



KAREN GUTTENKUNST LISENKO

**USO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO
DIETÉTICO EM RATOS**

LAVRAS – MG

2013

KAREN GUTTENKUNST LISENKO

USO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO EM RATOS

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

Orientador

Dr. Luciano José Pereira

Coorientadores

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lisenko, Karen Guttenkunst.

 Uso do glicerol como suplemento dietético em ratos / Karen
Guttenkunst Lisenko. – Lavras : UFLA, 2013.
82 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Luciano José Pereira.
Bibliografia.

1. Glicerina. 2. Metabolismo. 3. Nutrição animal. 4. Toxicidade.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08557

KAREN GUTTENKUNST LISENKO

USO DE GLICEROL COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO EM RATOS

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

APROVADA em 30 de julho de 2013.

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo UFLA

Dr. Renata Ribeiro Alvarenga UFLA

Dr. Alexandre Tourino Mendonça Universidade Vale do Rio Verde

Dr. Luciano José Pereira
Orientador

LAVRAS - MG

2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus. pela sabedoria, calma e tranquilidade em momentos durante esse período;

Ao meu santo anjo por estar sempre ao meu lado e me acompanhar em cada passo;

Aos meus pais, Adelaide e Artur, pelo incentivo, amor, carinho e compreensão em todas as situações mesmo distantes, sempre com amor incondicional e total apoio sem medir esforços para me ver feliz;

Ao meu avô, Paulino, pela preocupação e carinho sempre;

À Universidade Federal de Lavras, à Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela realização do curso;

Ao professor Luciano José Pereira, pela orientação, amizade, ensinamentos e confiança durante a realização do trabalho;

Aos meus coorientadores, professor Márcio Gilberto Zangerônimo, pelo apoio e suporte sempre e ao professor Raimundo Vicente de Sousa, pela ajuda e disponibilidade;

Ao funcionário do setor de fisiologia, Willian Côrtez, pela colaboração na condução do experimento e principalmente pela amizade;

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária e Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos passados durante esse período;

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Eric e Raquel, pela montagem e ajuda em todo período de experimento e também à Viviam, Edna, Ticiane e Denise;

Aos meus amigos de Pós da Zootecnia: Rosana, Lívia, Jéssica, Priscila, Fernanda e César, pela amizade e força sempre desde que cheguei à Lavras;

Aos amigos e irmãos de república, que estiveram sempre comigo como uma família, durante todo o período; Tatiana, Pâmela, Caíque, Fernanda e outros que passaram e fizeram parte dessa trajetória e me proporcionaram muitos momentos de felicidade;

A minha amiga de infância, Ana, que mesmo longe consegue ser presente em todos os momentos que precisei;

Ao meu namorado, Daniel, que tem dado todo apoio e momentos de alegria durante a fase de redação desta dissertação, tornando tudo mais simples e tranquilo;

A todos os antigos e novos amigos, pelo carinho...

O meu MUITO OBRIGADA!!

RESUMO GERAL

O emprego do glicerol em dietas para animais desperta interesse por se tratar de um resíduo da indústria do biodiesel rico em energia. Desta forma, com este estudo objetivou-se avaliar parâmetros metabólicos e fisiológicos de ratos recebendo suplemento de glicerol puro por gavagem. Foram utilizados 30 ratos *Wistar* (peso inicial de $202,7 \pm 29,98$ g) que receberam 0 (controle/salina), 200, 400, 800 e 1600 mg de glicerol/kg de peso vivo (glicerina bidestilada com 99,85% de glicerol), além de ração e água *ad libitum*, durante 28 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições, com um animal por parcela experimental. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e, de acordo com os resultados pôde-se observar que não houve alteração ($P > 0,05$) no consumo e excreção de água, bem como no ganho de peso médio diário, quantidade de matéria seca, cinzas e proteína bruta na carcaça e níveis plasmáticos de triacilgliceróis. Houve efeito benéfico ($P < 0,05$) até a dose de 800mg/kg de glicerol sobre o consumo de ração, porcentagem de gordura na carcaça, níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) além dos níveis de lipoproteínas de alta (HDLc) e baixa/média densidade (LDLc + VLDLc). Os níveis de colesterol total e glicemia se elevaram até a dose de 800 mg/kg, porém, permanecendo dentro da faixa de normalidade da espécie, reduzindo a partir da dose de 1600 mg/kg. Em relação à contagem de leucócitos totais, houve tendência de redução, porém, também dentro dos valores de referência para ratos. Não foram observadas lesões renais e pancreáticas. Conclui-se que o glicerol apresentou-se como um suplemento seguro nas doses empregadas, causando alterações inclusive benéficas dose-dependentes em ratos.

Palavras-chave: Glicerina. Metabolismo. Nutrição animal. toxicidade.

GENERAL ABSTRACT

The use of glycerol in diets for animals arouses interest for being a biodiesel industry waste rich in energy. Thus, this study aimed at evaluating metabolic and physiological parameters of rats supplemented with pure glycerol through gavage. Thirty *Wistar* rats (initial weight of 202.7 ± 29.98 g) received 0 (control / saline) 200, 400, 800 and 1600 mg of glycerol / kg of live weight (doubly distilled glycerin with 99.85% glycerol), in addition to food and water delivered *ad libitum*, for 28 days. We used a completely randomized design with five treatments and six replicates, with one animal per experimental plot. At the end of the experiment the animals were euthanized and, according to the results, we observed that there was no change ($P > 0.05$) on water intake and excretion, as well as the average daily weight gain, dry matter, ash and crude protein in the carcass and triglyceride plasma levels. There was a beneficial effect ($P < 0.05$) up to the dose of 800mg/kg of glycerol over feed intake, percentage of carcass fat, plasma levels of aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT), in addition to high HDLc) and low/very low density (LDLc + VLDLc) lipoproteins. The levels of total cholesterol and glucose increased to a dose of 800mg/kg, however remaining inside the normality range of the species, reducing from the dose of 1600mg/kg. Regarding the total leucocyte count, there was a tendency of reduction, but also within the reference values for rats. There were no renal or pancreatic lesions. We concluded that glycerol was presented as a safe supplement, causing even dose-dependent beneficial changes in rats.

Keywords: Animal nutrition. Glycerin. Metabolism. toxicity.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Produção de biodiesel e glicerina bruta..... 13
- Figura 2 Metabolismo hepático do glicerol em função do estado alimentar..... 15

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

- Figura 1. Fluxograma e grupos experimentais. 43
- Figura 2. Consumo de ração e porcentagem de gordura na carcaça de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias. 48
- Figura 3. Parâmetros sanguíneos de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias. ALT: Alanina transaminase; AST: aspartato transaminase..... 50
- Figura 4. Leucócitos totais de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias. 52

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

- Tabela 1. Desempenho, balanço hídrico e características de carcaça (proteína bruta, extrato etéreo, matéria seca e cinzas) de ratos *Wistar* recebendo diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.47
- Tabela 2. Parâmetros sanguíneos de ratos *Wistar* suplementados com diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.49
- Tabela 3. Peso relativo dos órgãos e leucograma de ratos *Wistar* suplementados com diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.51

SUMÁRIO

| | |
|---|--|
| PRIMEIRA PARTE | |
| 1 | INTRODUÇÃO 11 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA 12 |
| 2.1 | O Glicerol 12 |
| 2.2 | Metabolismo do Glicerol 13 |
| 2.3 | Uso do glicerol como suplemento alimentar 17 |
| 2.4 | Glicerol como hiper-hidratante 21 |
| 2.5 | Toxicidade do glicerol 22 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS 24 |
| | REFERÊNCIAS 25 |
| SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 32 | |
| | ARTIGO 1 Avaliação de parâmetros metabólicos em ratos recebendo diferentes níveis de glicerol suplementados por via oral.. 32 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda mundial de combustíveis, tanto para uso residencial como para a indústria, tem promovido uma maior necessidade de produção de fontes alternativas de energia. Neste contexto, o Brasil vem se destacando como um dos maiores produtores mundiais de biodiesel, com uma produção estimada no ano de 2011 de 2,4 bilhões de litros (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS-ANP, 2011). Como consequência dessa produção, grande quantidade de resíduos é gerada, causando preocupações sobre o destino sustentável dos mesmos.

Entre os resíduos gerados da produção de biodiesel destaca-se a glicerina ou propano-1, 2,3-triol. Trata-se de um composto orgânico rico em energia que especialmente devido às elevações no preço do milho (principal componente das rações) e sua abundância proveniente da produção do biodiesel, tem sido empregado como substituto e/ou complemento na nutrição animal. No entanto, diferentes protocolos com variados graus de pureza têm gerado resultados contraditórios, inclusive com relatos de lesões renais bem como efeitos anorexigênicos criando incertezas sobre a segurança de utilização do glicerol do ponto de vista de toxicidade, alterações metabólicas e prejuízos na produção animal.

Portanto, há necessidade de mais pesquisas para verificação de protocolos seguros de substituição e/ou suplementação com glicerol em dietas animais na tentativa de se propor doses ideais ou até mesmo a viabilidade econômica na nutrição animal. Neste sentido, o objetivo com este estudo foi avaliar o efeito do glicerol puro como suplemento alimentar sobre os parâmetros fisiológicos e metabólicos de ratos *Wistar*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Glicerol

A glicerina pura ou glicerol é obtido através de um processo de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com alcoóis (metanol ou etanol) através de catalisadores que podem ser básicos, ácidos ou enzimáticos. Esta transesterificação consiste na separação da glicerina do óleo vegetal (Figura 1). A glicerina torna o óleo mais denso e viscoso, portanto deve ser removida deixando o lipídio mais fino e reduzindo a viscosidade. Esta se apresenta na forma de um líquido viscoso pardo escuro. Assim, glicerina é, portanto, o nome dado ao produto comercial com um mínimo de 95% de glicerol puro em sua formulação, onde o restante de sua composição apresenta pequenas frações de água, metanol ou etanol e sais dissolvidos, como por exemplo, cloreto de sódio (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

O glicerol em sua forma pura (1,2,3-propanotriol), possui as características de um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio (RIVALDI et al., 2008). O ponto de fusão do glicerol ocorre na temperatura de 17,8 °C e o de ebulição em 290 °C. Gorduras e óleos contêm cerca de 10% de glicerol ligado à cadeia principal, que é liberado como um subproduto durante a produção do biodiesel (DASARI, 2007), onde cada tonelada de biodiesel produzido está associada com o aumento de cerca de 100 kg de glicerol (KOVACS, 2012).



Figura 1 Produção de biodiesel e glicerina bruta

Fonte Adaptado de Biodiesel BR (2013).

2.2 Metabolismo do Glicerol

De forma geral, o glicerol pode ser encontrado na corrente sanguínea e nas células dos animais, sendo derivada de lipólise no tecido adiposo, triglicerídeos em lipoproteínas plasmáticas ou pela dieta (ALVARENGA et al., 2012). Estes mesmos autores citam que as principais funções do glicerol são:

constituente do esqueleto de triacilgliceróis transporte de equivalentes redutores como o glicerol-3-fosfato, a partir do citosol para a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e precursor da gliconeogênese, assim como o esqueleto de carbono.

O glicerol proveniente da dieta apresenta absorção gástrica e entérica, sendo que no intestino esta absorção é mais rápida (GUYTON, 1991). Em monogástricos, o glicerol consumido é absorvido na via paracelular, nos enterócitos, por dois mecanismos: transporte ativo dependente de um sistema de transporte e é inibido pelo uso de sódio e responsável por 70% do transporte do glicerol e baixas concentrações, e transporte passivo (KATO; HAYASHI; INOUE, 2005). O glicerol é metabolizado principalmente nos tecidos hepático e renal. Por ser um composto solúvel em água, entra livremente na veia porta sendo transportado até o fígado onde é metabolizado (SAMBROOK, 1980). A taxa de absorção é equivalente a aproximadamente 25% da taxa de absorção para a glicose (LIN et al., 1976; TAO, 1983).

No fígado, o glicerol é fosforilado pela glicerolquinase e resulta em glicerol-3-fosfato, que é oxidado em diidroxiacetona fosfato. A enzima glicolítica triose fosfato isômeras e converte esse composto em gliceraldeído-3-fosfato (LENINGHER, 2006). Os rins e o tecido muscular também apresentam a enzima glicerol quinase, porém, em menor concentração que no fígado (KREBS; LUND, 1996). No tecido adiposo, o glicerol-3-fosfato é obtido da diidroxiacetona fosfato por meio da ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase. Por outro lado, o glicerol liberado no catabolismo do triacilglicerol é convertido à glicose no fígado por meio de fosforilação em glicerol-3-fosfato catalisado pela glicerolquinase iniciando então a gliconeogênese (MOUROT et al., 1994). Desta maneira, o destino metabólico do glicerol pode ser dirigido, dependendo do tecido e do estado metabólico do animal, para o fornecimento de energia (22 ATPs) ou como precursor da síntese de triacilgliceróis (EMMANUEL;

BERZINS; ROBBLEE, 1983; MENTEN; MIYADA; BERENCHTEIN, 2012). Segundo Lin et al. (1976), o fígado é responsável por aproximadamente 3/4 da capacidade total do organismo metabolizar o glicerol. Já o rim é o órgão responsável por cerca de 1/5 desta capacidade de metabolização sendo também essencial para a reabsorção do glicerol, evitando-se perdas pela urina. A figura 3 ilustra o metabolismo do glicerol no fígado quando o organismo está em déficit de energia e quando está suprido (BEST, 2006).

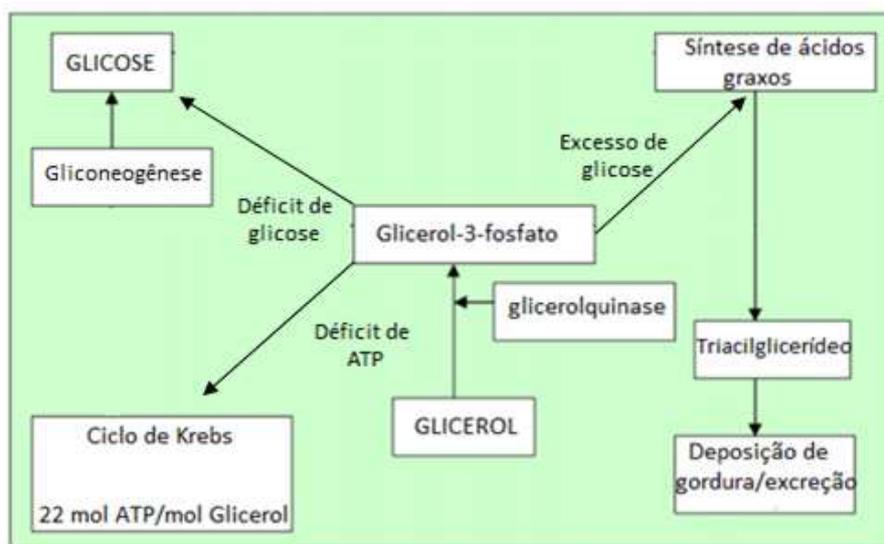


Figura 2 Metabolismo hepático do glicerol em função do estado alimentar

Fonte Adaptado de Best (2006).

Segundo Yuasa (2003), ao infundirem 0,2 mM de glicerol no intestino delgado de ratos, a fração de glicerol absorvido foi de 92% e esta não foi alterada quando a dose de 1,0 mM foi administrada. Entretanto, a absorção reduziu para 73% quando a concentração da substância foi elevada para 40 mM.

Portanto, a absorção de glicerol pode ser dependente da concentração de glicerol (saturável).

Damiano et al. (1999) observaram aumento da triacilgliceridemia, insulínia normal e diminuição da pressão na aorta torácica após administração oral de glicerol em ratos. Porém, as informações sobre as implicações metabólicas da suplementação de glicerol na dieta são escassas, principalmente quando a suplementação atinge grandes proporções como um ingrediente energético das rações (MENTEN; MIYADA; BERENCHTEIN, 2012). Já Goulet (2009) observou que a combinação de glicerol com uma dieta rica em glicose na proporção de 3:1 pode acelerar a absorção de fluidos no intestino, podendo assim, aumentar potencialmente o processo de hiper-hidratação. Segundo estes autores, maiores investigações são necessárias para elucidar este processo.

Na membrana plasmática das células existem proteínas integrais (PI), que são responsáveis pelo equilíbrio osmótico, permitindo o transporte de água e de pequenos solutos, como por exemplo, o glicerol entre os lados da membrana (FROGER et al., 2001). Estas são classificadas em dois subgrupos: aquaporinas (transporte somente de água) e aquagliceroporinas (transporte de água e glicerol), sendo estas últimas denominadas: AQP3, AQP7 e AQP9. A AQP3 é uma proteína necessária ao transporte de glicerol no intestino de ratos e humanos, e também encontrada nos olhos, rins, estômago, baço, eritrócitos e células da epiderme (MACDOUGALD; BURANT, 2005). A AQP7 é encontrada em alta quantidade no tecido adiposo e pode funcionar como canal de liberação do glicerol deste tecido. No fígado encontra-se a AQP9 que controla a entrada de glicerol para ser utilizado como substrato gliconeogênico (MAEDA et al., 2004). No tecido muscular, ocorre captação do glicerol contido no sangue. Apesar deste tecido não possuir a enzima glicerol quinase, o glicerol

pode ser metabolizado através da enzima glicerol redutase, com a participação de NADPH, como evidenciado no músculo diafragma de ratos (TOEWS, 1996).

2.3 Uso do glicerol como suplemento alimentar

Uma área que está chamando a atenção recentemente é a utilização da glicerina como ingrediente na alimentação animal e humana. Devido às alterações no preço do milho e o excesso do glicerol proveniente da produção de biodiesel, cogita-se a possibilidade da utilização do mesmo como alimento substituto e/ou complementar na nutrição animal. O glicerol, principal componente da glicerina, é reconhecido como uma substância segura para uso em boas práticas de alimentação, porém, ainda existem controvérsias sobre o fato deste produto ser considerado fonte de energia ou um simples hidrato de carbono. A razão para essa dúvida reside no fato que o acréscimo de glicerol não afeta a glicemia ou os níveis de insulina como aconteceria com carboidratos (DASARI, 2007).

De acordo com Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2011), o glicerol é reconhecido como aditivo pertencido à classe dos umectantes e espessantes e tem sua inclusão permitida em diferentes espécies animais. Em maio de 2010 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o uso da glicerina como insumo na alimentação animal, desde que atenda os seguintes requisitos: valor mínimo de 800 g glicerol/kg, máximo de 13% de umidade e máximo de 159 mg metanol/kg (PAULO, 2010).

Os valores de energia metabolizável determinados para a glicerina bruta são muito próximos quando comparados aos valores de energia metabolizável aparente do milho para suínos (3.340 kcal/kg) e aves (3.381 kcal/kg)

(ROSTAGNO, 2011). Isto evidencia o uso potencial da glicerina como ingrediente energético de rações para estas espécies. Barlet e Schenieder (2002) propuseram que os valores de energia metabolizável do glicerol puro para frangos de corte, poedeiras e os suínos variavam de acordo com sua inclusão na dieta. Estes mesmos autores sugeriram que a redução da energia metabolizável aparente ocorre pela ausência de reabsorção renal de glicerol, sendo o excesso excretado pela urina. Concomitantemente a isso, Gianfelici (2009) relatou que quando há ingestão de quantidades crescentes de glicerol, deve existir um nível a partir do qual a capacidade de metabolização é superada, causando então, um aumento no glicerol no sangue, o qual deve ser excretado pela urina.

Doppenberg & Van Der Aar (2007) propuseram que a glicerina acrescentada à dieta de terminação para suínos aumentou a capacidade dos animais em reter umidade da carne na carcaça, proporcionado pelo seu efeito de hidratação. Mourot et al. (1994) também sugeriram que a glicerina dietética aumentou a capacidade de reter água nos músculos, agindo como hiper hidratante, o que, conseqüentemente, provocou uma diminuição de gotejamento da carcaça na câmara de resfriamento e menores perdas no cozimento. Adicionalmente, estes mesmos autores sugeriram que a glicerina pode ser muito útil em dietas destinadas às porcas em lactação uma vez que ajuda a prevenir perda excessiva de gordura de cobertura proporcionando melhor uso de aminoácidos.

Berenchtein et al. (2010) realizaram um estudo com a finalidade de verificar os efeitos de diferentes concentrações de glicerol na dieta sobre a qualidade da carne, desempenho e características de carcaça de suínos. Após análise dos resultados, os autores concluíram que, embora a dieta com glicerol não tenha gerado alterações significativas sobre o desempenho e a qualidade da carne, não houve efeitos negativos sobre as características de carcaça, e que, sendo assim, o glicerol pode participar em até 9% na dieta destes animais nas

fases de crescimento e terminação. Em outro estudo realizado com suínos, Lammers et al. (2008) observaram que a inclusão de até 10% de glicerina bruta (com alta concentração de glicerol) na dieta, não interferiu nos metabólitos sanguíneos assim como na frequência de lesões nos tecidos oculares, renais e hepáticos.

Em frangos de corte, Simon, Schwabe e Bergner (1997), avaliando 5, 10, 15, 20 e 25% de glicerina bruta na dieta, concluíram que a inclusão de até 10% deste produto pode ser utilizado promovendo resultados benéficos aos animais, entretanto, ao utilizarem acima desta dose, não observaram efeitos da adição da glicerina no desempenho dos animais. Mais recentemente Cerrate et al. (2006) avaliaram a inclusão de 5 e 10% de glicerina bruta, proveniente da produção do biodiesel em rações de frangos de corte e relataram que o nível de 10% afetou negativamente o consumo de ração, o peso final e, conseqüentemente, a conversão alimentar dos frangos. Quanto às características de carcaça, nível de 10% de glicerina bruta reduziu o peso (absoluto e relativo à carcaça) do peito das aves.

Miller (2006) sugeriu que o glicerol pode ser usado como um suplemento dietético por ser capaz de prover energia típica da dieta de frangos (glicose e lipídeo). Resultados desta pesquisa indicaram que 10% de glicerina para pintinhos até 16 dias de idade não alterou o desempenho e 5% de glicerina para dietas de acabamento até o abate não prejudicou a ingestão de alimentos, não sendo observado efeito negativo, como excesso de gordura e diminuição de proteína bruta, na qualidade de carne destes animais.

Na pecuária também há uma grande aplicação do glicerol como um substrato gliconeogênico (CHUNG et al., 2007), uma vez que o glicerol pode ser convertido em glicose no fígado e pode fornecer energia para o metabolismo celular. Alguns autores (CHUNG et al., 2007; DEFRAIN et al., 2004) têm avaliado o uso de doses relativamente altas de glicerol para prevenir Cetose em

fêmeas lactantes, porém, há poucos trabalhos avaliando os efeitos na produção e composição do leite e também quanto aos parâmetros sanguíneos. O glicerol pode ser incluído em rações para ruminantes como fonte energética e substituto de ingredientes para alimentação animal como os grãos de cereais e, conseqüentemente, reduz os custos da alimentação (MACH; BACH; DEVANT, 2009). Kristensen e Raun (2007) avaliaram a absorção do glicerol e o metabolismo do mesmo no fígado de vacas que receberam por cânula ruminal 925g/dia de glicerina, com 85% de glicerol. Os autores recuperaram, na veia porta, 10% do glicerol administrado, que foi quase totalmente absorvido pelo fígado e convertido em glicose e, o glicerol não recuperado na veia porta, presumivelmente, foi convertido a propionato, no rúmen, contribuindo com a gliconeogênese.

Em ovinos foi verificado que a inclusão de 6% de glicerina bruta, com 36,2% de glicerol em sua composição, reduziu o custo de ganho de carcaça e otimizou a conversão alimentar destes animais (LAGE et al.,2010). Abdalla et al. (2008) consideraram que tortas e farelos provenientes dos resíduos da produção do biodiesel apresentaram características nutricionais adequadas para a inserção destes produtos na dieta de ruminantes. No entanto, estes autores chamaram à atenção para possíveis efeitos deletérios provocados por metabólitos bioativos presentes nestas substâncias.

Silva et al. (2012) realizaram experimento utilizando glicerol na produção de dourados, avaliando os parâmetros zootécnicos e pôde-se observar que a dieta contendo 5% de glicerol não causou efeitos prejudiciais. Verificou-se ainda que esta mesma dosagem de glicerol não causou diferença significativa em relação ao peso dos animais, porém, houve maior rendimento de filé, melhorando a proteína da carne e retenção de gordura.

Lin et al. (1976) utilizaram ratos alimentados com dietas contendo 22% de glicerol da dieta durante 3 semanas. Esta quantidade de glicerol não afetou o

desempenho dos animais, porém, verificou-se um aumento nos níveis séricos das enzimas citratoliase e málica, sem observar um aumento na síntese de ácidos graxos. Logo, os autores concluíram que o glicerol não influenciou a síntese de triacilgliceróis. Lin et al. (1976) avaliaram a ingestão de glicerol em ratos, observando que animais que receberam 30% de glicerol na dieta apresentaram aumento no ganho de peso, o peso do fígado e uma maior concentração de lipídeos neste órgão. Os níveis de HDLc também foram significativamente aumentados em ratos recebendo a dieta contendo glicerol.

O efeito do glicerol dietético na atividade lipogênica foi estudado de forma comparativa em ratos e frangos por Lin et al. (1976). A adição de 20% de glicerol na dieta de ratos por três semanas causou aumento do peso do fígado e um marcante aumento na atividade de enzimas lipogênicas do fígado, entretanto sem um aumento concomitante na síntese de ácidos graxos “in vivo” no fígado. Por outro lado, em frangos alimentados por três semanas com dieta contendo 20% de glicerol, não houve alteração no peso do fígado e ocorreu uma queda na atividade das enzimas lipogênicas do fígado, assim como a síntese de ácidos graxos.

2.4 Glicerol como hiper-hidratante

A ingestão de glicerol pode induzir hiper hidratação em ambientes com altas temperaturas, resultando em uma maior retenção de fluidos quando comparado com a ingestão de apenas água. Tal fato é relacionado a sua rápida absorção e atividade osmótica, que no trato urinário promove reabsorção de glicerol e água (O'BRIEN et al., 2005).

Lions e Riedesel (1993) verificaram os efeitos da administração de solução de 5% de glicerol por gavagem em ratos. Os resultados mostraram que esta dose aumentou a retenção de fluidos e atenuou a micção por três horas em

relação aos animais que consumiram apenas água, mostrando então os efeitos hidratantes do glicerol. Reynolds, Sneddon e Reinhan (2012) afirmaram que a ingestão de soluções com glicerol pode ser considerada uma maneira segura e efetiva de induzir um estado de hiper hidratação em cães, não causando efeitos adversos no trato gastrointestinal, renal ou função muscular.

Em humanos, Freund et al. (1995) compararam respostas vasculares, renais e hormonais de repouso, após ingestão de glicerol com água ou apenas água. Ambos os tratamentos produziram expansão similar de volumes de plasma e sangue, mas o fluxo de urina e a depuração de água livre (medida da perda de água renal) foi muito superior com a ingestão de somente água.

2.5 Toxicidade do glicerol

Estudos prévios mostram que, em ratos, a administração intramuscular de glicerol pode causar lesões renais (HWANG; YUN, 2011; LOCHHEAD; KHARASCH; ZAGER, 1998; MARTIM et al., 2007; NATH et al., 2000). Lochhead et al. (1998) investigaram os efeitos do anestésico isoflurano sobre a função renal de ratos Sprague Dawley com lesão renal aguda. Para que fossem causados danos renais, em cada rato, foi injetada uma solução de glicerol (50 %, 9 ml/Kg), divididas por igual, na parte superior de cada um dos membros inferiores do animal. Foi observado, neste experimento, que a lesão renal aguda causada pelo glicerol resultou em necrose tubular, carregamento da proteína heme intrarrenal, hemoconcentração (devido ao espaçamento de líquido no tecido afetado) e alterações na frequência cardíaca.

O comportamento da função renal de ratos submetidos a injeções semanais de solução de glicerol (50%, 7,5 ml/kg corporal) durante seis meses foi analisado por Nath et al. (2000). Observou-se que, logo após a primeira injeção,

houve queda na taxa de filtração glomerular, seguido de um declínio progressivo até o final do sexto mês.

Quando administrado via intraperitoneal, foi observado por Rieger et al. (2008) que 50% (v/v) de glicerol provocou diminuição da atividade das enzimas creatina quinase e piruvato quinase nos rins, aumento na formação de radicais livres renais e plasmáticos, assim como, peroxidação de lipídeos e carbonilação proteica, sugerindo assim estresse oxidativo. No entanto, neste mesmo estudo, foi observada uma diminuição da atividade do LDLc. Já Whitlock, Guerrant e Dutcher (1944) compararam os efeitos de três diferentes séries experimentais de dieta acrescida de glicerol ou propilenoglicol em ratos. Observou-se que, quando incorporado na dieta, concentrações de 40; 50 ou 60% de glicerol deprimiram o crescimento de ratos jovens (idade entre 21 e 28 dias), porém, os efeitos deletérios foram menores nos animais tratados com glicerol do que os tratados com propilenoglicol, o que mostra menores efeitos tóxicos desta substância.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão de literatura realizada, observou-se que o glicerol é utilizado amplamente na nutrição animal em diferentes doses, purezas e períodos de administração, tanto como suplemento alimentar, como ingrediente substituto do milho. No entanto, diferentes protocolos têm gerado resultados contraditórios, inclusive com relatos de lesões renais bem como efeitos anorexigênicos criando incertezas sobre a segurança de utilização do glicerol do ponto de vista de toxicidade, alterações metabólicas e prejuízos na produção animal. Desta forma, com o presente estudo objetivou-se verificar os efeitos metabólicos e fisiológicos deste suplemento (sem contaminantes, como o metanol), em ratos *Wistar* a fim de se encontrar uma dose ideal evidenciando seus efeitos sobre parâmetros metabólicos e bioquímicos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. Use of by-products of the biodiesel industry in ruminant feed. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, p. 260-268, jul. 2008. Número especial.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1322937836263>>. Acesso em: 3 dez. 2011.

ALVARENGA, R. R. et al. Use of glycerine in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 68, n. 4, p. 637-644, Dec. 2012.

BARTELT, J.; SCHNEIDER, D. Investigation on the energy value of glycerol in the feeding of poultry and pig. In: UNION FOR THE PROMOTION OF OILSEEDS-SCHRIFTEN HEFT, 1., 2002, Berlin. **Annals...** Berlin: Union Zur Förderung Von Oel-Und Proteinplafalzen, 2002. p. 15-36.

BERENCHTEIN, B. et al. Use of glycerol in diets for growing-finishing pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 7, p. 1491-1496, jul. 2010.

BEST, P. Increased biofuel production will grow supplies og by-products: glycerine gives na energy option. **Feed International**, Los Gatos, v. 55, n. 12, p. 20-21, Dec. 2006.

BIODIESEL BR. Disponível em:<<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

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

CHUNG, Y.H.et al. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 5682-5691, 2007.

DAMIANO, P. F. et al. Potential role of glycerol leading to rat fructose hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 34, n. 1, p. 1007-1011, 1999.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 79, n. 43, p. 1-3, 2007. Disponível em:
<<http://www.feedenergy.com/MDasariFS2007.pdf>>. Acesso em: 6 abr. 2012.

DEFRAIN, J.M. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 4195-4206, Dec. 2004.

DOPPENBERG, J.; AAR, P. J. van der. **Biofuels**: implications for the feed industry. Wageningen: Academic, 2007. 88 p.

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**, London, v. 24, n. 4, p. 565-571, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Codex general standard for food additives**: codex stan 192-1995: preamble. Rome, 2011. 332 p.

FREUND, B. J. et al. Glycerol hyperhydration: hormonal, renal, and vascular fluid responses. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 79, n. 6, p. 2069-2077, Dec. 1995.

FROGER, A. et al. Functional characterization of a microbial aquaglycerioporin. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 5, p. 1129-1135, May 2001.

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

GOULET, E.D.B. Review of the effects of glycerol-containing hyperhydration solutions on gastric emptying and intestinal absorption in humans and in rats. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, Champaign, v. 19, n. 5, p. 547-560, 2009.

GUYTON, A. **Textbook of medical physiology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1991. 231 p.

HWANG, Y. W.; YUN, H. I. Effects of acute hepatic and renal failure on pharmacokinetics of flunixinmeoglumine in rats. **Experimental Animals**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 187-191, 2011.

KATO, T.; HAYASHI, Y.; INOUE, K. Glycerol absorption by Na⁺- dependent carrier-mediated transport in the closed loop of the rat small intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 553-555, Mar. 2005.

KOVACS, A. Biodiesel technology. **Environmental Technologies and Renewable Energy**, Budapest, v. 16, n. 1, p. 153-162, Feb. 2012.

KREBS, H.A.; LUND, P. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemistry**, New York, v. 98, n. 1, p.210-214, 1996.

KRISTENSEN, N.B.; RAUN, B.M.L. Ruminal fermentation, portal absorption, and hepatic metabolism of glycerol infused into the rumen of lactating dairy cows. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENERGY AND PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION, 1., 2007, Wageningen. **Proceedings...**Wageningen: Academic, 2007. p. 355-356.

LAGE, J. F.et al. Crude glycerin in the diet of feedlot lambs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 9, p. 1012-1020, set. 2010.

LAMMERS, P.et al. Growth performance , carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin: supplemented diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 2962-2970, Nov. 2008.

LENINGHER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Savier, 2006. 1202 p.

LIN, E.C.C. et al. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1976.

LIONS, T. P.; RIEDESEL, M. L. Glycerol-induced hyperhydration: its effects on fluids compartments in the rat. **Life Sciences**, Varsóvia, v. 53, n. 23, p. 1779-1787, 1993.

LOCHHEAD, K. M.; KHARASCH, E. D.; ZAGER, R. A. Anesthetic effects on the glycerol model of rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, Hagerstown,v. 9, n. 2, p. 305-309, 1998.

MACDOUGALD, O. A.; BURANT, C. F. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Stanford, v. 102, n. 31, p. 10759-10760, Aug. 2005.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 2, p. 632-638, Feb. 2009.

MAEDA, S. et al. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. **Hypertens Research**, London, v. 27, n. 12, p. 947-953, Dec. 2004.

MARTIM, E. C. O. et al. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 292-296, 2007.

MENTEN, J.F.M.; MIYADA, V.S.; BERENCHTEIN, B. **Glicerol na alimentação animal**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/downloads/glicerol_2009-03-13.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2012.

MILLER, F. **Two for one deal**: biodiesel byproduct fuels growth in broilers. Arkansas: University of Arkansas, 2006. Disponível em: <<http://www.uark.edu/depts/agripub/Publications/Agnews/agnews06-42.html>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 639-648, maio/jun. 2009.

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

NATH, K. A. et al. Renal response to repetitive exposure to heme proteins: chronic injury induced by an acute insult. **Kidney International**, Malden, v. 57, n. 6, p. 2423-2433, 2000.

O'BRIEN, C. et al. Glycerol hyperhydration: physiological responses during cold-air exposure. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 99, n. 2, p. 515-521, 2005.

PAULO, B. J. A. **Glicerina, subproduto da indústria do biodiesel, perspectivas de uso na alimentação animal**. Brasília, MAPA, 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arqeditor/file/camaras_setoriais/Oleaginosas_e_biodiesel/10_reuniao/Apresentacao_glicerina.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2013.

REYNOLDS, A. J.; SNEDDON, K.; REINHAN, G. A. **Hydration strategies for exercising dogs**. Disponível em: <http://www.hydrolyte.us/Arleigh_Reynolds-Hydration_Strategies.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2012.

RIEGER, E. et al. Intraperitoneal glycerol induces oxidative stress in rat kidney. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Carlton, v. 35, n. 8, p. 928-933, 2008.

RIVALDI, J.D. et al. Glycerol od biodiesel; biotechnological strategy for glycerol in biodiesel production. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 10, n. 37, p. 44-51, 2008.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: UFV, 2011. v. 2, 141 p.

SAMBROOK, I. E. Digestion and absorption of carbohydrate and lipid in the stomach and the small intestine of the pig. In: LOW, A. G.; PARTRIDGE, I. G. (Ed.). **Current concepts of digestion and absorption in pigs**. London: National Institute for Research in Dairying, 1980. p.78-93.

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

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

TAO, R. C. Glycerol: its metabolism and use as an intravenous energy source. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v. 7, p. 479-488, 1983.

TOEWS, C.J. Evidence for the metabolism of glycerol by skeletal muscle and the presence of amusclicotinamide-adenine dinucleotide phosphatedependent glycerol dehydrogenase. **Biochemical Journal**, London, v. 98, p. 27-29, Dec. 1996.

WHITLOCK, G. P.; GUERRANT, N. B.; DUTCHER, R. A. Response of rats to diets containing propylene glycol and glycerol. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 57, n. 1, p. 124-125, 1944.

YUASA, H. Saturable absorption of glycerol in the rat intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26,n. 11, p. 1633-1636, 2003.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Avaliação de parâmetros metabólicos em ratos recebendo diferentes níveis de glicerol suplementados por via oral

Artigo formatado de acordo com as normas do *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS EM RATOS
RECEBENDO DIFERENTES NÍVEIS DE GLICEROL
SUPLEMENTADOS POR VIA ORAL**

K. G. Lisenko, E. F. Andrade, R. V. Lobato, D. R. Orlando, D. H. C. Damin, A. C. Costa, R. R. Lima, R. R. Alvarenga, M. G. Zangeronimo, R. V. Sousa, L. J. Pereira.

*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras,
Lavras, Minas Gerais, Brasil*

Autor correspondente:

Prof. Dr. Luciano J. Pereira

DMV - Setor de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Lavras – UFLA, Caixa Postal 3037 - Campus Universitário - Fone: (35) 3829-5211

E-mail: lucianojosepereira@dmv.ufla.br

Fax: (55) (35) 3829 1715

Resumo

O emprego do glicerol em dietas para animais desperta interesse por se tratar de um resíduo da produção do biodiesel rico em energia. Desta forma, com este estudo objetivou-se avaliar parâmetros metabólicos e fisiológicos de ratos recebendo suplemento de glicerol puro por gavagem. Foram utilizados 30 ratos *Wistar* (peso inicial de $202,7 \pm 29,98$ g) que receberam, 0 (controle/salina), 200, 400, 800 e 1600 mg de glicerol/kg de peso vivo (glicerina bidestilada com 99,85% de glicerol), além de ração e água *ad libitum*, durante 28 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e, de acordo com os resultados pôde-se observar que não houve alteração ($P > 0,05$) no consumo e excreção de água, bem como no ganho de peso médio diário; quantidade de matéria seca, cinzas e proteína bruta na carcaça e triacilgliceróis plasmáticos. Houve efeito benéfico ($P < 0,05$) até a dose de 800mg/kg de glicerol sobre o consumo de ração, porcentagem de gordura na carcaça, níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lipoproteínas de alta densidade (HDLc) e baixa/média densidade (LDLc+VLDLc). Os níveis de colesterol total e

glicemia se elevaram até a dose de 800 mg/kg, porém, permanecendo dentro da faixa de normalidade da espécie, reduzindo a partir da dose de 1600 mg/kg. Com relação à contagem de leucócitos totais, houve tendência de redução, porém, dentro dos valores de referência para ratos. Não foram observadas lesões renais e pancreáticas. Conclui-se que o glicerol apresentou-se como um suplemento seguro nas doses empregadas, causando alterações inclusive benéficas dose-dependentes em ratos.

Palavras-chave: glicerina, metabolismo, nutrição animal, toxicidade.

Abstract

The use of glycerol in diets for animals arouses interest because it is a residue of biodiesel production rich in energy. Thus, this study aimed to evaluate metabolic and physiological parameters of rats receiving supplemental pure glycerol by gavage. We used 30 Wistar rats (initial weight 202.7 ± 29.98 g) receiving 0 (control / saline), 200, 400, 800 and 1600 mg glycerol / kg of body weight (bidistilled glycerin 99.85 % of glycerol) besides food and water *ad libitum* for 28 days. We used a completely randomized design with five treatments and six replications. At the end of the experiment the animals were killed and, according to the results it was observed that there was no change ($P > 0.05$) on intake and excretion of water, as well as the average daily weight gain; dry matter, ash and crude protein in the carcass and plasma triacylglycerols. There was an beneficial effect ($P < 0.05$) up to a dose of 800mg/kg of glycerol on feed intake, percentage of carcass fat, plasma levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), high density lipoprotein (HDLc) and low / medium density (LDLc + VLDLc). The levels of total cholesterol and glucose rose up to a dose of 800mg/kg (but remaining within the normal range). reducing with the dose of

1600mg/kg. The total leucocyte count tended to decrease, although within the reference values for rats. There were no renal or pancreatic lesions. It was concluded that glycerol was presented as a safe supplement in the studied doses, causing even some beneficial effects in a dose-dependent manner in rats.

Keywords: glycerin, metabolism, animal nutrition, toxicity.

Introdução

O aumento constante no consumo mundial de combustíveis para motores de uso industrial, residencial e automotivo tem gerado uma maior demanda de produção de energia (GOLDEMBERG, 2000). Na atualidade, os recursos energéticos mais utilizados são derivados de compostos fósseis do petróleo. Porém, o uso destes produtos tem se tornado ambientalmente e economicamente desfavorável por causar grandes impactos difíceis de serem previstos (CRUTZEN et al. 2008). Assim, novas fontes de energia são requeridas, criando condições para o desenvolvimento, produção e pesquisa sobre biocombustíveis.

Apesar de ser uma forma alternativa de energia, a produção do biodiesel gera resíduos, como o glicerol, sendo necessárias medidas sustentáveis de reutilização destes coprodutos. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado os efeitos da utilização do glicerol residual como fonte energética em rações de diferentes espécies animais (LAMMERS, et al. 2008; BERENCHTEIN, et al., 2010).

Por ser um produto rico em energia (aproximadamente 4.320 kcal de energia bruta por kg de glicerol puro), o emprego do glicerol na formulação de dietas para animais desperta interesse imediato, com

eficiência na sua utilização (BERENCHTEIN et al. 2010), e tem sido utilizado também como regulador de fluidos corporais durante a reidratação ou exercício físico para cavalos (SCHOTT et al. 2001) e até seres humanos (KAVOURAS et al. 2006; DINI et al. 2007).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2010), existem no Brasil 66 plantas sendo utilizadas para a produção de biodiesel, correspondendo a uma produção total de 16.216 m³/dia. Além disso, conforme a Resolução n° 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), o óleo diesel comercializado a partir do ano de 2010 em todo território brasileiro, deve conter 5% de biodiesel (ANP, 2011). Neste mesmo cenário, o Brasil apresentou uma produção anual de 2,4 bilhões de litros de biodiesel, com uma capacidade instalada para o mesmo ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros. Tal produção colocou o país entre os maiores produtores e consumidores do combustível no mundo (ANP, 2011). Uma vez que os coprodutos do biodiesel podem ser utilizados na nutrição animal, tal situação levanta a necessidade de se verificar a toxicidade desta substância, sua dose ideal e suas vantagens como substituto ou suplemento no alimento, visto que poucos são os estudos encontrados onde estas variáveis são avaliadas.

Neste sentido, o objetivo com o presente estudo foi avaliar o efeito do glicerol puro como suplemento alimentar, a fim de encontrar uma dose ideal e benéfica sobre os parâmetros fisiológicos e metabólicos de ratos *Wistar*.

Material e métodos

Local do experimento, animais e instalações.

O experimento foi conduzido no período de julho a agosto de 2012, no Biotério Setorial do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, região Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – protocolo 022/12) da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados 30 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), em estado hígido, pesando $202,7 \pm 29,98$ g. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais e submetidos a um período de sete dias de aclimação com o ambiente e equipe de execução. A sala foi climatizada a uma temperatura de 22 ± 2 °C e com ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Dietas experimentais

A dieta base consistiu de ração comercial para ratos (Nuvilab®), contendo por peso: 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais e 12% de umidade, contendo 17,03 kJ/g.

Para suplementar as dietas, utilizou-se o glicerol puro (glicerina bidestilada com 99,85% de glicerol - ALMAD, Araçatuba, SP, Brasil) solubilizado em água administrado via gavagem em um volume 0,3 mL por animal. As características físico-químicas do glicerol foram determinadas pela empresa Mapric (Ipiranga, SP, Brasil): ácidos graxos e ésteres - 0,02%; metais pesados - < 5 ppm; densidade de 1,2604 g/ml; pH 6,09; teor de água- 0,20%, teor de glicerol-99,85%.

Os grupos experimentais foram distribuídos de acordo com a dose de glicerol administrada diariamente: 0 (controle/salina), 200, 400, 800 e 1600 mg de glicerol/kg de peso vivo (Figura 1).

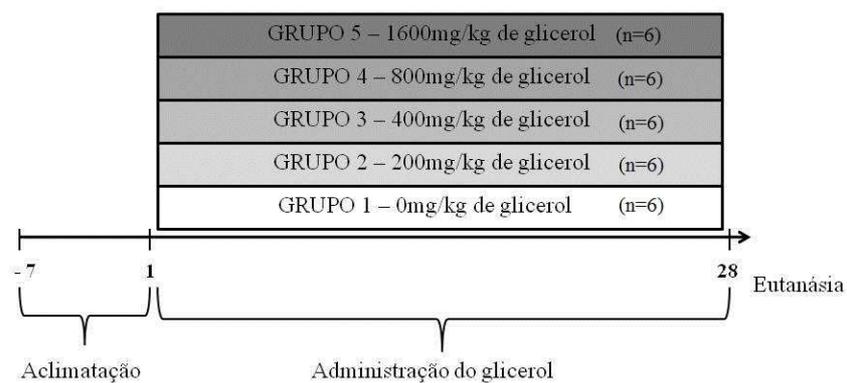


Figura 1. Fluxograma e grupos experimentais.

Procedimento experimental

O período experimental foi de 28 dias, no qual, ração e água foram mantidos *ad libitum*. O glicerol foi fornecido nas doses específicas de cada grupo, sempre às 08:00 horas da manhã. A ração fornecida e as sobras foram pesadas e registradas para determinação do consumo de ração diário individual. Os animais foram pesados no início e ao final do experimento para determinação do ganho de peso médio diário (Peso final

– Peso inicial / 28 dias). O volume de água ingerido bem como o volume urinário diários foram mensurados com auxílio de provetas.

No vigésimo oitavo dia, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 8 horas e foram eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia geral (Tiopental sódico 35 mg/kg i.p). O sangue foi coletado em um tubo de ensaio, imediatamente após a eutanásia. Em seguida, foi centrifugado e o soro armazenado a -20 °C, para avaliações dos perfis plasmáticos dos animais. Análises de glicose, triacilglicerol, colesterol total e frações HDLc e LDLc + VLDLc plasmáticos foram quantificados por Kit colorimétrico enzimático (Labtest Diagnóstica SA.).

Posteriormente, a cavidade abdominal dos animais foi aberta cirurgicamente até a exposição dos órgãos internos. Em sequência, pâncreas, rins e fígado foram coletados para determinação do peso relativo (peso do órgão / peso vivo do animal antes da eutanásia). Fragmentos de fígado foram retirados, imersos em isopentano e imediatamente criopreservados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em *freezer* a -80 °C. Para este tecido, foram obtidas secções de 10 µm de espessura em criostato LEICA (Berlin, Alemanha) a -20 °C

e os cortes foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina para caracterização da integridade estrutural.

A análise das lâminas histológicas foi realizada em microscópio trinocular Olympus CX31(Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com aumento de 40x e câmera (SC30 CMOS Color Camera for Light Microscopy, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Os demais órgãos (pâncreas e rins) foram coletados e fixados em solução de formalina a 10% por 24 horas e, posteriormente, armazenadas em álcool etílico 70% até o processamento histológico. Todas as amostras foram submetidas às técnicas rotineiras para inclusão em parafina. Secções de 5 µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina-eosina. Imagens digitais foram obtidas utilizando-se sistema de captura e análise de imagens (câmera SC30 CMOS Color Camera for Light Microscopy, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP).

Para quantificação de extrato etéreo foi utilizado o método Soxhlet e para avaliação de proteína bruta o método Kjeldahl (AOAC, 2000). A matéria seca e as cinzas foram quantificadas de acordo com Silva & Queiroz (2006).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e em seguida à análise de regressão. Para as variáveis triacilgliceróis, AST, VLDLc+LDLc, porcentagem de gordura na carcaça, ganho de peso médio diário e volume urinário foi utilizada a transformação de dados pela opção raiz quadrada. Toda análise estatística foi realizada no programa estatístico Sisvar.

Resultados

A administração de diferentes níveis de glicerol não afetou o ganho de peso médio diário (Tabela 1). De forma semelhante, não houve influência ($P>0,05$) do glicerol sobre o consumo de água e excreção urinária; bem como na análise de proteína bruta. Porém, houve diferença ($P<0,05$) em relação ao consumo de ração médio diário e percentual de gordura presente na carcaça.

Tabela 1. Desempenho, balanço hídrico e características de carcaça (proteína bruta, extrato etéreo, matéria seca e cinzas) de ratos *Wistar* recebendo diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.

| Variável | Glicerol, mg/kg | | | | | CV (%) | Valor de P | | VR |
|-----------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|------|-------------------------|
| | 0 | 200 | 400 | 800 | 1600 | | L | Q | |
| <i>Desempenho</i> | | | | | | | | | |
| Ganho de peso (g/dia) | 2,27 | 1,92 | 2,20 | 2,13 | 1,95 | 19,84 | 0,51 | 0,77 | 2,08 ± 0,8 ¹ |
| Consumo de ração (g/dia) | 30,90 | 26,28 | 27,23 | 25,39 | 23,32 | 19,46 | 0,04 | 0,47 | 17,9 ² |
| Consumo de água (mL/dia) | 22,91 | 21,49 | 21,84 | 22,69 | 22,56 | 11,60 | 0,78 | 0,78 | 24,9 ² |
| Volume de urina (mL/dia) | 5,63 | 4,52 | 5,18 | 7,12 | 6,53 | 20,88 | 0,20 | 0,62 | 7,8 ² |
| <i>Características da carcaça</i> | | | | | | | | | |
| Umidade (%) | 73,61 | 70,82 | 72,04 | 70,30 | 71,38 | 3,62 | 0,30 | 0,13 | 69,2 ± 0,3 ¹ |
| Proteína bruta (%) | 25,28 | 28,54 | 28,32 | 27,21 | 28,11 | 9,24 | 0,34 | 0,35 | 21,4 ± 0,2 ¹ |
| Gordura (%) | 2,64 | 3,00 | 2,72 | 2,55 | 2,01 | 13,96 | 0,04 | 0,41 | 4,1 ± 0,2 ¹ |
| Cinzas (%) | 22,62 | 25,33 | 23,91 | 25,41 | 24,43 | 9,22 | 0,39 | 0,14 | - |

L: regressão linear; Q: regressão quadrática; VR: valores de referência

¹:Franco et al., 2007

²:Carvalho et al., 2006

Como apresentado na Tabela 1, os valores de consumo de ração e quantidade de gordura na carcaça apresentaram redução linear, conforme o aumento da dose de glicerol (Figura 2).

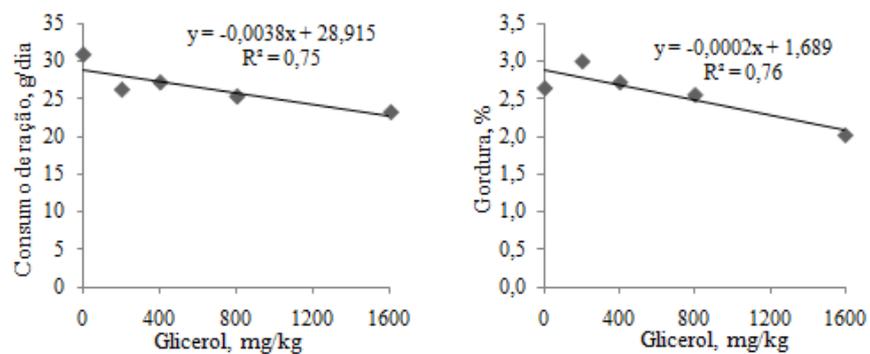


Figura 2. Consumo de ração e porcentagem de gordura na carcaça de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias.

Os parâmetros plasmáticos analisados mostraram que a utilização do glicerol como suplemento não alterou os níveis de triacilgliceróis. Quanto às variáveis glicemia, colesterol total, HDLc, VLDLc + LDLc, ALT e AST, houve efeito quanto à utilização de diferentes níveis de glicerol na dieta (Tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros sanguíneos de ratos *Wistar* suplementados com diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.

| Variável | Glicerol, mg/kg | | | | | CV (%) | Valor de P | | VR |
|--------------------------|-----------------|-------|-------|--------|-------|--------|------------|-------|---------------------------|
| | 0 | 200 | 400 | 800 | 1600 | | L | Q | |
| Glicemia (mg/dL) | 91,00 | 89,83 | 95,67 | 99,00 | 84,50 | 10,00 | 0,28 | 0,02 | 108 ± 17,4 ¹ |
| Triacilgliceróis (mg/dL) | 28,26 | 27,46 | 30,12 | 24,68 | 27,22 | 14,13 | 0,65 | 0,67 | 26 a 145 ² |
| Colesterol total (mg/dL) | 95,52 | 91,00 | 96,47 | 107,15 | 85,29 | 10,65 | 0,25 | <0,01 | 87 ± 18,1 ³ |
| HDLc (mg/dL) | 39,44 | 44,65 | 55,45 | 59,53 | 48,22 | 15,83 | 0,08 | <0,01 | 48 ± 11,4 ³ |
| VLDLc+LDLc (mg/dL) | 56,08 | 46,36 | 40,47 | 37,62 | 37,32 | 21,62 | <0,01 | 0,04 | 35,2 ± 13,4 ⁴ |
| ALT(U/L) | 47,83 | 46,30 | 36,48 | 40,69 | 40,44 | 14,35 | 0,07 | 0,04 | 48,4 ± 6,46 ⁵ |
| AST (U/L) | 109,9 | 101,5 | 75,3 | 66,7 | 126,4 | 13,05 | 0,24 | <0,01 | 131,7 ± 23,1 ⁵ |

ALT: alanina aminotransferase ; AST: aspartato aminotransferase ; CT: Colesterol Total ; HDLc: High Density Lipoproteins ; LDLc + VLDLc: Low Density Lipoproteins + Very Low Density Lipoproteins; VR: valores de referência.

¹ : Canadian Council on Animal Care, 1993

² :Harkness &Vagner, 1993

³ :Dantas et al., 2006

⁴ :Guimarães & Mazáro, Unifesp, 2004

⁵ : Melo et al., 2012

Como evidenciado na Tabela 2, para a variável glicemia e colesterol total houve um efeito quadrático com aumento até a dose de 800 mg/kg, seguido de queda com a maior dose. Já para os níveis de HDLc, houve um aumento até a dose de 800 mg/kg, com tendência de queda na dose de 1600 mg/kg, porém, ainda dentro do padrão para a espécie. Para os níveis de VLDLc + LDLc, houve uma queda conforme o aumento da dose também se mantendo dentro dos padrões. E a enzimas hepáticas AST e ALT apresentaram comportamento quadrático decaindo

até a dose de 800 mg/kg de glicerol ($P < 0,05$), com tendência a aumento na maior dose, como apresentado na Figura 3.

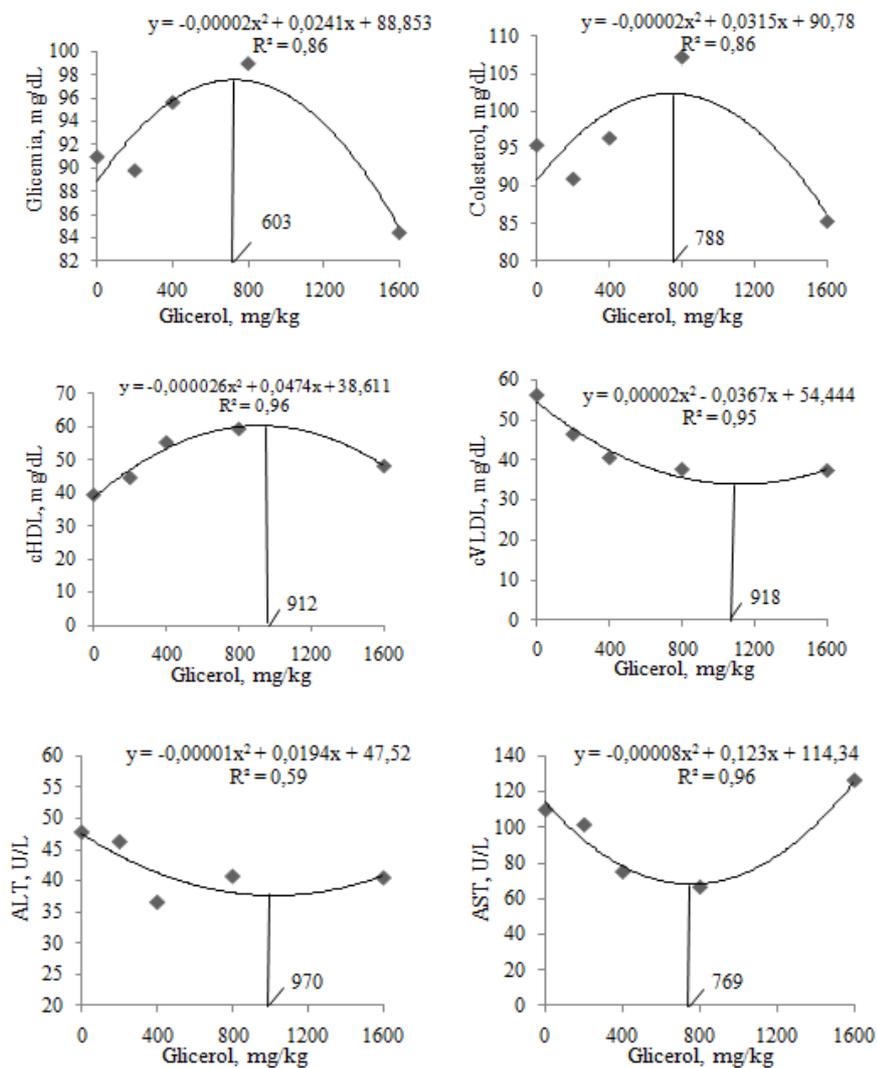


Figura 3. Parâmetros sanguíneos de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias. ALT: Alanina transaminase; AST: aspartato transaminase.

Considerando todos os níveis de suplementação de glicerol estudados, não houve alteração do peso relativo de órgãos parenquimatosos ($P>0,05$). Os dados referentes ao leucograma diferiram ($P>0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 3, figura 4), porém, na contagem diferencial para linfócitos e neutrófilos não houve alteração entre os grupos experimentais ($P<0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos e leucograma de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol por gavagem durante 28 dias.

| Variável | Glicerol, mg/kg | | | | | CV (%) | Valor de P | | VR |
|--|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|------|---------------------------|
| | 0 | 200 | 400 | 800 | 1600 | | L | Q | |
| <i>Peso relativo de órgãos</i> | | | | | | | | | |
| Fígado (%) | 3,20 | 3,21 | 3,24 | 3,29 | 3,10 | 10,08 | 0,85 | 0,25 | 2,90 ¹ |
| Rins (%) | 0,43 | 0,42 | 0,41 | 0,39 | 0,41 | 10,07 | 0,36 | 0,30 | 0,61 ¹ |
| Coração(%) | 0,39 | 0,38 | 0,39 | 0,37 | 0,42 | 9,77 | 0,19 | 0,38 | 0,32 ¹ |
| <i>Leucograma</i> | | | | | | | | | |
| Leucócitos totais (cel/mm ³) | 15675 | 16125 | 14258 | 15580 | 11467 | 17,80 | <0,01 | 0,30 | 6000 a 17000 ² |
| Linfócitos (%) | 62,33 | 63,17 | 61,17 | 64,60 | 60,67 | 7,67 | 0,61 | 0,39 | 66,6 a 90,3 ³ |
| Neutrófilos (%) | 34,33 | 34,83 | 38,50 | 34,00 | 38,67 | 14,01 | 0,24 | 0,78 | 6,0 a 42,0 ⁴ |

VR : valores de referência

¹ : Dantas et al., 2006

² :Harknes & Wagner, 1993

³ :Laboratório Charles River, 2008

⁴ :Mitruka & Rawnsley, 1997

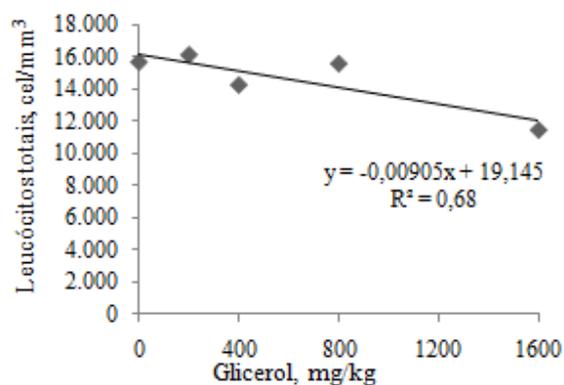


Figura 4. Leucócitos totais de ratos recebendo glicerol via gavagem durante 28 dias.

Quanto à avaliação histológica dos órgãos analisados (pâncreas, rins e fígado), não se observaram lesões em quaisquer tecidos provenientes dos animais recebendo diferentes níveis de glicerol por gavagem.

Discussão

O emprego do glicerol na formulação de dietas para animais de produção tem despertado interesse por se tratar de um produto rico em energia com alta eficiência na sua utilização. No entanto, os resultados encontrados na literatura com relação a esta variável são conflitantes, dependendo da espécie, pureza e tempo de utilização, mostrando que o glicerol pode melhorar o ganho de peso (KIJORA et al. 1995; VIEIRA et

al. 2002; SAKOMURA et al. 2004; GROESBECK et al. 2008), não ter efeito (BERENCHTEIN et al. 2010) ou até mesmo reduzir a massa corpórea dos animais (KIJORA et al. 1995; DELLA CASA et al. 2009; SCHIECK et al. 2010).

Em animais de produção, como suínos, aves e ruminantes em geral, a dosagem de glicerol é acrescentada na ração em porcentagem por tonelada, levando a uma grande variação na quantidade desse produto consumido (KIJORA et al. 1995). No presente experimento, a dosagem foi efetuada em mg/kg, via gavagem, garantindo o consumo exato do glicerol puro, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos metabólicos e fisiológicos deste suplemento. O consumo de ração foi menor conforme incremento da dose de glicerol, fato explicado possivelmente pelo aumento da energia. Cerrate et al. (2006) em um experimento avaliando frangos de corte com inclusão de 5 e 10% de glicerina contendo 3527 kcal/kg de energia metabolizável, também demonstraram queda no consumo de ração para o nível de 10%. Em outro estudo realizado em humanos (Björvell et al. 1982) a administração de 7,5 g de glicerol antes das refeições também diminuiu o consumo alimentar. De forma semelhante, Grinker et al. (1980) avaliando o efeito do glicerol,

administrado via oral e parenteral sobre a ingestão alimentar em ratos Sprague-Dawley, com doses de 1 g/kg/dia e 160 mg/kg/dia respectivamente, também observaram redução da ingestão alimentar. Sugere-se que a diminuição do consumo está relacionada não somente ao incremento dos níveis de glicerol plasmático, como também a outras ações metabólicas, como alterações de níveis de ácidos graxos livres no sangue e a relação glicerol/ácidos graxos livres plasmáticos.

Uma vez absorvido, o glicerol pode ser convertido em glicose, via gliconeogênese, ou oxidado para a produção de energia, via glicólise e ciclo de Krebs (ROBERGS E GRIFFIN, 1998). Os resultados do presente estudo demonstram que o aumento da administração de glicerol provocou incremento da glicemia até a dose de 800 mg/kg, porém, mantendo-se dentro dos padrões para a espécie. A partir da dose de 1600 mg/kg foi observada uma queda neste parâmetro. Observando-se o comportamento da glicemia, especula-se que a queda nestes valores na maior dose empregada seja decorrente da produção aumentada de insulina em resposta a um aumento mais acentuado da glicemia em curto prazo (Moreno et al. 2011), promovendo inclusive interações no centro da saciedade e reduzindo o consumo alimentar. Entretanto, mais estudos são

necessários incluindo a quantificação dos níveis de insulina para confirmação desta hipótese.

Quanto aos valores de triacilgliceróis não foi verificada diferença entre as concentrações deste parâmetro entre os grupos, sugerindo que o glicerol foi utilizado para o fornecimento e/ou reserva de energia. Em revisão de literatura publicada por Brisson et al. (2001), relatou-se que o glicerol pode ser utilizado como precursor para a síntese de triacilgliceróis pelo organismo, porém, o tipo e a quantidade de gordura na dieta são determinantes para esta síntese. Assim, considera-se que a dose suplementar de glicerol do presente estudo foi baixa (inferior a 2%), de forma a evitar a toxicidade do glicerol uma vez que conforme o SIDS Initial Assessment Report, (2002), relatou-se um índice de mortalidade de 15% com doses próximas a 2300 mg/kg por 44 dias.

De acordo com Narayan & McMullen (1979) aves e ratos alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (30% na dieta) incrementaram os níveis plasmáticos de colesterol, corroborando o presente estudo, onde se observou que a inclusão do glicerol na dieta na forma de gavagem promoveu um aumento nos índices de colesterol total até a dose de 800 mg/kg. Os índices de HDLc acompanharam os valores

de colesterol total, ocorrendo um incremento até a dose de 800 mg/kg, tornando-se benéfico fisiologicamente aos animais. Fato semelhante também foi encontrado por Neu et al. (2011) onde verificaram que quando oferecido glicerol para tilápias-do-nilo, o índice de colesterol HDLc foi maior quando os níveis de inclusão foram de 7,5%, denotando a utilização do produto como fonte energética benéfica. Da mesma forma, Lin et al. (1976) acrescentam que o glicerol pode causar aumento das lipoproteínas plasmáticas, como do HDLc, devido a sua quantidade de energia, assemelhando-se ao etanol quando consumido em baixas concentrações. Estes mesmos autores citam que o aumento destas lipoproteínas pode ser interessante, tornando o glicerol uma ferramenta para a proteção de cardiopatias e regressão de aterosclerose. Estes resultados coincidem com relatos prévios de consumo frequente de baixas doses de álcool (molécula semelhante ao glicerol) provocando um aumento na fração HDLc e estimulando o transporte reverso de lipídeos (BAER et al., 2002, VAN DER GAFF et al., 2001).

De acordo com este estudo, não foi observado nenhum tipo de lesão nos rins, pâncreas e fígado, mantendo-se dentro da normalidade para a linhagem. Adicionalmente, Reynolds et al. (1998) afirmaram que a

ingestão de soluções com glicerol pode ser considerada uma maneira segura e efetiva de induzir um estado de hiper hidratação em cães, não causando efeitos adversos no trato gastrointestinal, renal ou função muscular. Porém, Lin et al. (1976) demonstraram que ratos que ingeriram solução de glicerol 5% por seis meses apresentaram uma moderada injúria renal, que pode ser justificada pelo tempo de administração do glicerol.

Relativo ao consumo de água e ao volume urinário, os resultados do presente estudo não mostraram diferença quanto aos níveis de suplementação de glicerol, concordando com Brief e Davis (1982) que, utilizando ratos diabéticos recebendo glicerol via subcutânea (40 ml/kg), também não observaram alteração no consumo de água. Já Lions e Riedesel (1993) verificaram que a administração de solução de 5% de glicerol por gavagem em ratos aumentou a retenção de fluidos e atenuou a micção em relação aos animais que consumiram apenas água, demonstrando então efeitos hidratantes do glicerol. Porém, cabe ressaltar que esta variável pode não ter sido afetada devido à quantidade de glicerol suplementado ser inferior a 2% em todos os grupos.

Quanto às variáveis AST e ALT, tal resultado permite levantar a hipótese de que, dependendo da dose, o glicerol foi benéfico, fato confirmado pelas análises histológicas do fígado onde não foi observado nenhum tipo de lesão tecidual neste órgão. A determinação simultânea das enzimas AST e ALT fornece uma clara indicação da provável lesão hepática quando aumentadas, porém, no presente estudo pode-se observar uma diminuição das mesmas até o nível de 800 mg/kg, indicando que o glicerol pode ser considerado um protetor, porém, sem previsão de padrão. Na literatura há carência de informações referentes aos níveis destas enzimas e o efeito do glicerol sobre as mesmas, deixando evidente a necessidade de maiores estudos quanto a estes parâmetros (SILLERO et al. 2005).

Do ponto de vista de produção animal, é importante que haja avaliação do peso visceral já que o conhecimento das mudanças nos pesos dos órgãos é essencial para entender os fatores que afetam o uso de energia pelos diferentes tecidos, considerando produção dos órgãos *versus* atividade metabólica por unidade de peso (KOUAKOU et al. 1997). De acordo com as dosagens empregadas, não houve diferença entre os tratamentos para esta variável. Logo, as respostas foram semelhantes às

encontradas por Lin et al. (1976) em pesquisas avaliando o peso do fígado em frangos alimentados por três semanas com dieta contendo 20% de glicerina, sugerindo que o glicerol não acarreta em mudanças nesse parâmetro fisiológico, mantendo-o dentro da normalidade.

Referente à contagem de leucócitos totais, houve um decréscimo conforme o aumento de glicerol nos grupos, porém, mantendo-se dentro do padrão para a espécie, não causando nenhum tipo de transtorno fisiológico aos animais. Quanto à contagem diferencial, não houve alteração decorrente das doses administradas, também dentro da faixa normal para ratos *Wistar*. Esses resultados já eram de certa forma, esperados, uma vez que estes animais estavam mantidos em ambiente controlado e na ausência de desafios.

Quanto aos parâmetros de análise química da carcaça, a proteína bruta não alterou conforme os diferentes níveis de glicerol. Sabe-se que o glicerol pode, possivelmente, promover efeitos benéficos na retenção de aminoácidos e nitrogênio muscular (CHANG et al. 1981), porém, neste estudo, níveis de até 1600mg/kg na alimentação de ratos não causou alteração nas características de carcaça para proteína bruta nos animais. Estes resultados corroboram Cerrate et al.(2006), que avaliaram níveis de

até 9% de glicerina na dieta de suínos sem alterações de carcaça para este parâmetro. Já para os níveis de extrato etéreo da carcaça, os índices decaíram conforme o aumento dos níveis de glicerol administrado, fato que pode ser explicado pelo glicerol ser um agente gliconeogênico, estimulando a remoção da gordura da carcaça para a geração de energia. Lin et al (1976) relatam que o glicerol apresenta efeito negativo na síntese de ácidos graxos na carcaça, sugerindo que acontece em virtude do tecido hepático ficar com um potencial redox reduzido após a ingestão de glicerol.

Conclusão

A partir dos dados obtidos sugere-se que o glicerol nas doses estudadas pode ser utilizado como suplemento alimentar na composição da dieta. Houve efeito supostamente benéfico crescente para os animais, até a dose de 800 mg/kg para os parâmetros AST, ALT, colesterol total, HDLc, LDLc + VLDLc e gordura da carcaça, porém, para adquirir maior segurança quanto ao seu uso, necessitam-se maiores estudos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Adicionalmente os autores agradecem o suporte do Prof. Raimundo Vicente de Sousa e o técnico Willian Cesar Cortez, do setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

REFERÊNCIAS

ANP (NATIONAL AGENCY OF PETROLEUM, NATURAL GAS AND BIOFUELS). **Biodiesel**, 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1322937836263> Acesso: 03/12/2011.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). **Official Methods of Analysis**, vol. 17, Washington, USA, 2000.

BAER D. J., JUDD J. T., CLEVIDENCE B. A., MUESING R.A., CAMPBELL W. S., BROWN E. D. Moderate alcohol consumption lowers risk factors for cardiovascular disease in post menopausal women a controlled diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75: p. 593-599, 2002.

BERENCHTEIN, B.; COSTA, L. B.; BRAZ, D. B.; ALMEIDA, V. V.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Use of glycerol in growing and finishing

pig diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1491-1496, 2010.

BJÖRVELL H., RÖSSNER S., Effects of oral glycerol on food intake in man. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, p. 262-265, USA, 1982.

BRIEF, D. J.; DAVIS, J. D. Glycerol reduces food intake in diabetics rats. **Physiology & Behavior**.vol. 29. p. 577-580. Pergamon Press, 1982.

BRISSON, D.; VOHL, M.C.; ST.-PIERRE, J.; GAUDET, D. Glycerol: A neglected variable in metabolic processes? **Bioessays**, vol. 23, n. 6, p.534-542, 2001.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals. v. 1, ed. 2, p. 298, 1993.

CARVALHO, G.D; MASSENO, A.P.B.; ZANINI, M.S.; ZANINI, S.F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P. MAUAD, H. Clinical evaluation of

laboratory rats (*Rattus norvegicus* Wistar Strain): sanitary, biological and physiological parameters. **Revista CERES**, p. 51-57, 2009.

CLIFFORD C.B., GIKNIS M. L. A. Clinical Laboratory Parameter for Crl: WI (Han) Disponível em: http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_Wistar_Han_clin_lab_parameters_08.pdf.
Acessado em 05/08/2013.

CRUTZEN, P. J., MOSIER, A. R., SMITH, K. A., WINIWARTER, W. N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 8, p. 389-395, 2008.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Reference values of some physiological parameters in the rats of the Central Biotery at the State University of Maringá, State of Paraná. **Revista Acta Scientiarum Health Science**. p. 165-170, 2006.

DELLA CASA, G.; BOCHICCHIO, D.; FAETI, V.; MARCHETTO, G.; POLLETTI, E.; ROSSI, A.; GARAVALDI, A.; PANCIROLI, A.; BROGNA, N. Use of pure glycerol in fattening heavy pigs. **Meat Science**, vol. 81, n. 1, p. 238-244, 2009.

DINI, M., CORBIANCO, S., ROSSI, B., LUCACCHINI, A. Hyperhydrating with glycerol: effects on thermoregulation, hydration and athletic performance during specific exergonic exercise in a warm-humid environment. **Sport Sciences for Health**, vol. 2, n. 1, p. 1-7, 2007.

FISHER, L.; KOPF, R.; LOESER, A.; MEYER, G. Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung der Glykolester. Berücksichtigung von 1,3-butylenglykol. **Research in Experimental Medicine**, vol. 115, n. 1-2, p. 22-39, 1949.

FRANCO, F. S. C., NATALI, A. J., COSTA, N. M. B., LUNZ W., GOMES G. J., JUNIOR, M. A. C., OLIVEIRA, T. T. Effects of creatine supplementation and power training on performance and lean body mass

of rats. **Revista Brasileira de Medicinado Esporte**, v. 13, n. 5, p. 297-302, 2007.

GRINKER, J., STROHMAYER A. J., HOROWITZ, J., HIRSCH J., LEIBEL, R. L., The effect of the metabolite glycerol on food intake and body weight in rats. **Integration of Central and Peripheral Receptors in Hunger and Energy Metabolism Brain Research Bulletin**, v. 5, p. 29-35, USA, 1980.

GROESBECK, C.N. et al. Effect of glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 120-132, 2008.

GUIMARÃES, M.A.; MAZÁRO, R. Valores de referência: Princípios éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004.

HANSEN, C. F.; HERNANDEZA, A.; MULLAN, B. P. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, vol. 49, p. 154–161, 2009.

HARKNESS, J.E. & WAGNER, J.E. Valores de referência: Biologia e clínica de coelhos e roedores. ed.3, Editora Roca, São Paulo (1993).

KAVOURAS, S. A.; ARMSTRONG, L. E.; MARESH, C. M.; CASA, D. J.; HERRERA-SOTO, J. A.; SCHEETT, T. P.; STOPPANI, J.; MACK, G. W.; KRAEMER, W. J. Rehydration with glycerol: endocrine, cardiovascular and thermoregulatory responses during exercise in the heat. **Journal of Applied Physiology**, vol. 100, n. 2, p. 442-450, 2006.

KIJORA, C. et al. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 47, p. 345-360, 1995.

KOUAKOU, B.; GOETSCH, A.L.; PATIL, A. R. Visceral organ mass in wethers consuming diets with different forages and grain levels. **Livestock Production Science**, v.47, p.125-137, 1997.

LAMMERS, P.; KERR, B.J.; WEBER, T.E.; BREGENDAHL, K.; LONERGAN, S.M.; PRUSA, D.U.; AHN, W.C.; STOFFREGEN, W.A.; DOZIER, W.A.; HONEYMAN, M. Growth performance , carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin –supplemented diets. **Journal of Animal Science**, vol. 86, n. 11, p. 2962-2970, 2008.

LIN, E.C.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 46, p. 765-795, 1976.

LIONS, T. P.; RIEDESEL, M. L. Glycerol-induced hyperhydration: its effects on fluids compartments in the rat. **Life Sciences**, vol. 53, n. 23, p. 1779-1787, 1993.

MELO, M. G. D., DÓRIA, G. A. A., SERAFINI, M. R., ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal do Sergipe. **Scientia Plena**. v. 9, n. 4, 2012.

MITRUKA BM; RAWNSLEY, HM. Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. New York, **Masson Publishing**, v. 27, 1997.

NANDAKUMARAN, M ; ANGELAKI, E. ; AL-AZEMI, N. ; AL-SARRAF, H. ; AL-SALEH, E. Influence of coconut oil administration on some hematologic and metabolic parameters in pregnant rats. **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**. vol. 24, n. 10, p. 1254-1258, 2011.

NASCIMENTO, K.F.; GARCIA, R.F.; GAZOLA, V.A., DE SOUZA, H.M.; OBICI, S.; BAZOTTE, R.B. Contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in the defense against short-term insulin induced hypoglycemia in rats. **Journal of Life Sciences**, vol. 82, n.19-20, p. 1018 – 1022, 2008

NAYARAN, K.A., MCMULLEN, J. J., WAKEFIELD T., CALHOUN, W. K. Influence of dietary glycerol on the serum lipoproteins of rats fed a fat-free diet. **Journal Nutrition**, vol. 107, p.2153-5163, 1977.

NEU, D. H., FURUYA, W. M., BOSCOLO, W. R., POTRICH, F. R., LUI, T. A., FIEDEN, A. Glycerol inclusion in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, p. 211-217, 2013.

ROBERGS, R. A. & GRIFFIN S. E. Glycerol: biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 26, p. 145-167, 1998.

SCHIECK, S. J. ; SHURSON, G. C. ; KERR, B. J. ; JOHNSTON, L. J..
Evaluation of glycerol, a biodiesel coproduct, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. **Journal of Animal Science**, v. 88,p. 3927 - 3935, 2010.

SCHOTT, H. C., PATTERSON, K. S., & EBERHART, S. W. Glycerol hyperhydration in resting horses. **Veterinary journal (London, England)**, vol.161, n.2, p. 194-204, 2001.

SILLERO, A., SILLERO M. A. G., SOLS, A. Regulation of the Level of Key Enzymes of Glycolysis and Gluconeogenesis in Liver. **European Journal of Biochemistry**. v. 10, issue 2, p. 351 – 354, 2005.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Ed 3, Viçosa, UFV, 2006.

VAN DER GAAF M. S., VAN TOL A., VERMUNT S. H. F., SHEEK L. M., SCHAAFSMA G., HENDRIKS H. F. J. Alcohol consumptions stimulate early steps in reverse cholesterol transport. **Journal of Lipid Research**. v. 42: p. 2077-2083, 2001.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ANEXOS

Laudo do glicerol – Empresa MAPRIC


CERTIFICADO DE ANÁLISE
GLICERINA BI-DESTILADA

Lote: AUTO120278
 Fabricação: 18/04/12
 Validade: 18/04/14
 Procedência: BRASIL

Origem: BRASIL
 Lote Fabricante: 781
 Ordem Fração: 026153
 Nome Fabricante: ALMAD

Formula: C3H8O3
 No DCB: 04469
 Nome-Classe (NC): Glycerin
 No CAS: 56-81-5

Peso Molecular: 92,09

| Parâmetros | Especificado | Resultados |
|----------------------------------|------------------------------|------------|
| Ácidos Graxos e Ésteres | Máx. 9,1 % | 0,02 |
| Aquecimento | Líquido Viscoso Transparente | De acordo |
| Cloro | Teste | De acordo |
| Densidade (25°C) | Mín. 1,2490 g / mL | 1,2604 |
| Matias pesadas | Máx. 5,0 ppm | < 5 |
| Odor | Característico | De acordo |
| Sulfato | Teste | De acordo |
| Ensaio realizado pelo fabricante | | |
| Cor (APHA) | Máx. 10 | 5,0 |
| pH | 5,2 - 7,8 | 6,09 |
| Teor de Água (%) | Máximo 0,50 | 0,20 |
| Teor de Glicerol (%) | Mínimo 99,50 | 99,85 |

Monografia: PB III - Metodologia do fabricante

Conservar bem fechado ao abrigo da luz em temperatura entre 15 - 30° C.

Aprovado de acordo com as especificações descritas.

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal.

Dr. Lúiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP 14.451

Dr. Rodrigo Moura
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP 48.730

09/05/12

Departamento Técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
 mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 022/12, relativo ao projeto intitulado "Avaliação de parâmetros metabólicos e fisiológicos em ratos recebendo dieta suplementada com glicerol e submetidos a protocolo de exercício aeróbio", que tem como responsável Luciano José Pereira está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 06/09/2012.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 022/12, related to the project entitled "Evaluation of metabolic and physiological parameters in rats receiving diet supplemented with glycerol and subjected to aerobic exercise", under the supervision of Luciano José Pereira, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), and was approved in September 6, 2012.

Lavras, 06 de setembro de 2012

Prof.^a Gabriela Rodrigues Salgado
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP: 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3825 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

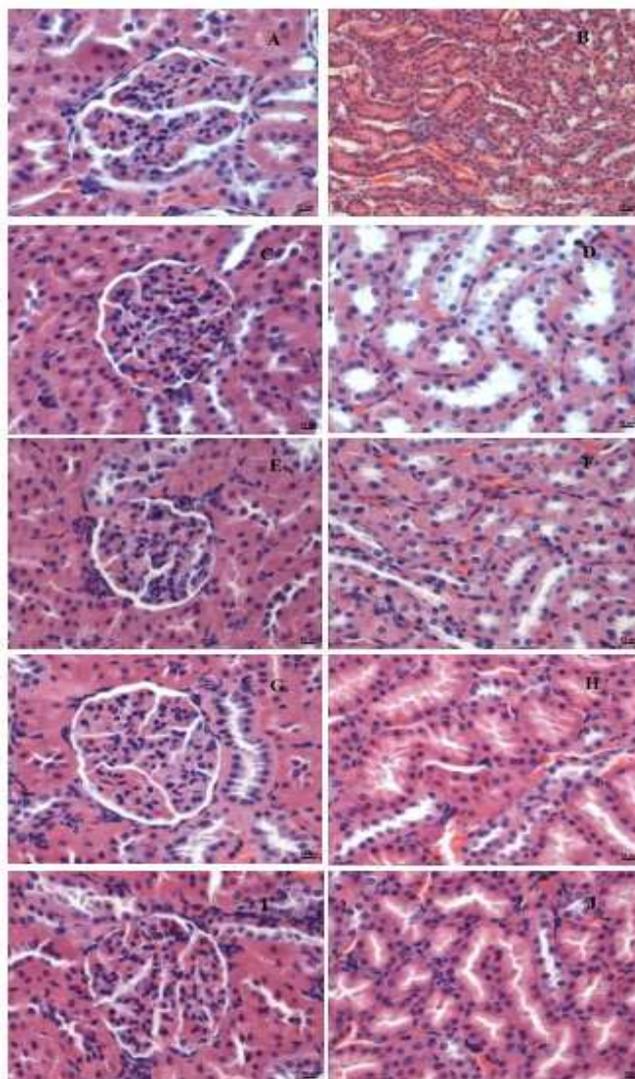


Figura 1. Glomérulos e túbulos renais dos grupos suplementados com diferentes níveis de glicerol na dieta. Objetiva de 40. (A: Glomérulo Grupo 1; B: Túbulo Grupo 1; C: Glomérulo Grupo 2; D: Túbulo Grupo 2; E: Glomérulo Grupo 3; F: Túbulo Grupo 3; G: Glomérulo Grupo 4; H: Túbulo Grupo 4; I: Glomérulo Grupo 5; J: Túbulo Grupo 5.

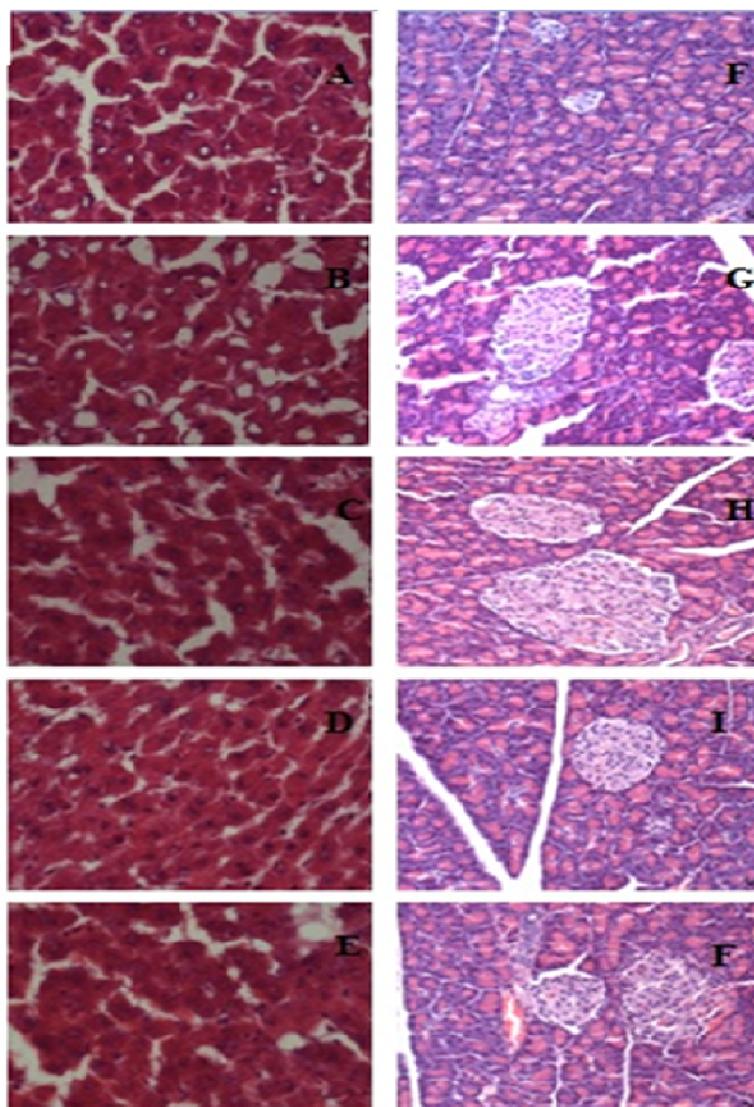


Figura 2. Histologia de fígado e pâncreas dos grupos suplementados com diferentes níveis de glicerol na dieta. Objetiva de 40. (Fígado: A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4; E: Grupo 5 – Pâncreas: F: Grupo 1; G: Grupo 2; H: Grupo 3; I: Grupo 4; J: Grupo 5)

Tabela 1 A Análise de variância e coeficiente de variação para triacilgliceróis de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,587177 | 0,146794 | 0,271 | 0,8939 |
| Linear | 1 | 0,111887 | 0,111887 | 0,206 | 0,654 |
| Quadrático | 1 | 0,100263 | 0,100263 | 0,185 | 0,671 |
| Erro | 24 | 13,014504 | 0,542271 | | |

$$CV (%) = 14,13$$

Tabela 2 A Análise de variância e coeficiente de variação para ALT de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 515,774374 | 128,943594 | 3,480 | 0,0223 |
| Linear | 1 | 126,810770 | 126,810770 | 3,423 | 0,077 |
| Quadrático | 1 | 168,455615 | 168,455615 | 4,546 | 0,043 |
| Erro | 24 | 889,245150 | 37,051881 | | |

$$CV (%) = 14,35$$

Tabela 3 A Análise de variância e coeficiente de variação para AST de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-----------|-----------|--------|--------|
| Glicerol | 4 | 35,600576 | 8,900144 | 5,534 | 0,0027 |
| Linear | 1 | 2,336224 | 2,336224 | 1,452 | 0,078 |
| Quadrático | 1 | 32,356255 | 32,356255 | 20,118 | 0,000 |
| Erro | 24 | 38,599499 | 1,608312 | | |

$$CV (%) = 13,05$$

Tabela 4 A Análise de variância e coeficiente de variação para peso de coração de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,052770 | 0,013192 | 1,301 | 0,2979 |
| Linear | 1 | 0,018520 | 0,018520 | 1,826 | 0,189 |
| Quadrático | 1 | 0,008106 | 0,008106 | 0,799 | 0,380 |
| Erro | 24 | 0,243417 | 0,010142 | | |

$$CV (%) = 9,77$$

Tabela 5 A Análise de variância e coeficiente de variação para peso de rim de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,039317 | 0,09829 | 0,835 | 0,5163 |
| Linear | 1 | 0,010308 | 0,010308 | 0,876 | 0,359 |
| Quadrático | 1 | 0,013090 | 0,013090 | 1,112 | 0,302 |
| Erro | 24 | 0,282503 | 0,011771 | | |

CV (%) = 10,07

Tabela 6 A Análise de variância e coeficiente de variação para peso de fígado de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 2,437760 | 0,609440 | 0,836 | 0,5160 |
| Linear | 1 | 0,026792 | 0,026792 | 0,037 | 0,850 |
| Quadrático | 1 | 1,007925 | 1,007925 | 1,382 | 0,251 |
| Erro | 24 | 17,504337 | 0,729347 | | |

CV (%) = 10,08

Tabela 7 A Análise de variância e coeficiente de variação para colesterol total de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-------------|------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 1411,904693 | 352,976173 | 3,471 | 0,0226 |
| Linear | 1 | 142,547147 | 142,547147 | 1,402 | 0,248 |
| Quadrático | 1 | 859,337693 | 859,337693 | 8,449 | 0,008 |
| Erro | 24 | 2440,943803 | 101,705992 | | |

CV (%) = 10,65

Tabela 8 A Análise de variância e coeficiente de variação para proteína bruta na carcaça de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|-----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 42,783911 | 10,695978 | 1,657 | 0,1927 |
| Linear | 1 | 6,185971 | 6,185971 | 0,959 | 0,337 |
| Quadrático | 1 | 5,954822 | 5,954822 | 0,923 | 0,346 |
| Erro | 24 | 154,888820 | 6,453701 | | |

CV (%) = 9,24

Tabela 9 A Análise de variância e coeficiente de variação para extrato etéreo na carcaça de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,336272 | 0,084068 | 1,704 | 0,1820 |
| Linear | 1 | 0,246398 | 0,246398 | 4,994 | 0,035 |
| Quadrático | 1 | 0,034543 | 0,034543 | 0,700 | 0,411 |
| Erro | 24 | 1,184077 | 0,049337 | | |

CV (%) = 13,96

Tabela 10 A Análise de variância e coeficiente de variação para matéria seca na carcaça de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,379279 | 0,094820 | 1,486 | 0,2377 |
| Linear | 1 | 0,082143 | 0,082143 | 1,287 | 0,268 |
| Quadrático | 1 | 0,164927 | 0,164927 | 2,585 | 0,121 |
| Erro | 24 | 1,531490 | 0,063812 | | |

CV (%) = 4,75

Tabela 11 A Análise de variância e coeficiente de variação para cinzas na carcaça de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|-----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 30,440376 | 7,610093 | 1,515 | 0,2294 |
| Linear | 1 | 3,788311 | 3,788311 | 0,754 | 0,394 |
| Quadrático | 1 | 11,636060 | 11,636060 | 2,316 | 0,141 |
| Erro | 24 | 120,565083 | 5,023545 | | |

CV (%) = 9,22

Tabela 12 A Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso diário de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,132254 | 0,033063 | 0,415 | 0,7962 |
| Linear | 1 | 0,035447 | 0,035447 | 0,445 | 0,511 |
| Quadrático | 1 | 0,006747 | 0,006747 | 0,085 | 0,774 |
| Erro | 24 | 1,912622 | 0,079693 | | |

CV (%) = 19,84

Tabela 13 A Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ração diário de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 186,114635 | 46,528659 | 1,727 | 0,1768 |
| Linear | 1 | 134,572753 | 134,572753 | 4,996 | 0,035 |
| Quadrático | 1 | 14,525701 | 14,525701 | 0,539 | 0,470 |
| Erro | 24 | 646,444620 | 26,935192 | | |

CV (%) = 19,46

Tabela 14 A Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de água diário de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 8,526571 | 2,131643 | 0,319 | 0,8624 |
| Linear | 1 | 0,539660 | 0,539660 | 0,081 | 0,779 |
| Quadrático | 1 | 0,525483 | 0,525483 | 0,079 | 0,782 |
| Erro | 24 | 160,351953 | 6,681331 | | |

CV (%) = 11,60

Tabela 15 A Análise de variância e coeficiente de variação para volume de urina diário de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 1,180031 | 0,295008 | 1,228 | 0,3255 |
| Linear | 1 | 0,418055 | 0,418055 | 1,740 | 0,200 |
| Quadrático | 1 | 0,060327 | 0,060327 | 0,251 | 0,621 |
| Erro | 24 | 5,767619 | 0,240317 | | |

CV (%) = 20,88

Tabela 16 A Análise de variância e coeficiente de variação para glicemia de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-------------|------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 695,643278 | 173,910920 | 2,065 | 0,1171 |
| Linear | 1 | 103,850160 | 103,850160 | 1,233 | 0,278 |
| Quadrático | 1 | 515,065345 | 515,065345 | 6,115 | 0,021 |
| Erro | 24 | 2021,666667 | 84,236111 | | |

CV (%) = 10,00

Tabela 17 A Análise de variância e coeficiente de variação para leucócitos totais de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------------|-----------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 85292359,195402 | 21323089,798851 | 3,163 | 0,0319 |
| Linear | 1 | 61324673,076923 | 61324673,076923 | 9,097 | 0,006 |
| Quadrático | 1 | 7667872,447032 | 7667872,447032 | 1,138 | 0,297 |
| Erro | 24 | 161780916,666667 | 6740871,527778 | | |

CV (%) = 17,80

Tabela 18 A Análise de variância e coeficiente de variação para linfócitos de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|-----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 54,673563 | 13,668391 | 0,599 | 0,6668 |
| Linear | 1 | 6,219391 | 6,219391 | 0,273 | 0,606 |
| Quadrático | 1 | 17,314852 | 17,314852 | 0,759 | 0,392 |
| Erro | 24 | 547,533333 | 22,813889 | | |

CV (%) = 7,67

Tabela 19 A Análise de variância e coeficiente de variação para neutrófilos de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|----------|----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 0,919528 | 0,229882 | 1,221 | 0,3282 |
| Linear | 1 | 0,275201 | 0,275201 | 1,461 | 0,238 |
| Quadrático | 1 | 0,019799 | 0,019799 | 0,105 | 0,749 |
| Erro | 24 | 4,519703 | 0,188321 | | |

CV (%) = 7,24

Tabela 19 A Análise de variância e coeficiente de variação para umidade de carcaça de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|------------|-----------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 37,515557 | 9,378889 | 1,391 | 0,2670 |
| Linear | 1 | 7,633504 | 7,633504 | 1,132 | 0,298 |
| Quadrático | 1 | 16,269559 | 16,268559 | 2,413 | 0,133 |
| Erro | 24 | 161,838767 | 6,743282 | | |

CV (%) = 3,62

Tabela 20 A Análise de variância e coeficiente de variação para HDLc de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-------------|-------------|--------|--------|
| Glicerol | 4 | 1572,785020 | 393,196255 | 6,401 | 0,0012 |
| Linear | 1 | 203,492135 | 203,492135 | 3,313 | 0,081 |
| Quadrático | 1 | 1248,241592 | 1248,241592 | 20,320 | 0,000 |
| Erro | 24 | 1474,278367 | 61,428265 | | |

CV (%) = 15,83

Tabela 21 A Análise de variância e coeficiente de variação para VLDLc + LDLc de ratos Wistar suplementados com diferentes níveis de glicerol.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------|----|-------------|------------|-------|--------|
| Glicerol | 4 | 1368,044524 | 342,011131 | 3,737 | 0,0182 |
| Linear | 1 | 784,324918 | 784,324918 | 8,570 | 0,008 |
| Quadrático | 1 | 456,297492 | 456,297592 | 4,986 | 0,036 |
| Erro | 24 | 2013,533883 | 91,524267 | | |

CV (%) = 21,62