

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EDER JOSÉ DE OLIVEIRA

Machos de *Rhamdia quelen* alimentados com dieta contendo glicerina bruta
apresentam melhora na qualidade seminal e alterações bioquímicas no
sangue

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
2019

EDER JOSÉ DE OLIVEIRA

Machos de *Rhamdia quelen* alimentados com dieta contendo glicerina bruta apresentam melhora na qualidade seminal e alterações bioquímicas no sangue

Dissertação apresentada ao Programa e Pós-Graduação Stricto Sensu em Zootecnia Níveis de mestrado e doutorado, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática
do Sistema de Bibliotecas da Unioeste

Oliveira , Eder José

Machos de (*Rhamdia quelen*) alimentados com dieta contendo glicerina bruta apresentam melhora na qualidade seminal e alterações bioquímicas no sangue / Eder José Oliveira ; orientador(a), Robie Allan Bombardelli, 2018.
37 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Aquicultura. 2. Reprodutores. 3. Glicerina bruta. I. Bombardelli, Robie Allan. II. Título.

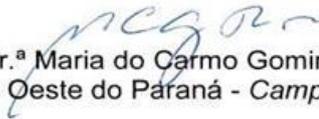
EDER JOSÉ DE OLIVEIRA

Machos de *Rhamdia quelen* alimentados com dietas contendo glicerina bruta apresentam melhora na qualidade seminal e alterações bioquímicas no sangue

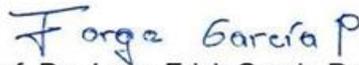
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, Área de Concentração "Produção e Nutrição Animal", Linha de Pesquisa "Aqüicultura", APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:



Orientador(a) – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo (UNIOESTE)



Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Gominho Rosa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* de Toledo (UNIOESTE)



Prof. Dr. Jorge Erick Garcia Parra
Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* de Laranjeiras do Sul (UFFS)

Marechal Cândido Rondon, 3 de agosto de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Sebastião de Oliveira e Leonir Lourdes de Oliveira.

Meus irmãos

Alan C. de Oliveira e Mateus de Oliveira,

pelo carinho e incentivo para

a realização do mestrado!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que cada dia que passa, tenho um objetivo e um sonho na vida.

A toda minha família, pai, mãe e irmãos, pelo amor, motivação e espera por esse importante momento da minha vida.

Ao meu orientador, Robie Allan Bombardelli, pela oportunidade da realização do mestrado e orientações no decorrer do período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade e conhecimento adquirido durando o mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o período do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro (Processo CNPq nº 484262/2013-0) no desenvolvimento desta pesquisa.

À Dr^a Marta Margarete Cestari e toda equipe do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental pela colaboração na realização das análises de integridade do DNA – Teste Cometa.

Aos amigos e colegas: Bruna, Samara, Juliano, Cristian, Giovano, Antonio, Thiago e Ricacio que de alguma forma contrinuíram no decorrer deste mestrado.

Enfim, a todas as pessoas que passaram e foram importantes na minha vida até aqui. A luta continua, seguimos a batalhar!

Muito obrigado.

MACHOS DE *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO GLICERINA BRUTA APRESENTAM MELHORA NA QUALIDADE SEMINAL E ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NO SANGUE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da glicerina bruta nas rações de reprodutores de jundiá (*Rhamdia quelen*) sobre o crescimento, características seminais e espermáticas, parâmetros sanguíneos e composição centesimal de tecidos. 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 30 % de proteína digestível (PD) e 3.000 kcal de energia digestível (ED).kg⁻¹ de ração e cinco níveis de inclusão de glicerina bruta nas proporções de 0, 4, 8, 12 e 16 %. Após 12 meses do início do experimento, foram avaliados os parâmetros reprodutivos dos machos e a integridade do DNA de espermatozoides pelo método ensaio cometa. Oito machos de cada unidade experimental foram submetidos à coleta de sangue para quantificação dos níveis plasmáticos de cálcio, triglicerídeos, glicose, proteínas totais, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e colesterol total. Também foi avaliada a integridade do DNA de eritrócitos. Em seguida, todos os machos foram submetidos à eutanásia para dissecação e mensuração individual dos pesos do fígado, gônadas e vísceras para avaliação dos parâmetros zootécnicos e avaliação da composição centesimal de órgão e tecidos. Houve aumento ($p < 0,05$) na concentração de espermatozoides nos animais alimentados com rações contendo o maior nível de glicerina bruta. Os demais parâmetros seminais e espermáticos não foram alterados ($p > 0,05$). Dentre os parâmetros sanguíneos, o colesterol total e a proteína total apresentaram maiores ($p < 0,05$) valores em animais alimentados com rações contendo 8 % de glicerina bruta, enquanto que o cálcio diminuiu ($p < 0,05$) nos animais alimentados com 16 %. O desempenho zootécnico não foi alterado ($p > 0,05$). A matéria seca e cinzas do músculo e a proteína bruta nos testículos aumentaram ($p < 0,05$) nos animais alimentados com rações contendo as maiores inclusões de glicerina, enquanto que os teores de proteína bruta do músculo diminuíram ($p < 0,05$). Conclui-se que reprodutores de jundiá alimentados com rações contendo maior nível de inclusão de glicerina bruta apresentaram alterações metabólicas que levaram ao aumento da deposição de proteína nos testículos e ao aumento da concentração espermática, e que as rações não apresentaram efeito negativo sobre a saúde dos animais.

Palavras-chave: cálcio plasmático; CASA; criopreservação; espermatozoides; espermatogênese; fragmentação de DNA; proteína plasmática.

**MALES OF *Rhamdia quelen* FED WITH DIET CONTAINING CRUDE
GLYCERIN PRESENT IMPROVEMENT IN SEMINAL QUALITY AND
BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN THE BLOOD**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the inclusion of crude glycerin on the diet of jundia (*Rhamdia quelen*) on growth, seminal and spermatogenic characteristics, blood parameters and tissue composition. The animals were distributed in completely randomized experimental design, consisting of five treatments and four replications. The treatments consisted of isoproteic and isoenergetic rations containing 30 % of digestible protein (PD) and 3.000 kcal of digestible energy (ED).kg⁻¹ of ration and five levels of inclusion of crude glycerin in the proportions of 0, 4, 8, 12 and 16 %. 12 months after the beginning of the experiment, the reproductive parameters of the males were evaluated, as well as the integrity of the sperm DNA by the comet assay method. Eight males from each experimental unit were submitted to blood collection for quantification of levels of calcium, triglycerides, plasma glucose, total proteins, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total cholesterol erythrocyte DNA integrity. Afterwards, all males were submitted to euthanasia for dissection and individual measurement of weights of the liver, gonads and viscera to evaluate the zootechnical, somatic parameters and analysis of organ and tissue centesimal composition. There was an increase ($p < 0,05$) in the concentration of spermatozoa in the animals fed the rations containing the highest level of crude glycerin. The other seminal and sperm parameters were not influenced. Among the blood parameters, levels of total cholesterol, total protein and calcium were influenced ($p < 0,05$), total cholesterol and total protein presented higher values with 8 % inclusion of crude glycerin in the diet, whereas calcium decreased with 16 % inclusion of crude glycerin. Zootechnical performance was not influenced. In the evaluation of centesimal composition, there was influence ($p < 0,05$) on muscle dry matter, muscle ashes and crude protein of the muscle, viscera and gonads. Dry matter and muscle ashes, gross protein of the viscera and gonads increased the concentrations with the addition of crude glycerin in the rations, whereas the crude protein concentration of the muscle decreased with the presence of crude glycerin in the diets. Therefore, it is recommended to use this by-product as a substitute for maize in the diet of jundia breeders, since it does not present negative effects and still benefits their reproductive performance.

Key words: plasma calcium; CASA; cryopreservation; spermatozoa; spermatogenesis; DNA fragmentation; plasma protein.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição percentual dos alimentos das rações experimentais com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta para reprodutores de jundiá (*R. quelen*).
..... 22
- Tabela 2** – Parâmetros seminais e espermáticos no sêmen fresco de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta..... 27
- Tabela 3** – Parâmetros seminais e espermáticos no sêmen criopreservado de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.
..... 27
- Tabela 4** - Parâmetros sanguíneos de machos de jundiá (*R. quelen*), alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta. 28
- Tabela 5** – Parâmetros de crescimento e índices corporais de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta..... 29
- Tabela 6** – Composição centesimal de diferentes órgãos/tecidos de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta..... 29

SUMÁRIO

Revisão Bibliográfica	11
Visão geral da aquicultura atual	11
Reprodução x nutrição.....	12
Glicerina bruta	13
Metabolismo da glicerina	15
Referências	16
1. Introdução.....	20
2. Materias e Métodos	21
2.2. Processamento da ração e manejo produtivo.....	22
2.3. Parâmetros de qualidade de água.....	23
2.4. Características seminais e espermáticas do sêmen fresco	23
2.5. Criopreservação do sêmen e análise espermática do sêmen descongelado.....	24
2.6. Avaliação dos índices zootécnicos, índices corporais, parâmetros sanguíneos e composição centesimal de tecidos corporais	25
2.7. Análise de integridade de DNA, eritrócitos e espermatozoides	26
2.8. Análises estatísticas	27
3. Resultados.....	27
4. Discussão	29
5. Conclusão	31
Referências	32

Revisão Bibliográfica

Visão geral da aquicultura atual

A demanda global de pescado vem aumentando consideravelmente a cada ano. Em 2016 a produção mundial, incluindo pesca e aquicultura, foi de 170,9 milhões de toneladas. As perspectivas são de crescimento de 17 % até o ano 2025, chegando a uma produção de 196 milhões de toneladas, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018). Dentre esse montante, a produção de pescados oriundos da aquicultura foi de 80,031 milhões de toneladas (FAO, 2018). A produção brasileira vem crescendo ano a ano, chegando a 691.700 toneladas em 2017 (PEIXE BR, 2018).

O Brasil se destaca no cenário futuro da produção aquícola, pois possui a maior quantidade de água doce com potencial para aquicultura continental no mundo. Embora possua a maior biodiversidade ictiofauna mundial, a piscicultura cresce principalmente pela criação de espécies exóticas, em especial as carpas e tilápias (Borghetti et al., 2003).

As espécies nativas brasileiras são muito importantes para a piscicultura. Segundo Andrade e Yasui (2003), o Brasil conta com mais de 50 espécies de peixes, entre exóticas e nativas, que são reproduzidas e cultivadas. No entanto, nos últimos anos, produtores piscícolas nacionais atentaram-se, e houve interesse para o cultivo de espécies nativas de siluriformes e algumas espécies carnívoras como as piraíbas, jundiás, pintados surubins e pirarucus. Este grande interesse veio, juntamente, com as características apresentadas por estas espécies, como a carne branca, ausência de espinhos intramusculares, aliadas a um porte avantajado, e de sabor agradável. Estas características fazem estas espécies despertarem grandes interesses, apesar de que a sua limitação produtiva, até o momento, é o pacote tecnológico de reprodução das espécies (Andrade; Yasui, 2003).

Levando em conta o alto custo que a alimentação representa, sendo a maior parcela das despesas de produção na piscicultura, existem obstáculos que dificultam sua expansão, como a dependência de matéria prima para fabricação de rações pouco abundante, ou que sobrecarregam o custo de produção. Assim, a cada dia, surge a necessidade de avaliar fontes alternativas àquelas convencionalmente utilizadas.

Reprodução x nutrição

Grande parte dos nutrientes ofertados na dieta de reprodutores e matrizes são direcionados para o desenvolvimento das gônadas, espermatozoides, ovócitos e processo de ovulação, o que torna fundamental que a nutrição destes animais seja adequada (Mewes, 2015). Todas as espécies de peixes, no período reprodutivo, sofrem influência de fatores externos, necessitando assim, de uma apropriada fonte de alimentação para sua sobrevivência e desenvolvimento reprodutivo (Navarro et al., 2010).

Os reprodutores têm necessidade de suplementação com nutrientes de alta qualidade, principalmente no início do desenvolvimento gonadal e no período da vitelogênese (Izquierdo et al., 2001). Segundo Navarro et al. (2010), sinais de retardamento no desenvolvimento gonadal, baixa eclodibilidade, diminuição na fertilização e baixa motilidade espermática são fatos que evidenciam a importância da nutrição no desenvolvimento reprodutivo.

Estudos já demonstraram a relação de aspectos reprodutivos com a nutrição. Fontaínhas-Fernandes et al. (1999) elucidaram a relação da nutrição com a vitelogênese, interferindo nos níveis de vitelogenina. Além disso, os níveis nutricionais impostos na dieta também alteram a qualidade das proles (Ng; Romano, 2013). Para a espécie de peixe jundiá (*Rhandia quelen*), estudos têm mostrado que a nutrição reflete no desenvolvimento gonadal, na qualidade dos gametas e na prole (Parra et al., 2008; Diemer et al., 2014).

No entanto, para machos de peixes, as informações são escassas. Segundo Tessaro et al. (2012a), dieta contendo 30 % de proteína digestível e 2.850 kcal de energia digestível.kg de ração, não alteram os parâmetros reprodutivos de machos de jundiá. Diemer et al. (2014) testaram a inclusão de diferentes níveis de lisina (1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 %) na ração, para machos de jundiá e concluíram que sua inclusão na dieta aumenta o ganho de peso e o volume seminal. Sendo assim, devem-se ampliar os estudos que visam a melhoria dos gametas masculinos, já que estes contribuem para o sucesso reprodutivo e irão garantir o fornecimento de ovos, larvas e juvenis de qualidade.

Grande parte dos custos que envolve a produção de peixes é da alimentação, pois depende do fornecimento de ração com altos teores proteicos que, quando comparados à outras espécies de animais, são maiores, o que torna a atividade ainda mais onerosa. Porém, quando tratamos de nutrição das matrizes e reprodutores, esse contexto muda, pois a ração pode influenciar de forma direta na qualidade e quantidade de proles produzidas e, também,

o montante de ração utilizada é menor, comparado com a engorda de peixes. Levando esses fatores em consideração, a ração é considerada como investimento que se paga com a qualidade das proles produzidas.

Glicerina bruta

A glicerina é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel, esse 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 é um processo de reação química dos triglicerídeos (óleos ou gorduras) com o álcool (etanol ou metanol), estimulada por um catalisador (NaOH ou KOH). A produção de biodiesel gera um montante de cerca de 10 % de glicerina bruta, ou seja, a cada 1.000 kg de óleo utilizado na produção de biodiesel, são produzidos de 90 a 110 kg de glicerina (Swiatkiewicz; Koreleski, 2009). Segundo Thompson e He (2006), com a crescente procura e consequente aumento da 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, demonstraram 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.

A glicerina é uma substância química versátil. Possui uma combinação única de propriedades físicas e químicas que são utilizadas em vários produtos, como em cosméticos, produtos alimentícios, medicamentos e cuidados pessoais (Bonnardeaux, 2006). Além disso, também já é considerada como um alimento seguro para a alimentação animal (FDA, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento verificou o potencial da glicerina bruta na alimentação animal, e autorizou em 2010 o uso como insumo para a alimentação, exigindo um padrão de qualidade: no mínimo 80 % de glicerol, no máximo 150 ppm 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 tem um importante papel no metabolismo, pois é um componente estrutural importante de triglicerídeos e fosfolípidios, além de fornecer energia nas vias glicolíticas e ácidos carboxílicos (Lin, 1977).

Nos últimos anos, vários resíduos da agroindústria estão sendo testados na alimentação animal (FAO, 2012). Atualmente, o montante total de glicerina bruta tem sido proporcional a sua demanda, no entanto com a intensificação da produção de biodiesel, futuramente a glicerina bruta pode possuir maior oferta que demanda. Logo, as suas diversas formas de uso podem evitar um problema ambiental (descarte da glicerina bruta) no futuro. Estudos que avaliaram 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 têm sido animadores.

A glicerina bruta se apresenta como um ingrediente com grande potencial para jundiá, pois apresenta coeficientes de digestibilidade da energia de 89 % e alto valor de energia bruta (3.743 kcal/kg) e digestível (3.332 kcal/kg) (Balén et al., 2014). 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 nas rações para melhorar as características físicas, como a melhor qualidade do pellet, promover a redução do pó (Groesbeck et al., 2008) e ainda, melhorar a palatabilidade das dietas devido ao seu sabor adocicado e diminuir o custo das rações (Mewes et al., 2016).

A utilização da glicerina bruta começou a ser testada, e os primeiros estudos que avaliaram sua inclusão na alimentação também são satisfatórios. Pesquisas verificaram que uma única injeção intratesticular de uma solução de glicerol a 10 %, ou via oral, suprimiu a espermatogênese em ratos (Wiebe; Bar, 1984; Igdoura; Wiebe, 1994) e em macacos (Wiebe et al., 1989). Para cordeiros, a inclusão nas dietas visando substituir o milho, demonstrou que este ingrediente parece reduzir a capacidade fecundante dos reprodutores (Gomes, 2009).

Para peixes a glicerina bruta já foi testada em algumas espécies. A inclusão de diferentes níveis para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) não causa efeitos adversos sobre o ganho de peso e o índice hepatossomático, com a utilização de até 10 % na dieta (Li et al., 2010). Neu et al. (2013) testaram níveis de glicerina bruta para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e observaram que a inclusão de até 10 % nas dietas em substituição ao milho não afetou o desempenho zootécnico dos animais. Gonçalves et al. (2009) concluíram que rações com até 12 % da glicercina não alteram o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo.

Por outro lado, para reprodutores de tilápia do Nilo, Mewes et al. (2016) concluíram que a inclusão da glicerina bruta nas rações não afeta o crescimento ou a saúde dos peixes,

contudo, prejudica o desempenho reprodutivo, diminuindo o volume seminal e a fecundidade.

Portanto, é evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este tema, também, para outras espécies, 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.

Metabolismo da glicerina

O glicerol está presente no metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células (Mewes et al., 2016). O glicerol pode ter origem na hidrólise de triglicerídeos das lipoproteínas do sangue, na gordura dietética e também na lipólise de tecido adiposo (Lin, 1977).

No que diz respeito às informações sobre os efeitos metabólicos da suplementação de glicerol em dietas, principalmente quando suplementados em grandes quantidades como um ingrediente energético nas rações, as informações ainda estão muito limitadas ou ainda não existem para algumas espécies (Romano, 2012).

De acordo com Lin (1977) o glicerol tem uma lenta absorção no estômago e mais rápida pelo intestino, para posteriormente se distribuir entre os espaços intracelulares. Após a absorção do glicerol, ele pode ser convertido a glicose pelo fígado (Krebs; Notton; Hems, 1966) e rins (Krebs; Lund, 1996), para a glicose então fornecer energia para o metabolismo das células (Romano, 2012). O transporte do glicerol para dentro das células é realizado por proteínas carreadoras, as aquaporinas (AQP), um subgrupo delas, as aquaporinas 3, 7 e 9, chamadas de aquagliceroporinas que fazem o transporte de água, glicerol, uréia e pequenos solutos pela membrana plasmática das células (Hara-Chikuma; Verkman, 2006; Roudier et al., 1998).

Após a absorção do glicerol ele pode ser convertido para a forma de glicose (Emmanuel; Berzin; Robblee, 1983). Quando o organismo se encontra em condições lipogênicas, um receptor que está localizado na superfície dos adipócitos recebe a ligação com a insulina, fazendo a conversão da glicose para dentro da célula, que em seguida é convertida a glicerol-3-fosfato (Robergs; Griffin, 1998). A insulina é responsável pela ativação da lipoproteína lipase, esta faz a remoção das gorduras do intestino e do fígado e faz a transformação delas em ácidos graxos. Após isso, ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato são esterificados em triglicerídeos. Porém, em condições lipolíticas, as catecolaminas

incentivam receptores que estão localizados na região superficial dos adipócitos que translocam o hormônio sensível a lipase, a qual é a principal enzima para a ocorrência de hidrólise de triglicerídeos para ácidos graxos livres e glicerol. No mesmo momento, são liberados na corrente sanguínea ácidos graxos livres e glicerol e utilizados para termogênese e gliconeogênese, respectivamente (Hibuse et al., 2006).

O glicerol pode ter o destino, dependendo do tecido e do estado nutricional do animal. Diante da condição ele pode ser destinado ao fornecimento de esqueleto carbônico para a gliconeogênese, a produção de energia pela via da glicólise ou mesmo como precursor para síntese de triacilgliceróis (Lin, 1977). O glicerol liberado pelo catabolismo de triacilgliceróis pode sofrer a fosforilação em glicerol-3-fosfato e ser convertida em glicose, e ainda catalisada pela glicerol quinase, após pode seguir para a gliconeogênese no fígado (Mourot et al., 1994). O glicerol-3-fostato também é precursor na síntese de triacilgliceróis e de fosfolípidios (Brisson et al., 2001), pode ser oxidado pela glicerol-fosfatodesidrogenase e produzir diidroxiacetona-fosfato, a qual é precursor para a formação de glicose pela ação da gliconeogênese (Emmanuel et al., 1983). Outra rota que o glicerol-3-fosfato pode seguir é a via glicolítica, o ciclo de Krebs, para produção de ATP (adenosina trifosfato) (Rosebrough et al., 1980).

Referências

- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, 2003. p. 166 – 172.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. ANUÁRIO PEIXEBR DA PISCICULTURA. São Paulo: PeixeBR, 2018.
- BALEN, R. E.; TETU, P. N.; BOMBARDELLI, R. A. et al. Digestible energy of crude glycerol for pacu and silver catfish. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1448 - 1451, 2014.
- BARROS, G. S. A. C.; SILVA, A. P.; PONCHIO, L. A., 2006. Custos de produção de biodiesel no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 15, n. 3, p. 36 - 50, 2006.
- BONNARDEAUX, J. Glycerin overview. Department of agriculture and food, Western, 2006. Disponível em: <http://159.207.224.130/content/SUST/biofuel/GLYCERINOVERVIEW.pdf>>. Acesso em: 20 junho 2018.
- BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, p. 128, 2003.
- BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J. et al. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 534 - 542, 2001.

- DIEMER, O., BITTENCOURT, F., BARCELLOS, L. G., et al. Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. **Aquaculture**, v. 434, p. 93 - 99, 2014.
- ELKJÆR, M. L.; VAJDA, Z.; NEJSUM, L. N. et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, n. 3, p. 1118 - 1128, 2000.
- EMMANUEL, B.; BERZINS, R.; ROBBLEE, A. R. Rates of entry of alanine and glycerol and their contribution to glucose synthesis in fasted chickens. **British poultry science**, v. 24, n. 4, p. 565 - 571, 1983.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - **Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture, contributing to food security and nutrition for all.** 2018 Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>>
- FERRÃO-GONZALES, A. D.; SANTANA, F. C. P.; VÉRAS, I. C. et al. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. **Diálogos & Ciência**, v. 7, n. 1, p. 65 - 78, 2008.
- FONTAINHAS-FERNANDES, A.; GOMES, E.; REIS-HENRIQUES, M. A. et al. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. **Aquaculture International**, v. 7, n. 1, p. 57 - 67, 1999.
- 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 Drug Administration (FDA), Code of Federal Regulations, v. 6, p. 21, 2006.
- 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, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. et al. Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do Nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n.2, p. 201 - 213, 2009.
- GROESBECK, C. N.; MCKINNEY, L. J.; DEROUCHÉY, J. M. et al. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance 12. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2228 - 2236, 2008.
- HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A. S. Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 12, p. 1386 - 1392, 2006.
- HIBUSE, T.; MAEDA, N.; NAGASAWA, A. et al. Aquaporins and glycerol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 1004 - 1011, 2006.
- IGDOURA, S. A.; WIEBE, J. P. Suppression of spermatogenesis by low-level glycerol treatment. **Journal of Andrology** v. 15, n. 3, p. 234 - 243, 1994.
- IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1 - 4, p. 25 - 42, 2001.
- KREBS, H. A.; LUND, Patricia. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 210, 1966.
- KREBS, H. A.; NOTTON, B. M.; HEMS, R. Gluconeogenesis in mouse-liver slices. **Biochemical Journal**, v. 101, n. 3, p. 607, 1966.

- LI, M. H.; MINCHEW, C. D.; OBERLE, D. F. et al. Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 1, p. 130 - 136, 2010.
- LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual review of biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 765 - 795, 1977.
- MEWES, J. K., 2015. **Danos reprodutivos causados pela alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo glicerina bruta**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, pp. 43.
- MEWES, J. K.; MEURER, F.; TESSARO, L. et al. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. **Aquaculture**, v. 465, p. 164 - 171, 2016.
- MOUROT, J.; AUMAITRE, A.; MOUNIER, A. 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**, v. 38, p. 237 - 244, 1994.
- NAVARRO, R. D.; NAVARRO, F. K. S. P.; SEIXAS FILHO, J. et al. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. **Revista Augustus**, v. 30, n. 30, p. 108 - 118, 2010.
- NEU, D. H., FURUYA, W. M., BOSCOLO, W. R. et al. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 211 - 217, 2013.
- NG, W. K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 4, p. 220 - 254, 2013.
- PARRA, J. E. G.; RADÜNZ NETO, J.; VEIVERBERG, C. A. et al. Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2011 - 2017, 2008.
- ROBERGS, R. A.; GRIFFIN, S. E. Glycerol. **Sports Medicine**, v. 26, n. 3, p. 145 - 167, 1998.
- ROMANO, G. G. **Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ROSEBROUGH, R. W.; GEIS, E.; JAMES, P. et al. Effects of dietary energy substitutions on reproductive performance, feed efficiency, and lipogenic enzyme activity on large white turkey hens. **Poultry Science**, v. 59, n. 7, p. 1485 - 1492, 1980.
- ROUDIER, N.; VERBAVATZ, J. M.; MAUREL, C. et al. Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8407 - 8412, 1998.
- SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, v. 88, n. 3, p. 615 - 619, 2009.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. **Aquaculture**, v. 326, p. 74 - 80, 2012a.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261 - 265, 2006.
- WIEBE, J. P.; BARR, K. J., 1984. Suppression of spermatogenesis without inhibition of steroidogenesis by a 1,2,3-trihydroxypropane solution. **Life Science**, v. 34, n. 18, p. 1747 - 1754, 1984.

WIEBE, J. P.; BARR, K. J.; BUCKINGHAM, K. D. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. **Contraception**, v. 39, n. 4, p. 447 – 457, 1989.

Machos de *Rhamdia quelen* alimentados com dieta contendo glicerina bruta apresentam melhora na qualidade seminal e alterações bioquímicas no sangue

1. Introdução

O *Rhamdia quelen* é um peixe teleósteo da família Pimelodidae, popularmente conhecida como “jundiá”. Este peixe é endêmico da América do Sul e comumente encontrado desde o Sul do México a até a Argentina Central (Baldisserotto, 2004). É uma espécie onívora, com boa taxa de crescimento (Gomes et al., 2000; Braun et al., 2006), com alta taxa de fecundidade e fertilidade (Adames et al., 2015), além de boa aceitação de sua carne pelos consumidores (Baldisserotto, 2009). Estes peixes têm relevância para a aquicultura sulamericana, especialmente para as produções aquícolas de climas temperados e subtropicais (Barcellos et al., 2001) em sistemas de criação em viveiros escavados (Carneiro, 2004) e tanques rede (Reidel et al., 2010; Diemer et al., 2014).

Como a aquicultura mundial está em amplo crescimento (FAO, 2018) e a produção de peixes de água doce representa o maior grupo de organismos aquáticos produzidos (FAO, 2018), o setor produtivo precisa encontrar estratégias para garantir o fornecimento de proles em quantidade e qualidade. Neste sentido, como a nutrição dos reprodutores tem relação direta com a qualidade dos gametas (Bombardelli et al., 2010) e com a qualidade das proles (Wing-Keong; Romano, 2013), muitas pesquisas têm sido direcionadas para a determinação das exigências nutricionais (Tessaro et al., 2012a; Bombardelli et al., 2017), para a avaliação de alimentos potenciais (Parra et al., 2008; Mewes et al., 2016) e novas formulações que atendam às necessidades de fêmeas e machos em atividade reprodutiva.

Apesar de a maioria das pesquisas terem sido realizadas com fêmeas (Parra et al., 2008; Coldebella et al., 2011; Tessaro et al., 2012b), nos últimos anos muita atenção tem sido dada às pesquisas relacionadas com a nutrição dos machos (Bombardelli et al., 2010; Mewes et al., 2016). A exemplo disso, Tessaro et al. (2012a) estudaram a exigência de energia digestível para machos de *R. quelen*, enquanto que Diemer et al. (2014) verificaram que a suplementação de lisina melhorou o ganho de peso e aumentou o volume seminal nesta espécie. Apesar da escassez de informações, sabe-se que a avaliação dos alimentos com potencial para uso em dietas de reprodutores também é uma lacuna existente nesta área, pois muitos alimentos utilizados em rações para crescimento podem apresentar fatores nutricionais deletérios à reprodução. Um exemplo disso é a substituição da farinha de peixe

por farelo de soja em rações para fêmeas de tilápia do Nilo (Fontainhas-Fernandes et al., 1999) ou a inclusão de farelo de algodão em rações para machos de tilápia do Nilo (Salaro et al., 1999), os quais prejudicam a gametogênese e a reprodução.

Alimentos provenientes de subprodutos ou coprodutos da agroindústria têm sido foco de intensa pesquisa na nutrição animal (Mewes et al., 2016; Costa et al., 2017), devido ao valor nutricional, à possibilidade de proporcionar um destino para resíduos poluentes (Costa, 2008) e evitar a competição pelo uso de alimentos de alto valor nutricional de uso na alimentação humana (Klinger et al., 2015). Neste sentido, a glicerina bruta apresenta grande potencial, pois é um subproduto da indústria de biodiesel (Chi et al., 2007) de elevado valor nutricional. A sua inclusão em rações para frango de corte pode ser feita em até 5 % (Kroupa et al., 2011) e para suínos em até 10 % (Berenchtein et al., 2010; Shields et al., 2011), sem prejuízos ao crescimento ou à qualidade da carcaça.

Por outro lado, para peixes, a glicerina apresenta uma ótima perspectiva de uso, pois apresenta coeficientes de digestibilidade da energia bruta de 89 %. Isso corresponde a valores de energia digestível semelhantes ao milho, variando entre 2.875 kcal ED kg⁻¹ (Gonçalves et al., 2015) a 3126,5 kcal ED kg⁻¹ (Meurer et al., 2012), dependendo da fonte de glicerina. A inclusão de 10 % de glicerina bruta em rações para os juvenis bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Li et al., 2010) e para a tilápia do Nilo (Neu et al., 2013) não prejudicaram o crescimento dos peixes. Contudo, elevados níveis de inclusão de glicerina bruta em substituição ao milho podem levar à redução das concentrações de amido e dificultar a flutuabilidade das rações extrusadas (Balén et al., 2017).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da glicerina bruta nas rações para machos de jundiá (*R. quelen*) sobre o crescimento, as características seminais e espermáticas, alguns parâmetros sanguíneos e sobre composição centesimal de tecidos.

2. Materias e Métodos

2.1. Delineamento experimental

Foram utilizados 150 machos e 225 fêmeas de jundiá, os quais foram alojados em quinze viveiros escavados revestidos com alvenaria, com área de 16 m². Os peixes foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo natural, com renovação da água dos viveiros apenas para compensar a água evaporada e infiltrada. Os reprodutores foram

individualmente marcados por meio de marcas eletrônicas (ISO FDX-B 134,2 khz; antimigratória) implantadas de forma subcutânea.

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos por rações isoprotéicas e isoenergéticas, contendo 0, 4, 8, 12 e 16 % de inclusão de glicerina bruta. Foi considerada como uma unidade experimental um viveiro contendo quinze fêmeas e dez machos.

2.2. Processamento da ração e manejo produtivo

As rações experimentais foram formuladas de modo a conter 30 % de proteína digestível (Coldebella et al., 2011) e 3.000 kcal de energia digestível (ED).kg⁻¹ de ração (Tessaro et al., 2012a) (Tabela 1). Previamente a formulação das rações, os ingredientes foram avaliados quanto à composição centesimal. Os valores de proteína e energia digestíveis das rações foram calculados com base nos coeficientes de digestibilidade da energia da glicerina bruta determinados por Meurer et al., (2012) e para os demais alimentos determinados por Oliveira Filho e Fracalossi (2006).

Tabela 1 – Composição percentual dos alimentos das rações experimentais com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta para reprodutores de jundiá (*R. quelen*).

Ingredientes (%)	Níveis de glicerina bruta (%)				
	0	4	8	12	16
Farelo de soja	62,58	63,53	64,48	65,43	66,37
Milho	24,05	19,19	14,33	9,47	4,61
Farinha de peixe	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja	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
Supl. Mineral e Vitamínico ¹	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Glicerina bruta	0,00	4,00	8,00	12,00	16,00

¹ Suplemento vitamínico mineral, composição básica: ácido fólico: 200 mg; ácido pantotênico: 4.000 mg; biotina: 40 mg; cobre: 2.000 mg; ferro: 12.500 mg; iodo: 200 mg; manganês: 7.500 mg; niacina: 5.000 mg; selênio: 70 mg; vitamina A: 1.000.000 UI; vitamina B1: 1.900 mg; vitamina B12: 3.500 mg; vitamina B2: 2.000 mg; vitamina B6: 2.400 mg; vitamina C: 50.000 mg; vitamina D3: 500.000 UI; vitamina E: 20.000 UI; vitamina K3: 500 mg; zinco: 25.000 mg.

² Ácido propiônico.

Os alimentos utilizados na fabricação das rações foram triturados em moíno de martelo com peneira de 0,5 mm, misturados e peletizados (3 mm de diâmetro) conforme Meurer et al. (2005) e Bombardelli et al. (2010). Os peixes foram alimentados duas vezes ao

dia, às 10 e 17 horas (h), com uma taxa de arraçoamento de 2 % da biomassa. A quantidade de ração fornecida foi corrigida quinzenalmente (Tessaro et al., 2012b) por meio de biometrias, onde foram mensurados o peso e o comprimento corporal dos peixes.

2.3. Parâmetros de qualidade de água

Diariamente foi mensurada a temperatura da água (mínima $15,12 \pm 1$ °C; máxima $25,33 \pm 1,8$ °C) a partir de um termômetro de mercúrio com precisão de ± 1 °C e a transparência da água ($32,25 \pm 8,52$ cm), por meio da leitura direta com disco de “Secchi”, às 10 h.

Semanalmente, foram mensurados os teores de oxigênio dissolvido ($6,39 \pm 1,02$ mg L⁻¹; às 6 h; Oxímetro YSI® 550A), a turbidez da água ($59,85 \pm 32,12$ NTU; às 6 h; Turbidímetro PoliControl AP2000) e o pH ($6,47 \pm 0,52$ e $7,71 \pm 0,82$; às 6 e 16 h, respectivamente; pHmetro digital Tecnal® Tec 5).

Quinzenalmente, foram mensurados os teores de nitrogênio amoniacal ($1,98 \pm 0,21$ mg L⁻¹) pelo método da reação com o azul de Indofenol (Kopoleff, 1976), nitrito ($0,08 \pm 0,04$ mg L⁻¹) pelo método descrito por Strickland e Parsons (1972), nitrato ($0,17 \pm 0,03$ mg L⁻¹) por meio da redução do nitrito em cádmio (Mackereth et al., 1978), fósforo total ($6,02 \pm 0,15$ mg L⁻¹) segundo Mackereth et al. (1978) e alcalinidade total ($48,35 \pm 3,65$ mg de CaCO₃ L⁻¹) mensurada pelo método de Gran, segundo Carmouze (1994).

2.4. Características seminais e espermáticas do sêmen fresco

Durante a estação reprodutiva, no mês de dezembro, todos os machos de cada unidade experimental foram transferidos para aquários de fibra de vidro de 500 L, instalados em sistema de recirculação com filtros biológico e mecânico, aquecimento elétrico ($24 \pm 1,0$ °C) e esterilização por U.V. Após o alojamento nos aquários, os machos receberam um dose única de 3,0 mg de extrato bruto de pituitária de carpa (EPC)/kg, aplicada por meio de injeção intramuscular na região dorsal (Bombardelli et al., 2006). Após um período de 10 h (água a 24 °C), contadas a partir da aplicação hormonal (Sanches et al., 2010), foi realizada a coleta individual do sêmen por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal (Sanches et al., 2011). Previamente à manipulação, os peixes foram anestesiados pela imersão em solução contendo 75 mg de benzocaína/L de água. As primeiras parcelas de sêmen foram desprezadas para evitar a possível contaminação com urina ou fezes.

Imediatamente após a coleta, as amostras de sêmen foram mantidas sob resfriamento (± 12 °C) durante o período necessário para a realização das análises seminais e espermáticas, conforme descrito por Goes et al., (2016). Foram mensurados o volume de sêmen liberado, a concentração espermática, a taxa de motilidade e as velocidades espermáticas, o tempo de ativação espermática e o índice de integridade do DNA espermático.

O volume de sêmen liberado foi mensurado por meio da coleta diretamente em tubos de ensaio graduado ($\pm 0,1$ mL). A concentração espermática foi mensurada pela contagem das células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer (Mylonas et al., 1997; Wirtz; Steinmann, 2006), em microscópio óptico em objetiva 40 x (Nikon Eclipse E200). Neste procedimento, amostras de sêmen foram fixadas em solução de formol salina tamponado em diluição de 1:1000.

O movimento espermático foi avaliado pelo *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) em *software* livre, adaptado para a espécie (Adames et al., 2015). As avaliações foram realizadas pela captura de imagens do movimento espermático entre o 10^o e o 11^o segundo após o início da ativação espermática. Este procedimento foi realizado em microscópio óptico em objetiva de 10 x (Nikon Eclipse E200), acoplado a uma câmera com taxa de captura de 100 fps (Basler 602A). A ativação espermática foi realizada em microtubos (1,5 mL), onde 10 μ L de sêmen foi misturado a 800 μ L da solução ativadora (água destilada). Os parâmetros espermáticos avaliados foram a taxa de motilidade, a velocidade linear, a velocidade curvilínea e a velocidade média de deslocamento. Também foi determinado o tempo de ativação espermática, que correspondeu ao intervalo de tempo entre o início da ativação e a perda de 100 % da motilidade dos espermatozoides (Adames et al., 2015).

2.5. Criopreservação do sêmen e análise espermática do sêmen descongelado

Amostras de sêmen fresco provenientes de cada macho alimentado com rações contendo diferentes níveis de inclusão de glicerol foram submetidas à criopreservação. O sêmen proveniente de cada reprodutor foi diluído em solução contendo 5 % de frutose, 5 % de leite em pó e 10 % de metanol, na proporção de 1:3 (sêmen : diluidor), envasado em palhetas de 0,25 mL (Goes et al., 2016; Neumann et al., 2019) e submetidos em botijão de vapor de nitrogênio por 18 horas (Carolsfeld et al., 2003). Em seguida, as palhetas foram transferidas e estocadas diretamente em nitrogênio líquido. De cada macho, foram criopreservadas dez palhetas. Após 24 horas, o sêmen foi descongelado pela imersão das

palhetas em água a 25 °C por 10 segundos (Adames et al., 2015; Goes et al., 2016). Do sêmen descongelado foram avaliados os parâmetros de motilidade, as velocidades e o tempo de ativação espermática, conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco.

2.6. Avaliação dos índices zootécnicos, índices corporais, parâmetros sanguíneos e composição centesimal de tecidos corporais

Ao término do experimento, todos os machos foram submetidos à anestesia pela imersão em solução contendo 75 mg de benzocaína/L de água (CRMV, 2012) e em seguida, foram mensurados o peso e comprimento padrão individual de cada animal.

Oito machos de cada unidade experimental foram aleatoriamente selecionados e submetidos a coleta de sangue por meio de punção da veia caudal segundo Tavares-Dias e Moraes (2004). Para a avaliação de hematócrito o sangue foi coletado em capilares heparinizados que foram centrifugados durante cinco minutos a 10.000 rpm seguindo o método descrito por De Paiva et al., (2013). Para as demais análises, pelo menos 3 mL de sangue de cada peixe foram centrifugados à 3.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, alíquotas foram separadas para dosagem de cálcio, glicose e proteínas totais por meio de kit comerciais da LaborClin[®]. Outras alíquotas foram utilizadas para a dosagem de triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, por meio de kit comercial da Gold Analisa Diagnóstica[®]. A quantificação dos parâmetros bioquímicos do sangue foi realizada em espectrofotômetro (Bel Photonics[®] SF 325 NM).

Em seguida, todos os reprodutores foram submetidos à eutanásia, pela imersão em solução contendo 250 mg de benzocaína/L de água (CRMV, 2012), seguido por secção da medula espinhal. Depois os peixes foram dissecados para obtenção dos pesos do fígado, das gônadas e das vísceras. A partir destes dados foram calculados o peso médio, o comprimento padrão médio, o ganho de peso médio, a conversão alimentar aparente, o índice viscerossomático (Wing-Keong; Wang, 2011), o índice hepatossomático (Tessaro et al., 2012b) e o índice gonadossomático (Vazzoler, 1996).

Finalmente, amostras de tecido muscular, vísceras, fígado e gônadas foram armazenados a -20 °C para posterior análise da composição centesimal. Foram determinados os teores de proteína bruta, extrato etéreo, matéria seca e matéria mineral do músculo. Nas amostras de fígado, vísceras e gônadas foram determinados apenas os teores de proteína

bruta e extrato etéreo. Os procedimentos para determinação da composição centesimal foram realizados conforme procedimentos descritos por Mizubuti et al. (2009).

2.7. Análise de integridade de DNA, eritrócitos e espermatozoides

A integridade do DNA dos eritrócitos e dos espermatozoides foi avaliado pelo ensaio cometa, segundo metodologia descrita Speit e Hartmann (1999), adaptada por Cestari et al., (2004) e Ramsdorf et al. (2009). Assim, 10 µL da solução em análise (sêmen fresco ou eritrócitos) foram diluídos e homogeneizados em 150 µL de soro bovino fetal. Desta solução, 20 µL do homogeneizado foi diluído em 1.000 µL de tampão PBS (7,4). Em seguida uma alíquota de 7 µL foi misturada em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) a 37 °C. Desta mistura, alíquotas foram depositadas sobre lâminas histológicas previamente cobertas com agarose normal (1,5 %) e cobertas por uma lamínula para o espalhamento do material, seguida pela refrigeração por cinco minutos para solidificação da agarose. Depois as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 200 mM, N-lauril-sarcosinato 10 mM, Triton X-100 1 % e DMSO 10 %) por pelo menos 24 horas, em ambiente escuro a 4 °C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (300 mM) e EDTA (200 mM), pH > 13 por 25 minutos para a desespiralização do DNA e a corrida eletroforética foi realizada em 300 mA e 1 V cm⁻¹ por 25 minutos. Depois as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M TRIS, pH 7,5 por 5 minutos (3 x). Em seguida as lâminas foram secas e fixadas em etanol 96 % por 5 minutos. Para a análise, as lâminas foram coradas com 30 µL da solução de 0,02 g/mL de brometo de etídeo e analisadas em de microscópio de epifluorescência (Leica DMLS2) em objetiva de 40 x. Em teste cego, foram analisados 100 nucleóides de cada amostra. Os danos foram classificados, segundo Collins (1995), com base na migração dos fragmentos (tamanho da cauda), sendo classe 0 = sem dano visível e classe 4 = dano máximo). O escore total dos 100 nucleóides analisados foi obtido multiplicando-se o número de células em cada classe pela classe de dano que variou de 0 (todas não danificadas) a 400 (todas danificadas ao máximo) (Jaloszynski et al., 1999), sendo a equação:

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

(ua) = unidade arbitrária;

N1 – N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4;

S = número de nucleóides analisados, incluindo a classe 0.

2.8. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey, ambos a um nível de 5 % de probabilidade. Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram checados. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o *software Statistica 7.0*®.

3. Resultados

A alimentação de machos de jundiá com rações contendo glicerina bruta influenciou a espermatogêneses. Os animais alimentados com as rações contendo o maior nível de glicerina bruta apresentaram as maiores ($p < 0,05$) concentrações espermáticas ($6,82 \pm 0,53 \times 10^{10}$ SPZ/mL) (Tabela 2). Os demais parâmetros seminais, espermáticos e a integridade do DNA dos espermatozoides no sêmen fresco não foram influenciados ($p < 0,05$) pelas rações (Tabela 2). A alimentação dos reprodutores com as rações contendo glicerina bruta também não influenciaram ($p < 0,05$) o movimento espermático no sêmen descongelado (Tabela 3).

Tabela 2 – Parâmetros seminais e espermáticos no sêmen fresco de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variável	Níveis de glicerina bruta (%)					p - valor
	0	4	8	12	16	
Volume seminal (mL)	5,68±0,56	5,35±2,77	6,81±5,36	3,65±0,34	4,25±0,24	0,69
CSPZ ($\times 10^{10}$ spz mL ⁻¹)	5,13±0,27b	3,52±1,01c	5,36±0,57ab	5,27±1,01ab	6,82±0,53a	0,00
Motilidade espermática (%)	74,43±3,35	74,41±2,67	70,25±5,79	73,65±7,60	69,74±7,76	0,80
VCL (um/s)	70,30±2,12	70,64±1,51	67,91±3,39	70,92±7,50	72,54±5,67	0,83
VMD (um/s)	46,77±0,83	46,67±2,12	42,94±1,79	47,17±8,04	46,05±5,33	0,81
VLR (um/s)	45,01±0,76	44,69±2,05	41,15±1,47	45,01±7,71	43,60±5,27	0,82
TA (s)	27,23±1,56	28,25±2,23	26,09±0,81	30,96±5,17	30,26±3,15	0,44
SPZ com DNA integro (%)	46,72±10,67	59,68±11,21	44,47±3,63	50,39±16,20	63,84±18,81	0,35
Índice de fragmentação do DNA espermático*	74,47±27,19	58,53±18,69	61,17±3,40	61,44±11,74	48,48±18,53	0,54

CSPZ ($\times 10^{10}$ spz mL⁻¹) – concentração espermática; VCL (um/s) – velocidade espermática curvilínea; VMD (um/s) – velocidade espermática média de deslocamento; VLR (um/s) – velocidade espermática em linha reta; TA (s) – tempo de ativação espermática. * Índice calculado segundo (Jaloszynski et al., 1999). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de médias Tukey.

Tabela 3 – Parâmetros seminais e espermáticos no sêmen criopreservado de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variável	Níveis de glicerina bruta (%)					p -valor
	0	4	8	12	16	
Motilidade espermática (%)	41,38±8,56	35,93±11,31	36,72±2,99	35,17±6,65	39,94±8,18	0,92
VCL (um/s)	85,17±8,36	78,71±0,78	88,94±4,51	91,62±9,40	84,63±13,70	0,65
VMD (um/s)	45,56±0,60	42,80±7,08	42,49±2,90	47,52±4,08	43,89±3,41	0,938
VLR (um/s)	41,27±2,01	38,74±8,02	37,26±2,95	42,18±3,24	39,39±2,18	0,89
TA (s)	16,20	14,33	17,24	15,22	18,32	0,55

VCL (um/s) – velocidade espermática curvilínear; VMD (um/s) – velocidade espermática média de deslocamento; VLR (um/s) – velocidade espermática em linha reta; TA (s) – tempo de ativação espermática.

Os parâmetros bioquímicos do sangue também foram alterados pela alimentação dos machos com as rações contendo glicerina bruta (Tabela 4). Os peixes alimentados com as rações contendo 8 % de glicerina bruta apresentaram as maiores ($p < 0,05$) concentrações de colesterol total ($270,00 \pm 32,49$ mg dL⁻¹) e de proteína total ($6,36 \pm 1,18$ mg dL⁻¹) no plasma. Os machos alimentados com as rações contendo 16 % apresentaram os menores ($p < 0,05$) níveis de cálcio plasmático ($5,71 \pm 3,32$ mg dL⁻¹) (Tabela 4). O hematócrito, os demais parâmetros bioquímicos e a integridade do DNA dos eritrócitos não foram influenciados ($p > 0,05$) pelas rações (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros sanguíneos de machos de jundiá (*R. quelen*), alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis	Níveis de inclusão da glicerina bruta (%)					p - valor
	0	4	8	12	16	
Hematócrito (%)	43,87±6,18	45,90±9,34	48,00±2,33	51,73±2,29	50,96±9,96	0,61
Glicose (mg dL ⁻¹)	51,52±3,86	50,80±8,90	59,14±9,99	54,72±7,14	53,67±1,93	0,77
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	418,30±24,56	405,40±18,74	347,10±75,57	377,20±71,68	395,90±13,60	0,90
Colesterol total (mg dL ⁻¹)	159,80±21,93c	179,40±23,42ab	270,00±32,49 ^a	214,70±23,94ab	204,80±23,21ab	0,04
Colesterol hdl (mg dL ⁻¹)	102,10±11,25	102,90±10,76	118,40±12,41	148,60±7,70	119,30±2,96	0,06
Proteínas totais (mg dL ⁻¹)	2,88±0,33c	3,86±0,30bc	6,36±1,18 ^a	3,80±0,07bc	5,651±1,22ab	0,00
Cálcio (mg dL ⁻¹)	10,88±1,38 ^a	10,76±0,14a	11,25±0,64 ^a	10,42±1,22a	5,71±3,32b	0,01
Fosfatase alcalina (U L ⁻¹)	13,85±2,58	13,16±2,87	16,16±4,78	11,29±3,05	9,27±0,53	0,14
ALA (U L ⁻¹)	3,13±1,31	3,35±0,55	9,81±6,17	4,73±2,75	10,32±4,81	0,23
ASA (U L ⁻¹)	3,76±0,37	3,79±1,17	3,13±0,21	4,90±1,41	3,87±0,34	0,09
Índice de fragmentação no DNA de eritrócitos*	71,07±29,19	30,30±22,34	55,60±19,76	67,33±21,89	79,20±21,22	0,26

ALA - Alanina aminotransferase; ASA - Aspartato aminotransferase. * Índice calculado segundo (Jaloszynski et al., 1999). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de médias Tukey.

Apesar do crescimento e dos índices corporais dos reprodutores não terem sido influenciados ($p > 0,05$) pelas rações (Tabela 5), a composição centesimal dos diferentes tecidos foi alterada pelos níveis de inclusão da glicerina bruta nas rações (Tabela 6). Os peixes alimentados com as rações contendo 4, 12 e 16 % de glicerina bruta apresentaram os maiores ($p < 0,05$) teores de matéria seca no músculo ($24,46 \pm 12,61$; $24,18 \pm 0,94$ e $24,10 \pm 0,20\%$, respectivamente) e, aqueles alimentados com 12 e 16 % apresentaram os maiores ($p < 0,05$) teores de cinzas ($1,53 \pm 0,44$ % e $1,57 \pm 0,64$ %, respectivamente) (Tabela 6). Ainda, os peixes alimentados com as rações contendo 12 e 16 % de glicerina bruta

apresentaram os menores ($p < 0,05$) teores de proteína no músculo ($11,32 \pm 0,52\%$ e $10,31 \pm 0,37\%$, respectivamente). Os testículos dos peixes alimentados com rações contendo 16 % de glicerina bruta apresentaram os maiores ($p < 0,05$) teores de proteína bruta ($9,79 \pm 0,88\%$) (Tabela 6). As vísceras dos machos alimentados com as rações contendo 8 % de glicerina bruta apresentaram os maiores ($p < 0,05$) teores de proteína. Os demais parâmetros de composição centesimal dos diferentes tecidos não foram influenciados ($p > 0,05$) pelas rações (Tabela 6).

Tabela 5 – Parâmetros de crescimento e índices corporais de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis	Níveis de inclusão da glicerina bruta (%)					p - valor
	0	4	8	12	16	
Machos						
Peso final (g)	206,52±60,23	202,97±53,70	195,01±51,75	182,89±53,48	191,93±50,83	0,09
Comprimento padrão (cm)	22,26±1,61	22,28±1,59	22,70±2,61	21,89±1,69	22,17±2,08	0,52
Ganho de peso (g)	131,36±4,52	157,12±6,01	141,28±9,25	132,13±11,74	142,76±90,14	0,86
Conversão alimentar aparente	3,52±0,23	3,47±0,14	2,99±0,25	4,01±0,78	3,71±0,08	0,19
Índice gonadossomático	5,78±1,20	4,88±1,34	3,20±1,25	4,82±2,21	5,33±2,15	0,41
Índice hepatossomático	0,99±0,20	1,45±1,32	0,95±0,24	1,63±1,37	0,96±0,15	0,10
Índices viscerossomático	4,22±1,02	2,78±0,75	3,20±0,95	3,04±0,47	2,32±0,39	0,25

Tabela 6 – Composição centesimal de diferentes órgãos/tecidos de machos de jundiá (*R. quelen*) alimentados com rações contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

Variáveis (%)	Níveis de inclusão de glicerol (%)					p - valor
	0	4	8	12	16	
Matéria Seca						
Músculo	23,59±11,62ab	24,46±12,61a	23,01±8,97b	24,18±0,94 ^a	24,10±0,20a	0,00
Cinzas						
Músculo	1,39±0,63b	1,49±0,78ab	1,43±0,70b	1,53±0,44 ^a	1,57±0,64a	0,00
Extrato Etéreo						
Músculo	1,09±0,62	1,09±0,61	0,94±0,56	1,09±0,45	0,94±0,44	0,06
Fígado	0,58±0,03	0,44±0,18	0,37±0,09	0,51±0,03	0,53±0,16	0,30
Gônadas	0,56±0,02	0,48±0,02	0,51±0,03	0,57±0,08	0,35±0,08	0,65
Proteína Bruta						
Músculo	18,07±2,67a	19,74±1,85a	14,37±1,94b	11,32±0,52c	10,31±0,37c	0,00
Vísceras	6,60±0,45b	6,44±0,75b	7,84±0,94a	5,86±0,29b	5,72±0,28b	0,00
Fígado	12,04±0,49	12,61±0,65	12,78±0,65	13,66±1,22	14,77±0,90	0,07
Gônadas	6,25±0,47b	5,59±1,67b	7,50±3,26ab	6,17±1,97b	9,79±0,88a	0,00

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de médias Tukey.

4. Discussão

A glicerina bruta tem se mostrado como um alimento alternativo de importância para a nutrição animal (Abd-Elsamee et al., 2010; Françoso et al., 2013; Balen et al., 2014). Devido a sua alta digestibilidade e elevados níveis de energia digestível para peixes (Meurer et al., 2012; Balen et al., 2014; Gonçalves et al., 2015), possui grande potencial para uso em substituição ao milho das rações (Neu et al., 2013; Costa et al., 2017). Em geral, a substituição do milho pela glicerina pode ser realizada sem perdas produtivas para juvenis de peixes em crescimento (Li et al., 2010; Gonçalves et al., 2015).

De forma semelhante aos peixes em crescimento, a alimentação dos reprodutores de jundiá com rações contendo glicerina bruta não alteraram o crescimento nem os índices corporais. Aparentemente, estas rações também não prejudicaram a saúde dos reprodutores e não apresentaram efeitos genotóxicos aos espermatozoides. Contudo, uma atenção especial deve ser dada aos reprodutores, pois devido a sua maior expectativa de vida, disfunções metabólicas crônicas podem prejudicar o desempenho ou reduzir o tempo de vida (Tessaro et al., 2012a). Esta preocupação é relevante, pois mesmo que os indicadores plasmático de danos hepáticos (Melo et al., 2006; Coldebella et al., 2011; Nelson; Cox, 2014), os indicadores de genotoxicidade (Scalon et al., 2010; Cavas, 2011; Valenzuela-Bustamante et al., 2008) e alguns indicadores do metabolismo energético (Nelson; Cox, 2014; Voet et al., 2014; Thrall et al., 2015) permaneceram constantes, as alterações nos níveis de colesterol total, proteína total e cálcio podem apresentar efeitos deletérios a longo prazo.

Tendo em vista que os níveis de HDL não alteraram, possivelmente o aumento no colesterol total pode ter sido decorrente do aumento da LDL plasmática, o que pode levar ao acúmulo de gordura em diversos tecidos (Caula et al., 2008; Neu et al., 2013). De forma semelhante, o aumento dos níveis de proteínas totais no plasma também é uma alteração metabólica que merece atenção em pesquisas futuras para investigar qual é a fração proteica do plasma que está alterada. Apesar de não ter sido foco de estudo nesta pesquisa, pode ser hipotetizado que estas alterações podem estar relacionadas com proteínas plasmáticas envolvidas no *turnover* proteico (Bombardelli et al., 2008; Nelson; Cox, 2014), isso porque os níveis de proteína muscular reduziram com a inclusão da glicerina bruta na ração, enquanto que nos testículos estes níveis aumentaram nos peixes alimentados com as rações contendo o maior nível de glicerina bruta.

Contrariamente ao verificado por Mewes et al., (2016) em reprodutores de tilápia, os machos de jundiá alimentados com as rações contendo os maiores níveis de glicerina bruta apresentaram um aumento do ritmo espermatogênico, o que levou ao aumento da concentração espermática. Consequentemente, este ritmo pode ter determinado a deposição

de proteína bruta nos testículos (Schulz et al., 2010), as quais atendem à diversas finalidades, como proteínas de reserva (Nelson; Cox, 2014), proteínas com função biológica específica (Costa; Cooke, 2007; Schulz et al., 2010) ou até mesmo sinalização de vias metabólicas (Sharpe et al., 1992; Kolch, 2005). Neste processo, possivelmente o cálcio plasmático está envolvido, pois seus níveis reduziram na ordem de 50 % nos animais que apresentaram as maiores concentrações espermáticas e maiores teores de proteína bruta nos testículos. De modo geral, o cálcio apresenta diversas funções no metabolismo animal (Paterson, 1978; Coote et al., 1996; Fracalossi; Cyrino, 2013) e a sua relação direta com as proteínas plasmáticas é comum entre vertebrados (Hossain; Yoshimatsu, 2014). Contudo, a escassez de informações sobre os níveis basais dos diferentes parâmetros bioquímicos do sangue do *R. quelen*, em condições normais de saúde, limitam a tirada de conclusões precisas sobre o estado dos animais. Contudo, as alterações metabólicas associadas ao desempenho reprodutivo sugerem que novas investigações devam ser realizadas para elucidar os mecanismos envolvidos neste processo.

Outro ponto relevante e que merece destaque na discussão é a possibilidade de respostas espécie-específicas da glicerina bruta sobre a reprodução em machos de peixes. Este é um ponto importante, pois recentemente Mewes et al., (2016) verificaram que a alimentação de machos de tilápia do Nilo com rações contendo a glicerina bruta prejudicou a espermatogênese, reduzindo o volume de sêmen liberado, a concentração espermática e, conseqüentemente, a fecundidade. Nestes reprodutores, os níveis de cálcio e triglicérides plasmáticos não foram alterados. Mesmo que a composição da glicerina bruta possa apresentar variações entre diferentes lotes de produção (Südekum, 2008), esta hipótese não pode ser considerada válida neste caso, pois a glicerina utilizada nesta pesquisa com *R. quelen* foi proveniente da mesma parcela utilizada por Mewes et al. (2016). Portanto, devido à distância filogenética entre a tilápia do Nilo e o jundiá, é plausível considerar que as particularidades fisiológicas possam interferir nestas respostas reprodutivas.

5. Conclusão

Os reprodutores de *R. quelen* alimentados com as rações contendo o maior nível de inclusão de glicerina bruta apresentaram alterações metabólicas que levaram ao aumento da deposição de proteína nos testículos e ao aumento da concentração espermática. Além disso, de modo geral as rações não apresentaram nenhum tipo de efeito negativo sobre a saúde dos animais.

Referências

- ABD-ELSAMEE, M. O.; ABDO, Z. M.; EL-MANYLAWI, M. A. F. et al. Use of crude glycerin in broiler diets. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 30, n. 1, p. 281 - 295, 2010.
- ADAMES, M. S.; TOLEDO, C. P. R., NEUMANN, G. et al. 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**, v. 161, p. 119 - 128, 2015.
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p. 291 - 299, jan - fev, 2009.
- BALDISSEROTTO, B. **Biologia do jundiá**, In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. **Criação do jundiá**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 232, 2004.
- BALEN, R. E.; BUENO JUNIOR, G.; COLPINI, L. M. S. et al. Energia digestível e inclusão da glicerina bruta em dietas para juvenis de curimatá. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n.3, p.347 - 357, 2017.
- BALEN, R. E.; TETU, P. N.; BOMBARDELLI, R. A. et al. Digestible energy of crude glycerol for pacu and silver catfish. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1448 - 1451, 2014.
- BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. et al. Steroid profiles of cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 325 - 332, 2001.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167 - 184, 1998.
- BERENCHTEIN, B.; COSTA, L. B.; BRAZ, D. B. et al. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1491 - 1496, 2010.
- BOMBARDELLI, R. A.; GOES, E. S. R.; SOUSA, S. M. N. et al. Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing different levels of protein and energy. **Aquaculture**, v. 479, p. 817 - 823, 2017.
- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; NATALI, M. R. M. et al. 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**, v. 39, p. 941 - 949, 2010.
- BOMBARDELLI, R. A.; MEURER, F.; SYPERRECK, M. A. Metabolismos Protéico em Peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 1, 2008.
- BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251 - 1257, 2006.

- BRAUN, N.; DE LIMA, R. L.; MORAES, B. et al. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1524 - 1531, 2006.
- CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ambientes aquáticos**. São Paulo. Fapesp, 1994.
- CARNEIRO, P. C. F. **A produção de jundiá em cativeiro**, In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. **Criação do jundiá**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 232, 2004.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E. A. N. D. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 472 - 489, 2003.
- CAULA, F. C. B., OLIVEIRA, M. P. & MAIA, E. L. 2008. Teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28, 2008.
- CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1431 - 1435, 2011.
- CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O. et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270 - 274, 2004.
- CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodieselwaste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537 - 1545, 2007.
- COLDEBELLA, I. J.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A. et al. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. **Aquaculture**, v. 312, n. 1-4, p. 137 - 144, 2011.
- COLLINS, A. R., AI-GUO, M., DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69 - 77, 1995.
- Conselho Federal De Medicina Veterinária. Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012. https://www.ufrgs.br/bioetica/resolucao_1000-2012%20CFMV.pdf. (Acesso em: 24 de maio de 2018).
- COOTE, T. A.; HONE, P. W.; KENYON, R. et al. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile *Haliotis laevigata*. **Aquaculture**, v. 145, n. 1-4, p. 267 - 279, 1996.
- COSTA, D. V.; DIAS, J.; COLEN, R. et al. Partition and metabolic fate of dietary glycerol in muscles and liver of juvenile tilapia. **Archives of animal nutrition**, v. 71, n. 2, p. 165 - 174, 2017.
- COSTA, R. Glicerina: o tamanho do problema. **Biodiesel BR**, v. 1, n.3, p. 16 – 20, 2008.
- COSTA, Y.; COOKE, H. J. Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. **Chromosome Research**, v. 15, n. 5, p. 579 - 589, 2007.

- DE PAIVA, M. J. T. R.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá, EDUEM, 2013.
- DIEMER, O.; BITTENCOURT, F.; BARCELLOS, L.G. et al. Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. **Aquaculture**, v. 434, p. 93 - 99, 2014.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - **Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture, contributing to food security and nutrition for all**. 2018 Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>.
- FONTAINHAS-FERNANDES, A.; GOMES, E.; REIS-HENRIQUES, M. A. et al. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. **Aquaculture International**, v. 7, n. 1, p. 57 - 67, 1999.
- FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 375, 2013.
- FRANÇOZO, M. C.; PRADO, I. N. D.; CECATO, U. et al. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 327 - 336, 2013.
- GOES, M. D.; GOES, E. S. R.; RIBEIRO, R. P. et al. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: Reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology**, v. 88, n. 3, p. 254 - 263, 2017.
- GOMES, L. D. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C. et al. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pemelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179 - 185, 2000.
- GONÇALVES, L. U.; CEROZI, B. S.; SILVA, T. S. C. et al. Crude glycerin as dietary energy source for Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 437, p. 230 - 234, 2015.
- GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **A primer of ecological statistics**. Sunderland: Sinauer Press, p. 479. 2004.
- HOSSAIN, M. A.; YOSHIMATSU, T. Dietary calcium requirement in fishes. **Aquaculture nutrition**, v. 20, n. 1, p. 1 - 11, 2014.
- JĄŁOSZYŃSKI, P.; KUJAWSKI, M.; WĄSOWICZ, M. et al. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 439, n. 2, p. 199 - 206, 1999.
- KLINGER, A. C.; CAPITANIO, J. R.; TOLEDO, G. S. et al. Inclusão de glicerina bruta em dietas para coelhos em crescimento. **Archivos de zootecnia**, v. 64, n. 248, p. 373 - 376, 2015.
- KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 827, 2005.
- KOROLLEF, F. **Determination of nutrients**. In: Grasshoff, K., Almgreen, T. (ed.) **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, p. 264 - 312, 1976.
- KROUPA, L.; SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E. et al. Glycerol as source of energy in broiler chicken fattening. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 2, p. 157 - 164, 2011.
- LI, M. H.; MINCHEW, C. D.; OBERLE, D. F. et al. Evaluation of glycerol from biodiesel

- production as a feed ingredient for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 1, p. 130 - 136, 2010.
- MACKERETH, J. F. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water analysis: some methods for limnologists**. London: Freshwater Biol. Ass. Sc. 1978.
- MELO, J. F. B.; LUNDSTEDT, L. M.; METÓN, I. et al. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 145, n. 2, p. 181 - 187, 2006.
- MEURER, F.; BOMBARDELLI, R. A. ; HAYASHI, C. Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 27, n. 1, 2005.
- MEURER, F.; FRANZEN, A.; PIOVESAN, P. 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.
- MEWES, J. K.; MEURER, F.; TESSARO, L. et al. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. **Aquaculture**, v. 465, p. 164 - 171, 2016.
- MIZUBUTI, I. Y.; PINTO, A. P. P.; RAMOS, B. M. O. et al. **Métodos Laboratoriais de Avaliação de Alimentos para Animais**. Londrina: EDUEL, 2009.
- MYLONAS, C. C.; GISSIS, A.; MAGNUS, Y. et al. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH α delivery system. **Aquaculture**, v. 153, n. 3 - 4, p. 301 - 313, 1997.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6th ed. Artmed, Porto Alegre, 2014.
- NEU, D. H.; FURUYA, W. M.; YAMASHIRO, D. et al. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 211 - 217, 2013.
- NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A.; Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 84 - 92, 2019.
- OLIVEIRA FILHO, P. R. C.; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1581 - 1587, 2006.
- PARRA, J. E. G.; RADÜNZ NETO, J.; VEIVERBERG, C. A. et al. Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2011 - 2017, 2008.
- PATERSON, C. R. Calcium requirements in man: a critical review. **Postgraduate medical journal**, v. 54, p. 244 - 248, 1978.
- RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78 - 81, 2009.
- REIDEL, A., ROMAGOSA, E., FEIDEN, A. et al. Rendimento corporal e composição química de jundiás alimentados com diferentes níveis de proteína e energia na dieta,

- criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 233 - 240, 2010.
- SALARO, A. L.; PEZZATO, L. E.; VICENTINI, C. A. et al. Efeito da inclusão do farelo e da farinha de semente de algodão em rações para reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1169 – 1176, 1999.
- SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; MARCOS, R. M. et al. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 1, p. 153 - 156, 2010.
- SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M. et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163 - 1167, 2011.
- SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M. et al. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1217 - 1222, 2010.
- SCHULZ, R.; DE FRANCA, L.; LAREYRE, J. et al. Spermatogenesis in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390 - 411, 2010.
- SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; MILLAR, M. et al. Testosterone and Spermatogenesis Identification of Stage-Specific, Androgen-Regulated Proteins Secreted by Adult Rat Seminiferous Tubules. **Journal of andrology**, v. 13, n. 2, p. 172 - 184, 1992.
- SHIELDS, M. C.; VAN HEUGTEN, E.; LIN, X. et al. Evaluation of the nutritional value of glycerol for nursery pigs. **Journal of animal science**, v. 89, n. 7, p. 2145 - 2153, 2011.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). In: **DNA repair protocols**. Humana Press, p. 203 - 212, 1999.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A practical handbook of seawater analysis**. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, v. 2, p. 310, 1972.
- SÜDEKUM, K. H. Co-products from biodiesel production. In: GARNSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. (Ed). **Recent advances in animal nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, p. 210 - 219, 2008.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia dos peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: FMRP-USP, 2004.
- TESSARO, L., TOLEDO, C. P. R., NEUMANN, G. et al. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. **Aquaculture**. v. 326, p. 74 – 80, 2012a.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G. et al. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture research**, v. 45, n. 9, p. 1425 - 1433, 2012b.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. et al., **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª ed., Rio de Janeiro, p. 688, 2015.
- VALENZUELA-BUSTAMANTE, M.; DUPRÉ, E.; RÍO-PORTILLA, M. A. et al. Evaluacion de integridad genómica en espermatozoides de *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) mediante ensayo cometa. **Gayana (Concepción)**, v. 72, n. 1, p. 36 - 44, 2008.

- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** EDUEM. Maringá. p. 1 - 169, 1996.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular.** Artmed Editora, 2014.
- WING-KEONG, N. G; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 4, p. 220 - 254, 2013.
- WING-KEONG, N. G.; WANG, Y. 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**, v. 314, n. 1 - 4, p. 122 - 131, 2011.
- WIRTZ, S.; STEINMANN, P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Biology**, v. 68, n. 6, p. 1896 - 1902, 2006.