estudos sobre a adição da glicerina bruta na alimentação animal têm sido estimulados pela possibilidade de reduzir os custos da dieta pela grande oferta do produto no mercado mundial. Até o presente momento os resultados tem sido animadores. Contudo, poucos são os estudos que avaliaram a influência da glicerina bruta sobre os parâmetros reprodutivos. Algumas pesquisas verificaram que uma única injeção intratesticular de uma solução de glicerol a 10% ou via oral, suprimiu a espermatogênese em ratos (Wiebe e Bar, 1984; Igdoura e Wiebe, 1994) e macacos (Wiebe et al., 1989). Da mesma forma, para cordeiros, a inclusão de glicerina nas dietas visando substituir o milho, demonstrou que este ingrediente parece reduzir a capacidade fecundante dos reprodutores (Gomes, 2009). Portanto, é evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este tema, uma vez que, apesar

da glicerina ser supostamente um alimento alternativo potencial para substituição ao milho, o seu uso nas rações para animais em atividade reprodutiva pode ser prejudicial.

### **Glicerina bruta - resíduo do biodiesel x potencial fonte alimentar**

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

O biodiesel é definido como um composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais. Várias espécies vegetais presentes no Brasil podem ser usadas na produção do biodiesel, entre elas soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão-manso. Desde 1º de novembro de 2014, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 7% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pelo Conselho Nacional de Política Energética, que aumentou de 5% para 7% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. Em 2013, a produção de biodiesel no Brasil foi de 2,9 bilhões de litros, destacando o país como um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo (ANP, 2015).

O biodiesel pode ser produzido através de processos de craqueamento, esterificação ou por transesterificação (Ferrão-Gonzales et al., 2008), sendo o último o processo mais comum. A transesterificação consiste numa reação química dos triglicerídeos (óleos ou gorduras) com o álcool (etanol ou metanol), estimulada por um catalisador (NaOH ou KOH). No final do processo há formação de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e do coproduto glicerina (Freitas, 2012).

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 (Swiatkiewicz e Koreleski, 2009). Segundo Thompson & He (2006) com a crescente demanda e a produção de biodiesel, a quantidade de glicerina bruta gerada será considerável, e sua utilização se tornará um tema importante.

Estudos realizados sobre os custos de produção de biodiesel evidenciaram a grande importância dos subprodutos na contabilidade final da indústria integrada do biodiesel (Barros et al., 2006). Ainda, demonstram que a produção comercial do biodiesel gera um excesso de

formação da glicerina, necessitando buscar aplicações da mesma em larga escala, para agregar valor à cadeia produtiva.

Este subproduto na forma purificada possui inúmeras aplicações industriais (aditivos para a indústria alimentícia, química e farmacêutica). A glicerina também já é reconhecida com um alimento seguro para a alimentação animal (FDA, 2006), porém deve-se dar atenção a alguns fatores de qualidade, como a quantidade de resíduo do metanol e a presença de sais de sódio ou potássio.

Dependendo do catalisador utilizado na produção de biodiesel, a glicerina gerada pode conter de 6-8% de sais de sódio ou potássio. No Brasil é mais comum o uso do hidróxido de sódio, sendo que o mineral contido no catalisador irá permanecer na glicerina. Portanto, a padronização do processo é de fundamental importância para a utilização da glicerina como ingrediente na ração animal (Romano, 2012).

Em 2010, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autorizou o uso da glicerina bruta como insumo para a alimentação animal, impondo um padrão de qualidade: no mínimo 80% de glicerol, no máximo 150ppm de metanol e 13% de umidade. O glicerol é o principal constituinte da glicerina bruta, um composto orgânico de função álcool, chamado também de propano-1,2,3-triol. O glicerol desempenha um papel essencial no metabolismo, pois trata de um componente estrutural importante de triglicerídeos e fosfolipídios, além de fornecer energia nas vias glicolíticas e ácidos carboxílicos (Lin, 1977).

A glicerina bruta é um ingrediente de grande potencial para uso na alimentação da tilápia, pois apresenta coeficientes de digestibilidade da energia de 89% e alto valor de energia bruta (3.511 kcal/kg) e digestível (3.126 kcal/kg) (Meurer et al., 2012). Ainda, tal ingrediente pode proporcionar a substituição parcial de fontes energéticas como carboidratos e o óleo de soja. A glicerina bruta também pode ser empregada na alimentação animal para melhorar a qualidade do pellet (Groesbeck et al., 2008) reduzindo o pó das rações, melhorar a palatabilidade das dietas devido ao seu sabor adocicado e diminuir o custo das rações.

Estudos substituindo lactose por glicerina na alimentação de leitões recém-desmamados confirmam que a glicerina, além de melhorar a durabilidade do pellet, eficiência e temperatura da peletizadora, pode ser adicionada nas dietas em níveis de até 5% sem prejudicar o desempenho dos animais (Christopher, 2009). Para leitões em fase de crescimento também foi verificada a possibilidade de inclusão da glicerina bruta até 9% (Berenchtein et al., 2010) ou 10% (Lammers et al., 2008) nas rações sem afetar o desempenho dos animais. Da mesma forma, estudos realizados com frangos de corte concluíram que a glicerina pode ser incorporada efetivamente nas rações em níveis de 5% (Sehu et al., 2012) e

6 a 8% (Abd-Elasamee et al., 2010) para esses animais sem comprometer o crescimento e características de carcaça.

Para peixes, os primeiros estudos que avaliaram a inclusão da glicerina bruta na alimentação também são satisfatórios. Li et al. (2010) avaliaram diferentes níveis de inclusão de glicerina para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e concluíram que a utilização de até 10% na dieta não causa efeitos adversos sobre o ganho de peso e o índice hepatossomático. Neu et al. (2012) testaram níveis de glicerina para alevinos de tilápia do Nilo e observaram que a inclusão de até 10% nas dietas em substituição ao milho não afetou o desempenho zootécnico dos animais. Recentemente, Gonçalves et al., (2015) concluíram que rações com até 12% de glicerina bruta não alteram o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo, sugerindo que a glicerina bruta pode ser um alimento facilmente utilizado em substituição ao milho das rações.

### **Metabolismo do glicerol**

O glicerol é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células. Pode ser derivado da hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue, da gordura dietética e da lipólise no tecido adiposo (Lin, 1977). Contudo, informações sobre as implicações metabólicas da suplementação exógena de glicerol na dieta são escassas, principalmente quando a suplementação atinge grandes proporções, como um ingrediente energético das rações (Romano, 2012).

Segundo Lin (1977), quando ingerido, o glicerol é rapidamente absorvido pelo intestino e mais lentamente pelo estômago e se distribui por todos os espaços intracelulares. O glicerol é transportado para dentro das células através de proteínas carreadoras, as aquaporinas, mais especificamente um subgrupo delas, as aquagliceroporinas, que fazem a difusão facilitada do glicerol pela membrana plasmática (Hara-Chikuma & Verkman, 2006).

Em condições lipogênicas, a insulina liga-se ao seu receptor, localizado na superfície de adipócitos, e converte a glicose para dentro da célula, que posteriormente é convertida a glicerol-3-fosfato. A insulina também ativa a lipoproteína lipase que remove as gorduras derivadas do intestino e do fígado e as transforma em ácidos graxos. Posteriormente, ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato são esterificados em triglicerídeos. Em contrapartida, em condições lipolíticas, as catecolaminas estimulam receptores localizados na superfície de adipócitos que translocam o hormônio sensível a lipase, que é a enzima principal para a hidrólise de triglicerídeos para ácidos graxos livres e glicerol, enquanto isso estímulos movem

a AQP7 para a membrana plasmática. Ácidos graxos livres e glicerol são liberados na corrente sanguínea e utilizados para termogênese e gliconeogênese, respectivamente (Hibuse et al., 2006).

A AQP9 é considerada a única entrada de glicerol no fígado e está localizada na membrana plasmática sinusoidal de frente para a veia porta (Elkjaer et al., 2000). O jejum aumenta os níveis de AQP9 no RNAm do fígado. O aumento do portal faz o glicerol fluir para o fígado, assim a AQP9 contribui para a entrada de glicerol nos hepatócitos (Hibuse et al., 2006).

Em mamíferos o fígado é responsável por 3/4 da capacidade total do corpo metabolizar o glicerol e o rim é responsável por 1/5 dessa capacidade de metabolização e também pela essencial reabsorção do glicerol, evitando excessos de perda na urina (Lin, 1977).

O destino metabólico do glicerol pode ser conduzido, dependendo do tecido e do estado nutricional do animal, para o fornecimento de esqueleto carbônico para a gliconeogênese, para a produção de energia pela via da glicólise ou como precursor para a síntese de triacilgliceróis.

Assim, o glicerol liberado a partir do catabolismo de triacilgliceróis pode ser convertido em glicose através da fosforilação em glicerol-3-fosfato, catalisada pela glicerol quinase, que em seguida pode seguir para a gliconeogênese no fígado (Mourot et al., 1994). Além disso, o glicerol-3-fosfato também é precursor na síntese de triacilgliceróis e de fosfolípidios (Brisson et al., 2001). Ainda, pode ser oxidado pela glicerol-fosfato-desidrogenase produzindo DHAP (diidroxiacetona-fosfato), um precursor para a formação de glicose através da gliconeogênese (Emmanuel et al., 1983). O glicerol-3-fosfato também pode seguir a via glicolítica, o ciclo de Krebs, para produzir ATP (adenosina trifosfato) (Rosebrough et al., 1980).

Por fim, conclui-se que estudos já realizados com a glicerina bruta indicam que este subproduto pode constituir uma boa fonte energética na formulação de rações para animais, porém, é necessário estar atento à composição deste subproduto e principalmente aos níveis máximos de utilização.



## Referências

- Abd-Elsamee, M.O., et al., 2010. Use of crude glycerin in broiler diets. *Egypty Poultry Science* 30, 281-295.
- Agência Natural do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), 2015. Biodiesel. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=73292&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1436576996311>. Acesso em 10 de junho de 2015.
- Barros, G. S. A. C.; Silva, A. P.; Ponchio, L. A., 2006. Custos de produção de biodiesel no Brasil. *Revista de Política Agrícola (Brasília)* 15 (3), 36-50.
- Berenchtein, B., et al., 2010. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39 (7), 1491-1496.
- Bombardelli, R.A; Hayashi, C.; Natali, M.R.M. et al., 2010. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39 (5), 941-949.
- Borghetti, N.R.B.; Ostrensky, A.; Borghetti, J.R., 2003. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 128p.
- Boscolo, W.R., Hayashi, C., Meurer, F. et al., 2002. Digestibilidade Aparente da Energia e Nutrientes de Alimentos Convencionais e Alternativos para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 31(2), 539-545.
- Brisson, D.; Vohl, M.C.; St-Pierre, J. et al., 2001. A neglected variable in metabolic processes? *Bioessays (Cambridge)* 23, 534-542.
- Christopher, S.M., 2009. Evaluation of the Nutritional Value of glycerol, a byproduct of biodiesel production, for swine. Master Animal Science- North Carolina State University, Raleigh., 54p.
- Dozier, W.A., Kerr, B.J., Corzo, M.T. et al., 2008. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. *Poultry Science* 87, 317-322.
- Elkjaer, M.L.; Vajda, Z.; Nejsum, L.N.; et al., 2000. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 276, 1118-1128.
- Emmanuel, B., Berzins, R. & Robblee, A.R., 1983. Rates of entry of alanine and glycerol and their contribution to glucose synthesis in fasted chickens. *British Poultry Science* 24, 565-571.
- Ferrão-Gonzales, A. D. et al. 2008. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. *Diálogos & Ciência (Salvador)* 7 (1), 65-78.
- Fontainhas-Fernandes A., et al., 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*): Digestibility and growth performance. *Aquaculture Intern.* 7, 57-67.
- Food and Agriculture Organization Of The United Nations – FAO, 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma: Subdivisión de Políticas y Apoyo en Materia de Publicación Electrónica. Rome, pp.193.
- Food and Agriculture Organization Of The United Nations - FAO., 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture - Opportunities and challenges. Roma. pp. 243.
- Food and Drug Administration (FDA), Code of Federal Regulations 6 (21), 2006.
- Freitas, L.W., 2012. Avaliação do uso de glicerina em dietas para frangos de corte nas fases pré-inicial e final. Dissertação de mestrado apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 92p.
- Furuya, W.M.; Sampaio, G.; Furuya, V.R.B., 2001a. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desempenho e digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30, 924-929.

Furuya, W.M.; Pezzato, L.E.; Pezzato, A.C., 2001b. Coeficientes de digestibilidade aparente e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia 30, 1143-1149.

Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para a Nutrição de tilápias. 1ª Ed. Toledo: GFM, pp.100.

Gomes, M.A.B., 2009. Parâmetros produtivos e reprodutivos de ovinos suplementados com glicerina da produção de biodiesel. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, pp. 81.

Gonçalves, V.L.C., Pinto, B., Musgueira, L.C. et al., 2006. Biogásolina: Produção de éteres e ésteres de glicerina. In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Brasília. Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica, pp. 14-19.

Gonçalves, G.S.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M., 2009. Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para tilápia do Nilo. Boletim do Instituto de Pesca 35, 201-213.

Gonçalves, L.U., et al., 2015. Crude glycerin as dietary energy source for Nile tilapia. Aquaculture 437, 230-234.

Groesbeck, C.N.; McKinney, L.J. Derouchey, J.M. et al., 2008. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. Journal of Animal Science (Champaign) 85, 2228-2236.

Guimarães, I.G; Pezzato, L.E.; Barros, M.M., 2008a. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. Journal of the World Aquaculture Society 39, 781-789.

Guimarães, I.G; Pezzato, L.E.; Barros, M.M. 2008b. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition 14, 396-404.

Hara-Chikuma, M.; Verkman, A.S., 2006. Physiology roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. Cellular and Molecular Life Science 63, 1386-1392.

Hayashi, C.; Soares, C.M.; Meurer, F., 2000. Uso de diferentes óleos vegetais em dietas para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*, L.), na fase inicial. In: Reunião da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 37, 2000, Viçosa. Anais...Viçosa, Sociedade Brasileira de Zootecnia,. CD ROM.

Hibuse, T.; Maeda, N.; Nagasawa, A., et al., 2006. Aquaporins and glycerol metabolism. Biochimica et Biophysica Acta 1758, 1004-1011.

Igdoura, S.A.; Wiebe, J.P., 1994. Suppression of spermatogenesis by low-level glycerol treatment. Journal of Andrology 15 (3), 234-243.

Izquierdo, M. S.; Fernández-Palacios, H.; Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition reproductive performance of fish. Aquaculture 197, 25-42.

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

Li, M.H.; Minchew, C.D.; Oberle, D.F. et al., 2010. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of World Aquaculture Society 41, 130-136.

Lin, E.C.C., 1977. Glycerol utilization and its regulation in mammals. Annual Review of Biochemistry (Palo Alto) 46, 765-795.

Maggioni, D.; Rotta, P.P.; Marquez, J.A. et al., 2008. Influência da proteína sobre a reprodução animal: uma revisão. Campo Dig. (Campo Mourão) 1 (2), 105-110.

Mataveli M., et al., 2007. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de Vitamina C. Bol Inst Pesca 33, 1-7.

Meurer, F.; Franzem, A.; Piovesan, P. et al., 2012. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Research* 43(11), 1734-1737.

Mourot, J. ; Aumaitre, A.; Mounier, A. et al., 1994. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. *Livestock Production Science* 38, 237-244.

Neu, D.H., Furuya, W.M., Boscolo, W.R. et al., 2012. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* (19), 211-217.

Ng, W.K.; Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* 314 (1), 122-131.

Nogueira, A. C.; Rodrigues, T., 2007. Criação de tilápias em tanques-rede. Salvador: Sebrae Bahia, 23 p.

Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M. et al., 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 31, 1595-1604.

Romano, G.G., 2012. Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina. Dissertação de mestrado apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, pp.79.

Rosebrough, R.W., Geis, E., James, P., et al., 1980. Effects of dietary energy substitutions on reproductive performance feed, efficiency and lipogenic enzyme activity on large white turkey hens. *Poultry Science*, 59, 1485-1492.

Sehu, A., et al., 2012. Effects of dietary glycerol addition on growth performance, carcass traits and fatty acid distribution in cloacal fat in broiler chickens. *Revue de Médecine Vétérinaire* 4, 194-200.

Sink, T.D.; Lochmann, R.T., 2008. Effects of dietary lipid source and concentration on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg and fry production, and egg and fry quality. *Aquaculture* 283, 68-75.

Swiatkiewicz, S.; Koreleski, J., 2009. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. *Poultry Science*, Champaign 88 (3), 615-619.

Tessaro, L. et al., 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on diferente digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture (Amsterdam)* 326-329, 74-80.

Thompson, J.C.; He, B.B., 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture* 22, 261-265.

Tyler, C.R.; Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fisheries* 6, 287-318.

Wiebe, J.P.; Barr, K.J., 1984. Suppression of spermatogenesis without inhibition of steroidogenesis by a 1,2,3-trihydroxypropane solution. *Life Science* 34 (18), 1747-1754.

Wiebe, J.P.; Barr, K.J.; Buckingham, K.D., 1989. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. *Contraception* 39 (4), 447-457.

## **Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo glicerina bruta**

### **Introdução**

A criação de tilápia vem se tornando um dos principais segmentos da aquicultura mundial, correspondendo ao segundo grupo de peixes de água doce mais cultivado no mundo, com produção global de cerca de 3,95 milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2014).

Para atender as elevadas taxas de crescimento da tilapicultura, é de fundamental importância o fornecimento contínuo de ovos, larvas e alevinos em quantidade e qualidade (Little et al., 1997). Neste sentido, a ênfase em estudos voltados à nutrição (Watanabe et al., 2002) e a alimentação de reprodutores (Hardy, 1999) são importantes, pois estes aspectos influenciam o sistema endócrino e, conseqüentemente no desempenho reprodutivo dos peixes (Watanabe & Vassalo-Agius, 2003), na fecundidade (Bromage, 1995; Tyler & Sumpter, 1996), na qualidade dos gametas, dos embriões e das larvas (Izquierdo et al., 2001).

Poucas são as informações disponíveis sobre a nutrição de reprodutores e matrizes de peixes (Bombardelliet al., 2009) e as existentes estão focadas nas fêmeas (El Sayed et al., 2005; Ng e Wang, 2011; Oliveira et al., 2014) e pouca atenção tem sido voltada para os machos. Apesar disso, sabe-se que as dietas interferem na qualidade do sêmen e dos espermatozoides, a exemplo de resultados experimentais que sugerem que o perfil de ácidos graxos das rações alteram a qualidade e a viabilidade dos espermatozoides de truta após a criopreservação (Putstowka et al., 2000). Contudo, quando se trata de reprodutores de tilápia, as informações sobre os efeitos da nutrição sobre a reprodução de machos são escassas ou quase inexistentes. Os poucos resultados sobre este tema sugerem que a suplementação de vitamina C nas dietas melhoram a qualidade dos espermatozoides (Mataveliet al., 2007) e, que os níveis de energia digestível das rações interferem na espermatogênese, onde rações contendo aproximadamente 3.450 kcal de ED.kg de ração<sup>-1</sup> garantem maiores concentrações espermáticas e maiores percentuais de espermatozoides sem alterações morfológicas (Bombardelli et al., 2010). Neste sentido, a busca por recursos alimentares que potencializem o crescimento e a reprodução é um desafio a ser superado pelos pesquisadores da nutrição animal.

A utilização de co-produtos ou subprodutos agroindustriais têm recebido atenção devido o seu potencial como alimento alternativo e de baixo custo. Assim, devido à recente

busca por fontes energéticas renováveis, a indústria do biodiesel tem se destacado (Ayoub e Abdullah, 2012) e muita atenção têm sido dada à glicerina bruta, que corresponde a 10% da produção do biodiesel (Swiatkiewicz e Koreleski, 2009). Esta glicerina possui potencial alimentar, pois o seu principal constituinte é o glicerol, o qual desempenha papel no metabolismo energético, especialmente nas vias glicolíticas e dos ácidos carboxílicos (Lin, 1977).

A glicerina bruta tem sido usada com sucesso em rações para suínos (Shields et al., 2011; Berenchtein et al., 2010) e aves (Kroupa et al., 2011). Para tilápias, a glicerina também apresenta potencial, pois apresenta energia digestível (ED) semelhante ao milho, correspondente a 3.126,5 kcal ED.kg<sup>-1</sup> (Meurer et al., 2012) ou 2.875,8 kcal ED.kg<sup>-1</sup> (Gonçalves et al., 2015). Pesquisas sugerem que a utilização de até 10% de glicerina bruta nas rações não afeta o crescimento do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Li et al., 2010) e dos alevinos de tilápia do Nilo (Neu et al., 2012). Recentemente, um estudo mostrou que rações com até 12% de glicerina bruta não alteram o desempenho dos juvenis de tilápia do Nilo (Gonçalves et al., 2015). Estes resultados sugerem que a glicerina bruta possa ser um alimento facilmente utilizado em substituição ao milho das rações.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da glicerina bruta nas rações de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o crescimento, características seminais e espermáticas, parâmetros sanguíneos e aspectos histológicos do tecido hepático e testicular.

## **Material e métodos**

### *Animais, instalações e delineamento experimental*

Foram utilizados 400 fêmeas ( $25,73 \pm 0,11$ g) e 200 machos ( $25 \pm 0,43$ g) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, com idade correspondente a primeira maturação. Fêmeas e machos foram alojados, separadamente, em 40 “hapas” de malha 1mm. Os “hapas” foram instalados em viveiro escavado revestido em alvenaria e com o fundo de terra. As fêmeas foram estocadas em 20 “hapas” de dimensões 3m x 2m, totalizando 20 fêmeas por “hapas”. Os machos foram estocados em 20 “hapas” de dimensões 2m x 1m, totalizando dez machos por “hapas”. Todos os reprodutores foram individualmente marcados por meio de marcas eletrônicas implantadas de forma subcutânea. As marcas apresentavam padrão ISO FDX-B 134,2 khz e camada externa antimigratória.

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por rações isoproteicas e isoenergéticas contendo 32% de proteína digestível (PD) e 3200 kcal de energia digestível (ED).kg de ração<sup>-1</sup> e, cinco níveis de inclusão do glicerol nas proporções de 0, 4, 8, 12, e 16%.

### *Rações experimentais, manejo alimentar e manejo reprodutivo*

Previamente a formulação das dietas, os ingredientes foram avaliados quanto a sua composição nutricional. A partir destas informações, as rações foram formuladas de modo a conter 32% PD e 3200 kcal ED.kg de ração<sup>-1</sup> (Tabela 1). Os valores de proteína e energia digestíveis foram calculados de acordo com Boscolo et al. (2002), Meurer et al. (2012) e Meurer et al. (2003). Para a elaboração das rações, os ingredientes foram triturados em moinho de martelo, utilizando-se peneira de 0,5mm (Meurer et al., 2005), misturados e em seguida submetidos ao processo de peletização (3mm de diâmetro).

Tabela 1 – Composição percentual dos alimentos e conteúdo de nutrientes das rações experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta, utilizadas na alimentação de matrizes e reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingredientes (%)	Glicerina bruta (%)				
	0	4	8	12	16
Farelo de soja <sup>1</sup>	62,58	63,53	64,48	65,43	66,37
Milho <sup>1</sup>	24,05	19,19	14,33	9,47	4,61
Farinha de peixe <sup>2</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja <sup>1</sup>	4,41	4,29	4,17	4,05	3,93
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	2,44	2,48	2,51	2,54	2,58
Antioxidante	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Glicerina bruta <sup>3</sup>	0,00	4,00	8,00	12,00	16,00
Supl. Mineral e Vitamínico <sup>4</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Nutrientes</b>					
Cálcio (%)	1,04	1,05	1,06	1,07	1,08
Metionina+Cistina (%)	1,01	1,00	1,00	0,99	0,99
Energia bruta (kcal. kg <sup>-1</sup> )	4250,26	4232,34	4214,41	4196,48	4178,56
Energia digestível (kcal.kg <sup>-1</sup> )	3200,00	3200,00	3200,00	3200,00	3200,00
Fibra bruta (%)	2,60	2,37	2,14	1,91	1,69
Fósforo total (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Gordura (%)	6,41	6,17	5,94	5,71	5,47
Proteína bruta (%)	35,70	35,72	35,74	35,76	35,78
Proteína digestível (%)	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00

<sup>1</sup>Valores de digestibilidade dos nutrientes determinados por Boscolo et al. (2002). <sup>2</sup>Valores de digestibilidade dos nutrientes determinados por Meurer et al. (2003). <sup>3</sup>Valores de digestibilidade dos nutrientes determinados por Meurer et al. (2012). <sup>4</sup>Suplemento vitamínico mineral, composição básica: ácido fólico: 200mg, ácido pantotênico: 4.000mg; Biotina: 40 mg; Cobre: 2.000mg; Ferro: 12.500mg; Iodo:200mg; Manganês: 7.500mg; Niacina: 5.000mg; Selênio:70mg; Vitamina A: 1.000.000UI; Vitamina B1: 1.900mg; Vitamina B12: 3.500mg; Vitamina B2: 2.000mg; Vitamina B6: 2.400mg; Vitamina C: 50.000mg; Vitamina D3: 500.000UI; Vitamina E: 20.000UI; Vitamina K3: 500mg; Zinco:25.000mg.

<sup>2</sup>Ácidopropiônico.

Durante 10 meses, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10:00h e 16:00h) (Siddiqui et al., 1998; El-Sayed et al., 2005) com uma taxa de alimentação de 1% da biomassa por dia (Bhujel, 2000), ajustada a cada 17 dias. Neste período, machos e fêmeas foram submetidos ao manejo reprodutivo, permanecendo isolados em descanso reprodutivo pelo período de 11 dias (adaptado Tacon et al., 1996; Bombardelli et al., 2009). Após este período os machos foram transferidos para os “hapas” das fêmeas para o acasalamento que teve a duração de cinco dias (adaptado de MacIntosh & Little, 1995; Bombardelli et al., 2009).

Ao término do período de acasalamento, as fêmeas foram submetidas aos procedimentos de verificação e coleta de ovos. Neste momento também foram mensurados o peso e o comprimento individual das fêmeas e dos machos, por meio de balança digital (Marte® AS2000) e ictiômetro de precisão 0,01g e 0,1cm, respectivamente. Em seguida, os

reprodutores foram novamente separados em seus respectivos “hapas”, para novo descanso reprodutivo. Este procedimento foi repetido durante todo o período experimental.

#### *Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água*

Nos viveiros escavados, a temperatura mínima e máxima da água foi mensurada diariamente (às 10h) por meio de termômetro de mercúrio de máxima e mínima ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). ( $28,22 \pm 2,06^\circ\text{C}$  e  $25,39 \pm 1,85^\circ\text{C}$ ). Quinzenalmente, foram mensurados às 6h os teores de oxigênio dissolvido ( $8,49 \pm 1,98 \text{mg.L}^{-1}$ ; Oxímetro YSI<sup>®</sup> 550A) e, às 6h o pH da água ( $8,81 \pm 0,48$ ) (pHmetro digital Tecnal<sup>®</sup> Tec 5).

#### *Parâmetros reprodutivos*

No mês de dezembro, cinco machos de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionados e sedados pela imersão em solução contendo 100 mg de hidróxido de benzocaína.L<sup>-1</sup>. Em seguida, os peixes foram submetidos à mensuração do peso e do comprimento corporal e à coleta de sêmen, para posterior avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos.

O sêmen foi coletado por meio de massagem abdominal aplicada no sentido céfalo-caudal dos reprodutores. As primeiras parcelas de sêmen liberado foram desprezadas para evitar a possível contaminação com urina, muco e fezes (Kharat et al., 2012). O volume total de sêmen liberado por cada macho foi mensurado em seringas de insulina de volume útil de 1,0 mL e precisão de 0,01 mL (Sanches et al., 2013). O pH seminal foi mensurado imediatamente após a coleta pelo método colorimétrico utilizando o papel de tornassol (Merck<sup>®</sup>) (Tessaro et al., 2012). Após a coleta, o sêmen foi mantido sob resfriamento ( $\pm 12^\circ\text{C}$ ) durante o período de tempo necessário para a realização das análises seminais e espermáticas (Kanuga et al., 2012).

As amostras de sêmen foram avaliadas quanto as variáveis espermáticas pelo plugin CASA em software livre (Adames et al., 2015), adaptado para a espécie (Valores de entrada do plugin CASA; a,=1 b,=30 c,=100 d,=8 e,=1 f,=10 g,=15 h,=3 i,=1 j,=25 k,=10 l,=15 m,=80 n,=80 o,=50 p,=60 q,=100 r,=943.3962; taxa de captura de 100fs; objetiva de aumento de 10X; uso de câmera de Neubauer). Foram avaliadas as taxas de motilidade dos espermatozoides e as velocidades curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VMD) e a velocidade em linha reta (VLR). As avaliações foram realizadas 15 segundos após o início da ativação espermática, utilizando-se 1 s de imagens em objetiva de aumento de 10X



(Adames et al., 2015). Devido a existência de uma alta correlação entre as velocidades espermáticas apresentadas pelo plugin CASA ( $r=0,92$ ;  $r=0,98$ ;  $r=0,96$ ), os resultados das três velocidades foram agrupados por meio da análise de componentes principais (PCA), gerando uma nova variável determinada velocidade espermática (Tessaro et al., 2012) representando 30,93% da VCL, 35,25% de VMD e 33,82% da VLR. Também foi mensurado o período de tempo em que os espermatozoides permaneceram em movimento (Adames et al., 2015). A ativação espermática foi realizada em tubos tipo Eppendorf (1,5mL), utilizando-se 1 $\mu$ L de sêmen e 800 $\mu$ L de solução ativadora (água destilada).

De cada reprodutor, uma amostra de 5 $\mu$ L de sêmen foi fixada em 5.000  $\mu$ L de formol salino tamponado para mensuração da concentração espermática e para mensuração do índice de espermatozoides com alterações morfológicas. A concentração espermática foi determinada por meio da contagem das células espermáticas em câmara hematimétrica de *Neubauer* (Wirtz e Steinmann, 2006). Em seguida foram calculadas a (1) fecundidade e a (2) fecundidade efetiva, conforme as equações:

$$(1) \text{ Fecundidade} = (\text{Volume}) \times (\text{Concentração});$$

$$(2) \text{ Fecundidade efetiva} = [(\text{Volume}) \times (\text{Concentração})] \times (\text{motilidade}), \text{ onde:}$$

Fecundidade = número de espermatozoides liberados pelo reprodutor;

Fecundidade efetiva = número de espermatozoides móveis liberados pelo reprodutor;

Volume = volume de sêmen liberado (mL);

Concentração = concentração espermática no sêmen liberado (espermatozoides.mL<sup>-1</sup>);

Motilidade = percentual de células espermáticas móveis.

As análises para determinação do índice de espermatozoides com alterações morfológicas foram realizadas, diluindo-se 40 $\mu$ L do sêmen previamente fixado em 2 $\mu$ L do corante rosa de bengala. Em seguida 20 $\mu$ L do sêmen já corado foram depositados sobre uma lâmina, que foi seca ao ar e coberta por uma lamínula para posterior análise em microscópio óptico em objetiva de 40X. Cerca de 300 espermatozoides foram contados e classificados como normais ou anormais (Rurangwa et al., 2004).

#### *Parâmetros de crescimento, parâmetros sanguíneos e índices corporais*

Após a avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos, os machos foram novamente submetidos ao processo de descanso reprodutivo, conforme descrito

anteriormente. No mês de janeiro, cinco reprodutores foram anestesiados pela imersão em solução contendo 100mg de hidróxido de benzocaína.L<sup>-1</sup> e submetidos à mensuração individual dos parâmetros de peso e comprimento padrão.

Quatro machos de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionados e submetidos à coleta de sangue por meio de punção da veia caudal, inserindo o bisel da agulha perpendicularmente a veia caudal, abaixo da linha lateral (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Foram coletados pelo menos 2mL de sangue de cada peixe. As amostras foram submetidas a centrifugação a 3.200 rpm por 10 minutos e processadas para a quantificação dos níveis de cálcio, triglicerídeos e glicose plasmáticos, pelo método enzimático-colorimétrico (Laborclin<sup>®</sup>) em espectrofotômetro (Bel Photonics<sup>®</sup> SF 325NM).

Em seguida, todos os machos foram submetidos à anestesia e à eutanásia, por meio da imersão em solução contendo 250 mg de hidróxido de benzocaína.L<sup>-1</sup> e pelo deslocamento da coluna cervical, respectivamente (Protocolo experimental n° 03212, aprovado pelo comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas-CEEAAP/Unioeste). Os reprodutores eutanasiados foram dissecados para a mensuração individual dos pesos do fígado, das gônadas e das vísceras. A partir destes dados foram avaliados os parâmetros: ganho de peso médio, conversão alimentar aparente, fator de condição, índice hepatossomático (Bombardelli et al., 2010), índice gonadossomático (Vazzoler, 1996) e índice viscerossomático (Ng& Wang 2011).

#### *Histologia dos testículos e dos fígados*

De cada tratamento foram separados aleatoriamente quatro fígados e quatro testículos para avaliação morfológica. Os órgãos foram fixados em solução de Bouin pelo período de 24 horas e, depois transferidos para solução de álcool 70%. Posteriormente, o material foi desidratado pela passagem em séries crescentes de álcool e incluído em resina histológica.

Dos testículos foram obtidos cortes transversais com 3µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas em *Permount*<sup>®</sup>, avaliadas e fotografadas em microscópio óptico (Olympus CX31) acoplado a uma câmera digital (Olympus SC30). Foram avaliadas as etapas de desenvolvimento testicular e as fases reprodutivas dos machos (Brow-Peterson et al., 2011).

As amostras dos fígados foram processadas, coradas e fotografadas da mesma forma que os testículos, contudo foram obtidos os cortes com 4µm de espessura. Para a avaliação do fígado foi utilizado um escore de vacuolização hepática adaptado de Caballero et al. (2004),

onde foram atribuídos valores de 0-3 para a presença de vacúolos. Foi considerado escore = 0 para ausência de vacúolos, escore = 1 para vacuolização reduzida; escore = 2 para vacuolização média e escore = 3 para vacuolização intensa. Também, foram mensuradas as áreas máxima, mínima e média de 200 hepatócitos de cada fígado. As avaliações morfométricas do tecido hepático foram realizadas por meio da captura de imagens em campos aleatórios, empregando-se aumento de 400X. Foi utilizado como local padrão para a captura das imagens, as áreas adjacentes às veias centro lobulares. As imagens foram analisadas pelo programa *ImagePro-plus*<sup>®</sup> (adaptado de Tessaro et al., 2012).

### *Análises estatísticas*

Os resultados de crescimento e reprodutivo, dos índices somáticos, dos parâmetros plasmáticos e da histologia testicular e hepática foram submetidos à regressão. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram checados. Índices dados em percentual foram transformados em arco seno da raiz quadrada. Os dados de velocidade (velocidade média de deslocamento, velocidade linear e velocidade curvilínea) foram submetidos a análises de componentes principais (PCA) e correlacionados entre si. Verificada a correlação, foi gerado um fator comum que foi submetido à análise de variância como os demais parâmetros. O software utilizado para realização dos procedimentos e análises estatísticas foi o Statistica 7.0<sup>®</sup>.

## Resultados

Os parâmetros físicos e químicos da água, não apresentaram variação entre as unidades experimentais ( $p>0,05$ ).

As rações contendo diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta influenciaram no processo reprodutivo dos machos, prejudicando a espermatogênese. O volume de sêmen liberado pelos machos e a fecundidade e a fecundidade efetiva apresentaram uma redução de forma diretamente proporcional ( $p<0,05$ ) ao incremento da glicerina bruta nas rações (Tabela 2). Os demais parâmetros seminais e espermáticos não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelas rações (Tabela 2).

A alimentação dos machos com rações contendo glicerina bruta promoveu a redução dos níveis de plasmáticas de glicose de forma diretamente proporcional ( $p<0,05$ ) ao aumento dos níveis de glicerina nas rações, variando de  $112,48\pm 47,66$  a  $72,52\pm 29,02$  (Tabela 3). Os níveis de cálcio e de triglicérides plasmáticos não foram influenciados pelas rações (Tabela 3).

O crescimento das tilápias também não foi influenciado ( $p>0,05$ ) pelas rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta (Tabela 4). O ganho de peso variou de  $167,97\pm 9,10$  a  $187,42\pm 6,86$  gramas e a sobrevivência dos machos foi de 100%. Embora a conversão alimentar não tenha sido alterada pelas rações, os seus valores foram elevados e variaram de  $1,91\pm 0,07$  a  $2,21\pm 0,25$ . O fator de condição permaneceu entre 0,0314 e 0,0337 (Tabela 4).

Dentre os índices corporais, apenas o índice hepatossomático apresentou um aumento diretamente proporcional ( $p<0,05$ ) ao incremento de glicerina bruta nas rações (Tabela 5), o qual variou de  $0,78\pm 0,06$  a  $0,86\pm 0,05$ . Os índices gonadossomático e viscerossomático não sofreram efeito ( $p>0,05$ ) das rações contendo glicerina bruta (Tabela 5).

A avaliação histológica das gônadas demonstrou a presença de cistos de diferenciação (espermatogônias, espermátocitos, espermátides e espermatozoides) em todos os tratamentos. Contudo, verificou-se a presença massiva de espermatozoides nos testículos das tilápias alimentadas com as rações contendo os menores níveis de inclusão de glicerina bruta e o contrário foi verificado nos tratamentos contendo os maiores níveis de inclusão (Figura 1).

As áreas máxima, mínima e média dos hepatócitos, assim como o score atribuído a vacuolização não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelas rações (Tabela 6). A morfologia do tecido hepático caracterizou-se pela presença de hepatócitos com formato irregular e núcleo

arredondado disposto na região central. Também foram visualizados capilares do tipo sinusóides permeando os hepatócitos, além de veias e artérias (Figura 2).

Tabela 2 – Parâmetros seminais e espermáticos em machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variável	Nível de inclusão do glicerol (%)					P
	0	4	8	12	16	
VS (mL) <sup>1</sup>	0,14±0,04	0,09±0,06	0,04±0,02	0,06±0,07	0,05±0,07	0,0322
pH	6,29±0,34	6,67±0,58	6,17±0,29	6,00±0,00	6,50±0,50	0,3073
TA (s)	111,93±16,67	104,40±5,22	111,56±8,83	121,25±10,11	119,38±14,36	0,3960
Mot (%)	80,00±0,05	69,00±0,21	77,00±0,02	77,00±0,17	78,00±0,05	0,8691
VE (um/s)	68,12±11,98	55,45±9,47	58,37±5,24	64,29±3,74	61,74±5,71	0,2608
VCL (um/s)	98,61±12,34	84,77±13,45	87,94±4,46	98,59±6,83	91,33±6,75	0,2034
VMD (um/s)	57,27±12,65	44,96±8,55	47,27±5,56	51,69±3,18	50,81±5,60	0,2817
VLR (um/s)	51,70±11,97	39,73±7,60	43,07±5,64	46,24±3,17	46,23±5,12	0,2880
Norm (%)	59,36±6,76	60,06±7,36	57,20±2,42	59,31±4,89	63,08±3,77	0,4003
CSPZ	3,37±2,01x10 <sup>9</sup>	3,30±3,66x10 <sup>9</sup>	2,99±2,23x10 <sup>9</sup>	1,12±0,26x10 <sup>9</sup>	1,82±1,74x10 <sup>9</sup>	0,4545
Fecundidade <sup>2</sup>	5,24±4,68x10 <sup>8</sup>	1,13±0,77x10 <sup>8</sup>	1,35±1,21x10 <sup>8</sup>	0,57±0,57x10 <sup>8</sup>	0,38±0,44x10 <sup>8</sup>	0,0028
Fecundidade efetiva <sup>3</sup>	4,20±3,87x10 <sup>8</sup>	0,77±0,54x10 <sup>8</sup>	1,07±0,97x10 <sup>8</sup>	0,47±0,47x10 <sup>8</sup>	0,30±0,37x10 <sup>8</sup>	0,0039

VS (mL) – volume de sêmen; pH – potencial hidrogeniônico do sêmen; TA (s) – tempo de ativação espermática; Mot (%) – motilidade espermática; VE (um/s) – velocidade espermática; VCL (um/s) – velocidade espermática curvilínea; VMD (um/s) – velocidade espermática média de deslocamento; VLR (um/s) – velocidade espermática em linha reta; Norm (%) – normalidade espermática; CSPZ – concentração espermática; Fecundidade (número de espermatozoides); Fecundidade efetiva (número de espermatozoides móveis) <sup>1</sup>  $y = 0,1171 - 0,0051x$ ,  $r^2 = 0,2424$ ; <sup>2</sup>  $y = 12,7273 - 0,0004x$ ,  $r^2 = 0,3987$ ; <sup>3</sup>  $y = 12,526 - 0,0005x$ ,  $r^2 = 0,3786$ .

Tabela 3 – Parâmetros plasmáticos em machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis	Nível de inclusão do glicerol (%)					p
	0	4	8	12	16	
Glicose <sup>1</sup> (mg/dL)	112,48±47,66	103,88±23,37	102,80±26,27	78,71±28,50	72,52±29,02	0,0432
Cálcio (mg/dL)	8,40±1,69	8,28±2,81	10,05±4,32	6,47±2,54	6,47±1,25	0,3466
Triglicérides (mg/dL)	161,74±37,00	157,36±75,60	134,94±51,22	158,49±49,34	134,98±117,40	0,9664

<sup>1</sup>  $y = 115,1692 - 2,632x$ ,  $r^2 = 0,2193$ .

Tabela 4 – Parâmetros de desempenho zootécnico de machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis	Nível de inclusão do glicerol (%)					p
	0	4	8	12	16	
	Machos					
PMI (g)	25,67±0,44	25,53±0,10	25,81±0,15	25,79±0,18	25,83±0,29	0,4728
PMF (g)	196,13±5,34	180,46±19,33	190,03±8,80	179,39±11,04	184,14±10,56	0,2883
GP (g)	170,46±5,47	154,93±19,25	164,22±8,69	153,60±11,21	158,31±10,72	0,2913
CA	2,21±0,25	2,15±0,40	2,14±0,28	1,91±0,07	2,03±0,23	0,5459
SOB (%)	100,00±0	100,00±0	100,00±0	100,00±0	100,00±0	---
FC	86,03±9,87	82,35±4,93	91,38±17,22	76,17±12,18	101,83±31,31	0,3436

PMI (g) – peso médio inicial; PMF (g) – peso médio final; GP (g) – ganho de peso; CA – conversão alimentar; SOB (%) – sobrevivência; FC – fator de condição.

Tabela 5 – Índices corporais de machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta

Variáveis (%)	Nível de inclusão do glicerol (%)					p
	0	4	8	12	16	
Índice gonadossomático	0,64±0,33	0,59±0,18	0,66±0,27	0,69±0,20	0,54±0,10	0,9227
Índice hepatossomático <sup>1</sup>	0,78±0,06	0,82±0,02	0,84±0,11	0,88±0,04	0,86±0,05	0,0381
Índice viscerossomático	5,98±2,17	5,64±2,39	6,36±1,48	5,64±1,05	5,48±1,05	0,9442

<sup>1</sup> $y = 0,089 + 0,0003x$ ,  $r^2 = 0,2291$ .

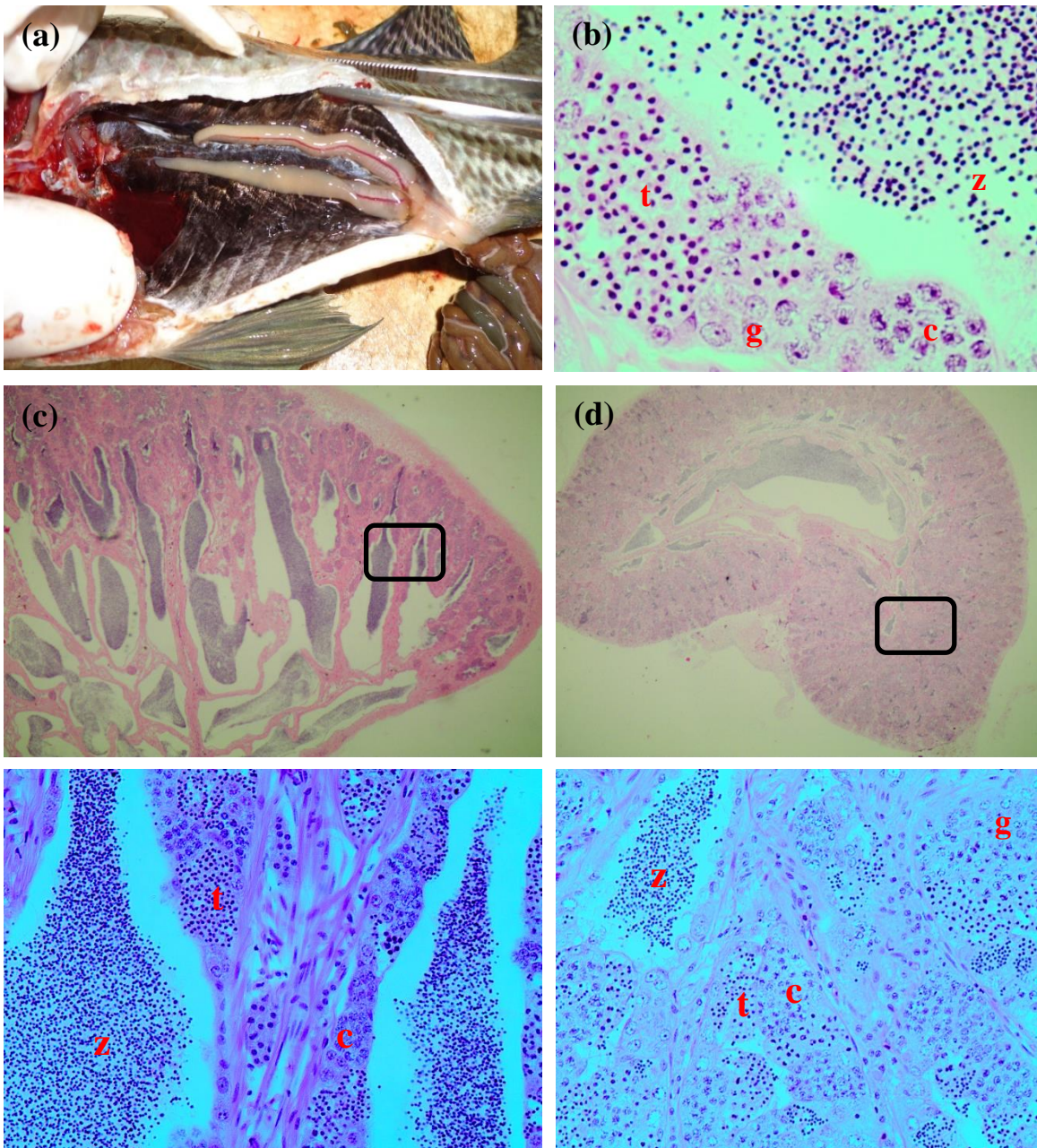
Tabela 6 – Área e grau de vacuolização de hepatócitos de machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis	Nível de inclusão do glicerol (%)					p
	0	4	8	12	16	
AM ( $\mu\text{m}^2$ )	218,76±64,76	211,19±71,78	243,02±37,75	149,78±41,03	205,15±97,76	0,42
MnA ( $\mu\text{m}^2$ )	126,23±85,32	123,97±88,55	168,65±38,96	64,06±75,44	120,76±96,19	0,69
MxA ( $\mu\text{m}^2$ )	307,82±83,49	302,87±105,58	359,1±20,09	227,79±49,03	279,61±142,58	0,38
GV*	1 (100%)	0(25%),1(25%), 2(50%)	0 (50%), 1(25%) 2(25%)	0 (25%), 1(25%) 2(50%)	0 (50%), 1(25%) 2(25%)	-

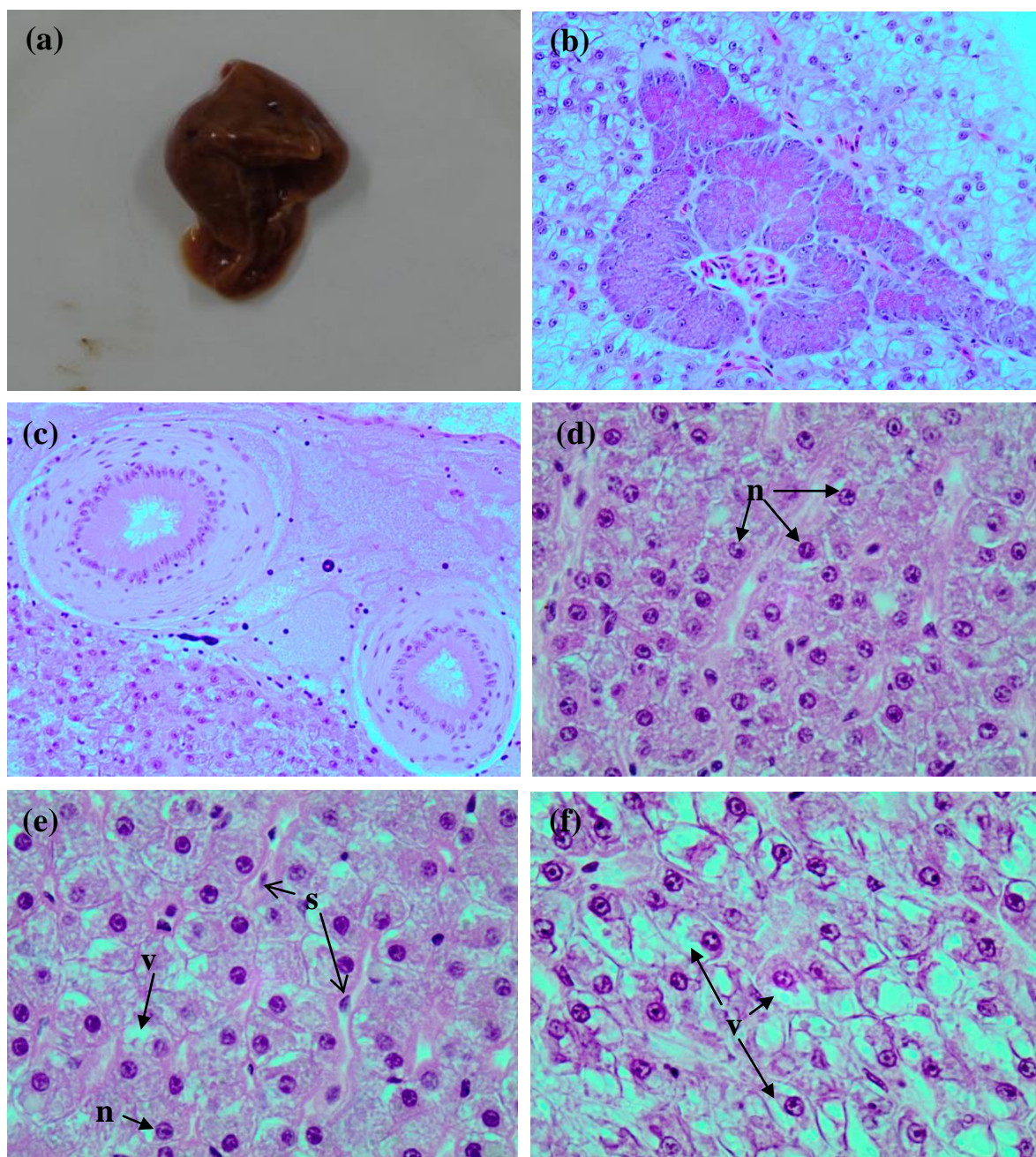
Média e desvio-padrão. AM – área média; MnA – área mínima; MxA – área máxima; GV – grau de vacuolização.

\*0 = não observado; 1 = reduzido; 2 = intermediário; 3 = intenso.





**Fig. 1.** Tecido gonadal de machos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo glicerol (H.E.). (a) aspecto macroscópico do testículo maduro; (b) cistos contendo células em diferenciação (100x) (g = espermatogônias, c = espermatócitos, t = espermatídes, z = espermatozoides); (c) corte testicular tratamento 0% glicerol (4x); (d) corte testicular tratamento 16% glicerol (4x); (e) corte testicular tratamento 0% glicerol (40x), reparar grande quantidade de espermatozoides; (f) corte testicular tratamento 16% glicerol (40x), reparar diferentes cistos em diferenciação.



**Fig. 2.** Tecido hepático (H.E.), (a) fígado utilizado para análise histológica; (b) hepatopâncreas envolto por hepatócitos (40x); (c) artérias envoltas por hepatócitos (40x); (d) aspecto padrão de hepatócitos da espécie (score de vacuolização = 0 → 100x), (n=núcleos); (e) pouca vacuolização (score de vacuolização = 1 → 100x), s= capillares sinusóides, v= vacúolo; (f) vacuolização intermediária (score de vacuolização = 2 → 100x), v= vacúolo.

## Discussão

As temperaturas máxima e mínima da água estiveram dentro da faixa recomendada como ideal para reprodutores de tilápia (Bhujel, 2000). Os níveis de oxigênio dissolvido estiveram em concentrações consideradas adequadas para o desempenho reprodutivo de fêmeas de tilápia (Bhujel, 2000), porém não existem estudos que comprovam se para machos os valores são correspondente ao das fêmeas (Bombardelli et al., 2010). Para o pH a faixa apropriada para reprodutores ainda não está definida, porém, esteve dentro da indicada para a produção de peixes (Kubitza, 1999).

A glicerina bruta interferiu de alguma forma a espermatogênese, diminuindo o volume de sêmen, a fecundidade e fecundidade efetiva dos reprodutores. De acordo com Igdoura e Wiebe (1994), o principal problema pode ser a inibição da síntese de lactato nas células de Sertoli, principal substrato para a espermatogênese ou ainda os efeitos hiperosmóticos do glicerol e da degeneração das junções entre as células de Sertoli. Ainda, segundo Wiebe et al. (2000) os efeitos negativos da injeção de glicerol em ratos são evidentes já 24h após a aplicação, provocando alterações no citoesqueleto das células de Sertoli, nas proteínas F-actina e ocludina, nas junções celulares, aumentando a permeabilidade na barreira hematotesticular.

Apesar das informações sobre peixes serem escassas, em analogia ao modelo aceito para mamíferos, a barreira hematotesticular interconecta as células de Sertoli por meio de junções de oclusão contínuas, separando cada túbulo seminífero em dois compartimentos funcionais distintos, o basal e o adluminal. No compartimento basal estão situadas as espermatogônias e no adluminal as células em sucessiva diferenciação espermatogênica. Neste caso, esta barreira fornece um microambiente para a diferenciação espermatogênica e protege as células germinativas em estágio avançado de desenvolvimento de agentes nocivos ou de células do sistema imune (Junqueira e Carneiro, 2013). Assim, possivelmente o glicerol proveniente das rações pode ter aumentado a permeabilidade na barreira hematotesticular, provocando desorganização celular, acarretando em danos na espermatogênese.

Os efeitos negativos do glicerol também foram verificados em mamíferos submetidos a tratamento por meio de injeção intratesticular ou via oral de solução contendo glicerol a 10%. Estes tratamentos suprimiram a espermatogênese em ratos (Wiebe e Bar, 1984; Igdoura e Wiebe, 1994) e macacos (Wiebe et al., 1989). Os danos causados à espermatogênese podem ter relação com inibição da atividade das mitocôndrias de espermatogônias e espermátides devido a ação da enzima glicerol-3fosfato desidrogenase (Weitzel et al., 2003), as quais

apresentam importância para os espermatozoides de mamíferos, pois são responsáveis pela produção de ATP (Peña et al., 2009).

Na histologia testicular, a presença dos diferentes cistos em diferenciação em todos os tratamentos demonstra que os machos estavam maduros e aptos a espermição. No entanto, foram visíveis os efeitos negativos da glicerina bruta presente nas rações sobre a espermatogênese. As informações referentes à influência da glicerina bruta sobre epitélio germinativo de peixes são escassas. Trabalhos com mamíferos relataram a forte redução do epitélio germinativo em ratos tratados com glicerol (Igdoura e Wiebe, 1994), enquanto que a glicerina bruta não alterou a altura do epitélio germinativo de ovinos (Gomes, 2009).

Os resultados de índice gonadossomático corroboram os resultados histológicos dos testículos e dos níveis plasmáticos de testosterona e, sustentam a hipótese de que todos os animais estavam no mesmo estágio de maturação gonadal. É segura esta afirmação, pois, este índice é utilizado para monitorar a progressão da gametogênese em peixes (Barcellos et al., 2001) e está relacionado ao pico de maturação gonadal (Barcellos et al., 2002), onde o aumento do testículo é atribuído à proliferação do epitélio germinativo (Schultz et al., 2010).

O glicerol proveniente das rações contendo glicerina bruta, também pode interferir na glicemia dos peixes, pois serve como um intermediário metabólico da gliconeogênese (Lin, 1977), influenciando de forma direta sobre o metabolismo energético e conseqüentemente no crescimento de peixes (Gonçalves et al., 2015). Em vertebrados, a glicose é um importante combustível metabólico e vários mecanismos atuam para assegurar o fornecimento constante para os tecidos glicose-dependentes, onde o glicogênio hepático se destaca como reserva de glicose (Thrall et al., 2015).

A redução dos níveis plasmáticos de glicose foi verificada em juvenis de tilápia do Nilo quando alimentados com rações contendo glicerina bruta (Moesch, 2014). O mesmo comportamento glicêmico foi verificado nos reprodutores de tilapia e, pode estar relacionado com o conteúdo de carboidrato da dieta (Thrall et al., 2015), pois o incremento de glicerina nas rações levou à redução dos níveis de milho e conseqüentemente das quantidade de amido. Além disso, provavelmente o déficit de amido pode ter levado os animais a sintetizarem glicose a partir do glicerol dietético, por meio da gliconeogênese hepática (Nelson e Cox, 2011) e conseqüentemente aumentando a demanda energética.

O índice hepatossomático é um parâmetro importante para avaliar indiretamente a condição hepática e seu metabolismo, além de sugerir as condições de reserva de glicogênio. O índice hepatossomático dos reprodutores de tilápia aumentou de forma diretamente proporcional à inclusão do glicerol nas rações. O mesmo também foi verificado em juvenis de

*Ictalurus punctatus* alimentados com rações contendo 15 e 20% de glicerina bruta (Li et al., 2010). As evidências com ratos sugerem que o efeito do glicerol dietético sobre o aumento do índice hepatossomático pode estar relacionado com o aumento da atividade de enzimas lipogênicas nos hepatócitos (Lin, 1977). Apesar dos objetivos desta pesquisa não contemplarem a avaliação destas enzimas, a avaliação dos parâmetros histológicos do tecido hepático sugerem que não houve relação das rações e o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos. Mesmo assim, atenção deve ser dada ao acúmulo de gordura nos hepatócitos, pois vários autores têm relatado a ocorrência de vacuolização nos hepatócitos e, até quadros clínicos de esteatose em função das dietas (Bombardelli et al., 2010; Bolla et al., 2011; Tessaro et al., 2012). A médio e/ou a longo prazo, estas alterações hepáticas podem levar a perdas reprodutivas e até mesmo a morte.

Apesar da relação direta entre a concentração espermática e a fecundidade e, a redução numérica da quantidade de espermatozoides por mililitro, possivelmente a variação individual entre os machos pode ter levado a não constatação de efeito das rações sobre a concentração espermática. Aparentemente, o glicerol dietético não exerceu influência nos processos finais da espermatogênese relacionados especificamente com a formação da cauda dos espermatozoides e com a capacitação espermática (Schultz et al., 2010), pois os parâmetros envolvidos com a movimentação espermática, como o pH seminal, motilidade, tempo de ativação, velocidade e normalidade espermática também não foram influenciados pelas rações.

A concentração plasmática de triglicerídeos está relacionada à sua capacidade de armazenamento, à condição nutricional e ao estado glicêmico, à sua mobilização a partir dos diferentes tecidos e à sua utilização como fonte de energia. Tendo em vista que este parâmetro não foi alterado nos reprodutores, pode-se sugerir que o glicerol proveniente das rações contendo glicerina bruta serviu como uma adequada fonte de energia, conseqüentemente não alterando a lipólise nos adipócitos (Costa et al., 2015).

Além disso, tendo em vista a relação direta entre os níveis plasmáticos de cálcio e os teores de proteína plasmáticas (Thrall et al., 2015), pode-se sugerir que as rações não influenciaram o estado de saúde dos reprodutores de tilápia (Gonçalves et al., 2015).

Era esperado que as rações não influenciassem o crescimento dos reprodutores (Bombardelli et al., 2010), pois pesquisas anteriores concluíram que a inclusão de até 10% de glicerina bruta nas rações não interferem no crescimento de juvenis de tilápia (Neu et al., 2012). Li et al. (2010) também verificaram que o uso de glicerol bruto na dieta de juvenis de *Ictalurus punctatus* não afeta o crescimento. Além disso, o fato dos animais estarem em

intensa atividade reprodutiva, justifica os elevados valores de conversão alimentar aparente (1,91 a 2,21 g.g<sup>-1</sup>) dos reprodutores de tilápia (Bombardelli et al., 2010).

A gordura visceral que expressa a relação entre o peso das vísceras e o peso total dos peixes, não foi alterado pelas rações contendo glicerina bruta indicando que a glicerina foi rapidamente metabolizada e não se acumulou nas vísceras.

**Conclusão**

Conclui-se que a glicerina bruta não prejudica o crescimento, no entanto, em qualquer nível de inclusão prejudica o processo de espermatogênese e causa danos à reprodução em machos de tilápia do Nilo.

## Referências

- Adames, M.S., et al., 2015. Optimization of the sperm: Oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science* 161, 119-128.
- Asturiano, J.F., et al., 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA – enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* 194, 173-190.
- Ayoub M., Abdullah A. Z., 2012. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 2671-2686.
- Barcellos, L.J.G., et al., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen*, a South American catfish. *Aquaculture Research* 32 (2), 121-123.
- Barcellos, L.J.G., et al., 2002. Plasma steroid 442 concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia 443 quelen*. *Journal of Fish Biology* 61, 751-763.
- Berenchtein, B. et al., 2010. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39 (7), 1491-1496.
- Bhujel, R. C., 2000. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture* 181, 37-59.
- Bolla, S., Nicolaisen, O., Amin, A., 2011. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. *Aquaculture* 312, 117-125.
- Bombardelli, R.A., et al., 2009. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38 (8), 1391-1399.
- Bombardelli, R.A., et al., 2010. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39 (5), 941-949.
- Boscolo, W.R.; Hayashi, C.; Meurer, F., 2002. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 13, (2), 539-545.
- Bromage, N., 1995. Broodstock management and seed quality - general considerations. In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. London: Blackwell Science Ltda., p.1-25.
- Brown-Peterson, N., et al., 2011. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science* 3, 52–70.
- Caballero, M.J., et al., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long- term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27, 531-541.
- Costa, D. V., et al., 2015. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed glycerol. *Pesquisa Agropecuária Brasil* 50 (5), 347-354.
- El-sayed, A.M., Mansour, C.R., Ezzat, A.A., 2005. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture* 248, 187-196.



Food and Agriculture Organization Of The United Nations - FAO., 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture - Opportunities and challenges. Roma. pp. 243.

Gomes, M.A.B., 2009. Parâmetros produtivos e reprodutivos de ovinos suplementados com glicerina da produção de biodiesel. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, pp. 81.

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

Hardy, R.W., 1999. Collaborative opportunities between fish nutrition and other disciplines in aquaculture: an overview. *Aquaculture* 177, 217-230.

Igdoura, S.A., Wiebe, J.P., 1994. Suppression of spermatogenesis by low-level glycerol treatment. *Journal of Andrology* 15 (3), 234-243.

Izquierdo, M.S.; Fernandez-Palacios, H.; Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.

Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., 2013. *Histologia Básica: texto e atlas*. 12ª edição - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 538p.

Kanuga, M.K., et al., 2012. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology* 77, 916-925.

Khara, H., et al., 2012. The effect of cations on sperm motility performance and fertilizing ability of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Acta Veterinaria (Beograd)* 62 (5-6), 599-609.

Kroupa, L., et al., 2011. Glycerol as source of energy in broiler chicken fattening. *Acta Vet. Brno* 80, 157-164.

Kubitza, F., 1999. *Nutrição e alimentação de tilápia: Parte 1. Panorama da Aquicultura*, v. 02, n.52, pp. 42-50.

Li, M.H., et al., 2010. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of World Aquaculture Society* 41, 130-136.

Lin, E.C.C., 1977. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annual Review of Biochemistry (Palo Alto)* 46, 765-795.

Little, D.C.; Turner, W.A.; Bhujel, R.C., 1997. Commercialization of a hatchery process to produce MT-treated Nile tilapia in Thailand. In: *Simpósio Centroamericano de Acuicultura* 4, 1997, Honduras. Anais... Honduras: Sociedade Centro Americana de Acuicultura, 108-118.

Macintosh, D.J., Little, D.C., 1995. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Ed) *Broodstock management and egg and larval quality*. London: Blackwell Science Ltd, 277-320.

Mataveli M., et al., 2007. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de Vitamina C. *Bol Inst Pesca* 33, 1-7.

Meurer, F., Hayashi, C., Boscolo, W.R., 2003. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 32 (6), 1801-1809.

Meurer, F., et al., 2005. Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. *Acta Scientiarum* 27 (1), 81-85.

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

Moesch, A., 2014. Glicerol bruto, derivado da produção do biodiesel, em rações peletizadas para diferentes fases de tilápia do Nilo. Dissertação de mestrado apresentada ao

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Paraná, Palotina, 112p.

Nelson, D.L., Cox, M.M., 2011. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ª edição – Porto Alegre: Artmed, 1273p.

Neu, D.H., et al., 2012. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 19, 211-217.

Ng, W.K.; Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* 314 (1), 122-131.

Oliveira, M.M., et al., 2014. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. *Animal Reproduction Science* 150 (1-2), 62-69.

Peña, F.J., et al., 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 345-349.

Putstowka, C., et al., 2000. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Research* 31, 297-305.

Rurangwa, E., et al., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.

Sanches, E.A., et al., 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 1114-1122.

Shields M.C., et al., 2011. Evaluation of the nutritional value of glycerol for nursery pigs. *J Anim Sci* 89, 2145-2153.

Schultz, R. W., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* (San Diego) 165 (3), 390-411.

Siddiqui, A.Q., Al-Hafedh, Y.S.; Ali, S.A. 1998. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) 29, 349-358.

Swiatkiewicz, S., Koreleski, J., 2009. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. *Poultry Science*, Champaign 88 (3), 615-619.

Tacon, P., et al., 1996. Relationships between the expression of maternal behavior and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 146, 261-275.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. *Hematologia dos peixes teleósteos*, 2004. Ribeirão Preto: FMRP-USP, 144.

Tessaro, L., et al., 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture* 326, 74-80.

Thrall, M.A., et al., 2015. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Ed. Guanabara Koogan, 2ª ed., Rio de Janeiro, 688p.

Tyler, C.R.; Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287-318.

Vazzoler, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 169p.

Watanabe, W.O. et al., 2002. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science* 10 (3), 465-498.

Watanabe, T.; Vassalo-Agius, R., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture* 227, 35-61.

Weitzel, J. M., et al., 2003. Testis - specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in haploid male germ cells. *Biology of Reproduction* 68, 699-707.

Wiebe, J.P., Barr, K.J., 1984. Suppression of spermatogenesis without inhibition of steroidogenesis by a 1,2,3-trihydroxypropane solution. *Life Science* 34 (18), 1747-1754.

Wiebe, J.P., Barr, K.J., Buckingham, K.D., 1989. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. *Contraception* 39 (4), 447-457.

Wiebe, J.P., et al., 2000. Glycerol disrupts tight Junction associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in sertoli cells. *Journal of Andrology* 21 (5), 625-635.

Wirtz S.; Steinmann P., 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *J Fish Biol* 68, 1896-1902.