**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados
com dietas contendo níveis crescentes de glicerina**

Gislaine Goretti Romano

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2012**

Gislaine Goretti Romano
Zootecnista

**Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas
contendo níveis crescentes de glicerina**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Romano, Gislaine Goretti

Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina / Gislaine Goretti Romano.- - Piracicaba, 2012.

78 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alimento alternativo 2. Dieta animal 3. Frangos de corte 4. Glicerina 5. Metabolismo animal 6. Nutrição animal 7. Ração I. Título

CDD 636.213
R759e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À Deus, a luz que me faz crescer a cada dia e por providenciar tudo o que tenho e sou.

Aos meus pais Irmi Romano e Maria Conceição Romano, meus grandes exemplos de vida e por estarem sempre presente, mesmo com a distância física.

À minha irmã, Giselda Romano, pelo incentivo e amizade.

Ao meu noivo, Fábio que me deu equilíbrio e apoio sempre, dividindo comigo todas as alegrias e dificuldades com muita paciência, compreensão, carinho e amor!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela amizade e orientação, pelos conhecimentos compartilhados durante toda a minha trajetória, por suas múltiplas e excelentes sugestões e por nunca deixar de acreditar em mim. Obrigada por inserir tamanha evolução científica e pessoal na minha formação. Minha eterna gratidão!

Ao Prof. Valdomiro Shigueru Miyada, pelos ensinamentos e pela preocupação em tornar seus alunos bons oradores.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Zootecnia e de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelo convívio e amizade durante o curso.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante o curso de mestrado

À amiga Michele, por ser uma pessoa generosa e sincera, por todas as nossas conversas e risadas, e principalmente, pelo grande valor que ela atribui a mim, tanto profissional como pessoal.

Aos amigos Rafaela, Leonardo, Kelen, Vivi, Carla e Maicon pela ajuda profissional durante o curso de mestrado, e pelos momentos agradáveis.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Zootecnia de Não Ruminantes, Henrique, Bruna e em especial Célia por toda amizade e conselhos.

Aos funcionários do Setor de Avicultura Chico, Filó e Alexandre, pela amizade e auxílio fundamental na condução dos experimentos.

Ao funcionário da Fábrica de Ração, Carlão, pela ajuda sempre com muita dedicação e eficiência na produção das rações experimentais.

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação do programa Ciência Animal e Pastagens, pela amizade e companheirismo em especial a Carol, Pamela, Danilo, Cristiano, Gustavo, Bruno, Priscila, Mila, Thaline, Jacqueline.

Àqueles que aqui não foram citados, mas contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

*"A vida não é um corredor reto e tranquilo
que nós percorremos livres e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens
pelas quais nós devemos procurar nosso caminho,
perdidos e confusos,
de vez em quando presos em um beco sem saída.*

*Porém se tivermos fé,
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós."*

A. J. Cronin

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Biodiesel.....	21
2.2 Glicerina.....	22
2.3 Glicerol: caracterização e metabolismo.....	24
2.4 Uso da glicerina na alimentação animal.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Experimento I.....	33
3.1.1 Instalações experimentais e animais.....	33
3.1.2 Delineamento experimental.....	34
3.1.3 Dietas e tratamentos experimentais.....	34
3.1.4 Parâmetros avaliados.....	37
3.1.4.1 Concentração de glicerol no soro sanguíneo das aves.....	37
3.1.4.2 Determinação dos parâmetros sanguíneos.....	37
3.1.4.3 Concentração de glicerol no fígado das aves.....	38
3.1.5 Análises estatísticas.....	38
3.2 Experimento II.....	39
3.2.1 Instalações experimentais e animais.....	39
3.2.2 Delineamento experimental.....	40
3.2.3 Dietas e tratamentos experimentais.....	40
3.2.4 Parâmetros avaliados.....	44
3.2.4.1 Consumo de água e ração.....	44
3.2.4.2 Umidade das excretas.....	44
3.2.4.3 Umidade do conteúdo ileal.....	44
3.2.4.4 Avaliação histológica do duodeno.....	45

3.2.5 Análises estatísticas.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Experimento I.....	47
4.1.1 Concentração de glicerol no soro sanguíneo e no fígado das aves.....	47
4.1.2 Parâmetros sanguíneos.....	51
4.2 Experimento II.....	52
4.2.1 Consumo de água e ração.....	52
4.2.2 Umidade das excretas e conteúdo ileal.....	56
4.2.3 Avaliação histológica do duodeno.....	59
5 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	75

RESUMO

Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina

Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de identificar a resposta metabólica dos animais consumindo dietas contendo glicerina e verificar o efeito deste ingrediente em alguns parâmetros sanguíneos. No Experimento I foram utilizados 100 frangos de corte com 20 dias de idade, alojados em gaiolas de metabolismo, distribuídos em um delineamento inteiramente aleatorizado, com 5 tratamentos, 4 repetições e 5 aves por gaiola. Os tratamentos consistiram de uma dieta controle, formulada à base de milho e farelo de soja, e outras quatro dietas formuladas com 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0% de glicerina de biodiesel. A glicerina continha 83,63% de glicerol, 1,83% de sódio e 397 mg/Kg de metanol e foi considerado o valor energético de 3.258 kcal EMAn/kg. As dietas foram isoenergéticas e com valores ajustados dos demais nutrientes. Para os parâmetros sanguíneos (colesterol e triglicerídeos), concentração de glicerol no fígado e peso do fígado não houve efeito significativo ($P>0,05$) da inclusão de glicerina. A concentração de glicerol no soro das aves consumindo 10% de glicerina aumentou nos primeiros 9 dias de ingestão da dieta ($P<0,05$), retornando ao nível do controle. No Experimento II, de 1 a 42 dias de idade, foram utilizados 160 frangos de corte, distribuídos em um delineamento inteiramente aleatorizado com 5 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos utilizados foram semelhantes aos descritos no Experimento I. Na primeira fase, grupos de 8 aves foram criadas em gaiolas de metabolismo providas de aquecimento. Na segunda fase, a partir dos 21 dias de idade, as aves foram transferidas de gaiolas e mantidas 4 aves por grupo. As gaiolas eram equipadas com bandeja para coleta de excretas e comedouro e bebedouro tipo calha. Houve um aumento significativo ($P<0,05$) da ingestão de água pelas aves alimentadas com 7,5% e 10,0% de glicerina no 4º e 8º dias de idade. O consumo de ração aumentou ($P<0,05$) no 8º e 12º dias de idade das aves nos tratamentos com 2,5% e 7,5% de glicerina e houve redução do consumo com 10,0% de glicerina. A umidade das excretas aumentou ($P<0,05$) para dietas contendo 5,0%, 7,5% e 10,0% de glicerina no 16º e 20º dias de idade. As diferenças não foram significativas para essas variáveis nas idades. Não houve diferença ($P>0,05$) para a umidade do conteúdo ileal das aves aos 42 dias. Houve efeito linear ($P<0,01$) dos níveis de glicerina, aumentando a profundidade de cripta e reduzindo a relação vilo:cripta, sem afetar o comprimento da vilosidade. Níveis elevados de glicerina na ração podem induzir alterações metabólicas em frangos de corte com aumento do glicerol sanguíneo, do consumo de água, da umidade das excretas e da taxa de reposição celular do epitélio intestinal.

Palavras-chave: Fonte de energia; Alimento alternativo; Nutrição; Ração para aves

ABSTRACT

Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed diets with increasing levels of glycerin

Two experiments were conducted with the objective of identifying the metabolic response of chickens fed diets containing glycerin and verify the effect of this ingredient in some blood parameters. In Experiment I, 100 broilers with 20 days of age were housed in metabolism cages and distributed in a completely randomized design with 5 treatments, 4 replications and 5 birds per cage. Treatments consisted of a control diet, based on corn and soybean meal, and four other diets with 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10.0% biodiesel glycerin. The glycerin contained 83.63% glycerol, 1.83% sodium and 397 mg/kg of methanol and the metabolizable energy value of 3.258 kcal/kg was considered for formulation. The diets were isoenergetic and with values adjusted for the other nutrients. For the blood parameters (cholesterol and triglycerides), glycerol concentration in the liver and liver weight there was no significant effect ($P>0.05$) of inclusion of glycerin. The glycerol concentration in the serum of birds consuming 10% glycerin increased during the first 9 days of ingestion of diet ($P<0.05$), then returning to the level of the control until 35 d of age. In Experiment II, from 1 to 42 days of age, 160 chicks were distributed in a completely randomized design with 5 treatments and 4 replications. The treatments were similar to those described in Experiment I. In the first phase, groups of 8 birds were raised in heated brooders. In the second phase, from 21 to 42 d of age, the birds were transferred of cages and maintained in groups of 4 birds. The cages were equipped with a tray for excreta collection and trough type feeder and drinker. There was a significant increase ($P<0.05$) in water intake in birds fed 7.5% and 10.0% of glycerin on the 4th and 8th days. The feed intake increased ($P<0.05$) on the 8th and 12th days for the birds in treatments with 2.5% and 7.5% of glycerin and there was a decrease in consumption with 10.0% glycerin. The moisture of the excreta increased ($P<0.05$) for diets containing 5.0%, 7.5% and 10.0% glycerin at the 16th and 20th days old. The differences were not significant for these variables at the other ages. There was no difference ($P>0.05$) for moisture in the ileal contents of birds at 42 days. There was a linear effect ($P<0.01$) of the levels of glycerin, increasing crypt depth and reducing the ratio villus: crypt ratio, without affecting the length of the villi. High levels of glycerin in the diet may induce metabolic changes in broilers with increase in blood glycerol, water consumption, moisture of the excreta and in the rate of cell replacement in the intestinal epithelium.

Keywords: Energy source; Alternative feed; Nutrition; Poultry feed

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equação simplificada da reação de transesterificação.....	22
Figura 2 - Fórmula estrutural plana do glicerol.....	25
Figura 3 - Reações bioquímicas envolvidas na síntese de glicerol e conversão metabólica para glicerol-3-fosfato, fosfatase e triacilglicerol.....	27
Figura 4 - Galpão experimental. A, vista externa e B, vista interna das instalações..	33
Figura 5 - Gaiolas de metabolismo em A, vista frontal e B, vista lateral.....	34
Figura 6 - Coleta de sangue.....	38
Figura 7 - Remoção da digesta ileal.....	45
Figura 8 - Concentração de glicerol no soro sanguíneo em frangos de corte de 23 aos 35 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta.....	47
Figura 9 - Consumo médio de ração (g) de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta.....	49
Figura 10 - Estimativa do consumo de água em frangos de corte 1 a 40 dias de idade alimentados com glicerina na dieta.....	53
Figura 11 - Estimativa do consumo de ração em frangos de corte 1 a 40 dias de idade alimentados com glicerina na dieta.....	54
Figura 12 - Relação do consumo de água (mL) com o consumo de ração (g) de frangos de corte alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta...	56
Figura 13 - Efeito das dietas com níveis crescentes de glicerina bruta na umidade das excretas em frangos de corte.....	57
Figura 14 - Aspecto da digesta ileal durante a coleta.....	59
Figura 15 - Fotomicrografia da mucosa de duodeno de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (GB) na dieta. (setas) evidenciando os pontos utilizados para medição da altura de vilosidades e (cabeças de seta) para a profundidade de criptas. Em A-B: tratamento controle. Em C-D: tratamento com 2,5% de GB. Em E-F: tratamento com 5,0% de GB.....	61
Figura 16 - Fotomicrografia da mucosa de duodeno de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (GB) na dieta. (setas) evidenciando os pontos utilizados para medição da altura de	

vilosidades e (cabeças de seta) para a profundidade de criptas. Em A-B: tratamento com 7,5% de GB. Em C-D: tratamento com 10,0% de GB.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da glicerina bruta utilizada nas rações	35
Tabela 2 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 21 a 35 dias.....	36
Tabela 3 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 1 a 7 dias.....	41
Tabela 4 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 7 a 21 dias.....	42
Tabela 5 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 35 a 42 dias.....	43
Tabela 6 - Peso do fígado (PF) e concentração de glicerol no fígado (CGF) das aves submetidas a diferentes concentrações de glicerina bruta na dieta.....	50
Tabela 7 - Valores médios dos teores de sanguíneos de triacilgliceróis e colesterol total de aves alimentadas com níveis crescentes de glicerina bruta (21 a 35 dias de idade).....	51
Tabela 8 - Umidade da digesta ileal em frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta.....	58
Tabela 9 - Altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação altura de vilosidade: profundidade de cripta (AV:PC) do duodeno de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade em função dos tratamentos experimentais.....	60

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é a atividade agropecuária que mais evoluiu nas últimas décadas, principalmente devido à grande competitividade pela conquista de mercado em relação às demais atividades. Em vista disso, pesquisadores têm sido levados a desenvolver novas pesquisas com o objetivo de aperfeiçoar estudos nas áreas de nutrição, manejo, genética e sanidade, visando um alto desempenho zootécnico com baixos custos de produção.

No entanto, a alimentação representa o maior gasto da produção avícola, pois esta depende fortemente dos grãos de cereais, como o milho, que é a principal fonte de carboidratos que fornece energia para os processos metabólicos para as aves.

A utilização de subprodutos em dieta de animais de interesse zootécnico pode diminuir o custo de produção e, conseqüentemente, aumentar a rentabilidade da atividade. Quando financeiramente rentável, a glicerina, um subproduto da indústria do biodiesel, pode ser usado como substituto parcial do milho para alimentação animal (CERRATE et al., 2006), por apresentar valores energéticos semelhantes (DOZIER et al., 2008).

Absorvido de forma passiva (GUYTON, 1991), o glicerol possui sabor adocicado e pequeno peso molecular (RIVALDI et al., 2007), tendo um excelente aceite dentre as espécies animais na alimentação.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar a resposta metabólica dos animais consumindo dietas contendo glicerina e verificar o efeito deste ingrediente em alguns parâmetros sanguíneos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

A maior parte de toda energia consumida no mundo provém dos combustíveis fósseis. Como essas fontes são poluentes e não-renováveis, a busca por fontes alternativas de energia é de fundamental importância (HAZEL; PACHAURI, 2006).

O biodiesel constitui um combustível alternativo. De acordo com a resolução ANP 42/2009, este é definido como combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos oriundos de óleos vegetais ou gorduras animais, designado como B100. São designadas misturas B2, B5, B10, etc. compostas de óleo diesel mineral adicionadas de 2, 5, 10%, respectivamente, de biodiesel (BRASIL, 2009).

Segundo Lofrano (2008), muitas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e podem ser divididas nos seguintes grupos: óleos vegetais, gordura animal e gorduras residuais. Atualmente, as matérias-primas mais utilizadas na produção do biodiesel são o óleo de soja (Estados Unidos e Brasil), óleo de palma (Malásia e Colômbia) e óleo de canola e girassol (Europa).

O biodiesel pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento catalítico, esterificação ou pela transesterificação, sendo esta última a mais comum (COSTA; OLIVEIRA, 2006).

A transesterificação, também chamada de alcoólise, é uma reação química em que um triglicerídeo reage com três moléculas de álcool (em geral utiliza-se o metanol ou etanol) e, na presença de um catalisador, transforma-se em três moléculas de alquil ésteres (ésteres metílicos ou etílicos, caso metanol ou etanol, respectivamente, seja utilizado na reação) e uma molécula de glicerol (ou glicerina), conforme descrito na Figura 1. Os termos R1, R2 e R3 referem-se aos radicais dos ácidos graxos do triglicerídeo (NEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Figura 1- Equação simplificada da reação de transesterificação

Fonte: Adaptado de Gerpen (2005)

A glicerina, quando pura, apresenta densidade de aproximadamente 1,26 g/mL, ao passo que os ésteres resultantes deste processo apresentam densidade relativa, em geral, menor que 1,00 g/mL. Por ser mais densa e pouco miscível em meio aos ésteres, a glicerina separa-se fisicamente destes, podendo ser facilmente conduzida para outro recipiente, enquanto que os ésteres são refinados para serem vendidos como biodiesel (LIAO et al., 2009).

2.2 Glicerina

A glicerina é o principal coproduto gerado na produção de biodiesel e, aproximadamente, 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem à glicerina (DASARI et al., 2005). Primeiramente, é importante esclarecer a diferença entre os termos glicerol e glicerina. O termo glicerol aplica-se, geralmente, ao composto puro, ou seja, ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95%, ou mais, de glicerol na sua composição (FELIZARDO et al., 2006).

A glicerina consiste em uma substância química versátil. Possui uma combinação única de propriedades físicas e químicas que são utilizadas em vários produtos, como em cosméticos, produtos alimentícios, medicamentos e cuidados pessoais (BONNARDEAUX, 2006).

Obtida na transesterificação, pode sofrer apenas uma neutralização ácida e ser enviada para armazenamento. Contudo, se não existir escoamento para a glicerina tal qual ela é recuperada do processo de produção do biodiesel, ou se não

for economicamente atrativa sua venda, pode ser necessário proceder a sua purificação (FELIZARDO et al., 2006). Esse processo de purificação envolve a recuperação dos sais presentes na glicerina para posterior utilização como fertilizantes, e a recuperação do álcool e da água por evaporação, de forma a produzir uma glicerina com 80 a 88% de glicerol (FELIZARDO, 2003).

Atualmente, as empresas produtoras de biodiesel têm trabalhado com fontes de gordura de origem animal e vegetal. Além disso, pode-se realizar a associação destas duas fontes, produzindo, desta forma, a glicerina mista. As glicerinas diferenciam-se pelo grau do processamento industrial, na forma bruta (alto conteúdo de ácidos graxos) ou semipurificada, a qual apresenta baixo conteúdo de ácidos graxos.

As características físicas, químicas e nutricionais da glicerina dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel.

A glicerina pode apresentar teores variáveis de água, glicerol, metanol e ácidos graxos, sendo classificada como de baixa pureza (50 a 70% de glicerol), média pureza (80 a 90% de glicerol) e de alta pureza (acima de 99% de glicerol). A glicerina de baixa pureza possui 27% de água, 63% de glicerol e 28% de metanol, e a de média pureza, 11% de água, 85% de glicerol e 0,04% de metanol, e ambas podem ser aproveitadas na alimentação animal (SÜDEKUM, 2008).

Em maio de 2010, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o uso da glicerina (bruta e loira) como insumo para alimentação animal e estabeleceu um padrão de qualidade: glicerol (mínimo 80%); metanol (máximo 150 ppm) e 13% de umidade. Os teores mínimos de sódio e matéria mineral devem ser garantidos pelo fabricante, podendo variar, no entanto, com o processo produtivo.

A glicerina já é reconhecida como um alimento seguro para alimentação animal, porém é necessária uma atenção especial aos fatores de qualidade relacionados com a produção da glicerina. Em literatura recente, Gott (2009) afirma que existe grande variação na composição química em glicerinas obtidas de diferentes matérias-primas e indústrias. O autor afirma que o teor de cinza apresentou maior variação entre as amostras, pela quantidade de catalisadores utilizados em cada indústria, no entanto, teores de glicerol, metanol, umidade e pH não apresentaram grande variação.

Dependendo do catalisador usado na produção do biodiesel, a glicerina gerada pode conter de 6-8% de sais de sódio ou potássio. Nos processos adotados nas plantas do Brasil, é mais comum o uso do hidróxido de sódio (NaOH), sendo que o mineral contido no catalizador irá permanecer na glicerina.

Quando se utiliza a glicerina como ingrediente de rações é muito importante ter o conhecimento da composição de sódio e/ou potássio para que a ração seja adequadamente formulada de acordo com as exigências nutricionais dos animais (CERRATE et al., 2006).

Porém, quando não é conhecida sua real quantidade presente nas glicerinas, e na ausência do seu ajuste nutricional, ao se proceder com a formulação das rações haverá excesso deste eletrólito nas dietas. Isso se constitui na principal problemática do sódio residual, visto que seu excesso ocasiona aumento no consumo de água, e conseguinte excreção de água pelos animais. Dessa forma, nas condições práticas de criação de aves, por exemplo, resultará no aumento da umidade da cama, podendo comprometer o desempenho dos animais.

Em estudos realizados por Lammers et al. (2008b) observaram maior umidade das excretas quando a ração de galinhas poedeiras foi formulada com 15% de glicerina bruta contendo 1,26% de sódio e não foi realizado ajuste em relação à ração basal que continha 0,21% de sódio. Ficando evidente que o valor máximo de inclusão de glicerina na dieta de animais pode ser limitado pela quantidade de sódio presente no produto.

Contudo, a utilização da glicerina na formulação de rações para aves e suínos desperta interesse imediato por ser um produto rico em energia (4.320 kcal de energia bruta por kg para o glicerol puro) e apresentar alta eficiência de utilização pelos animais (MENTEN et al., 2010). Outro aspecto que justifica a aplicação desse coproduto da indústria de biodiesel na produção de alimentos para animais é que parte das matérias primas renováveis produzidas para atender finalidades energéticas retornará a cadeia alimentar para gerar produtos de alto valor nutricional.

2.3 Glicerol: caracterização e metabolismo

O glicerol foi descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur (1858) também observou sua formação

como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol (REHM, 1998), podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica.

O glicerol é um composto orgânico pertencente à função álcool, que se apresenta como um líquido viscoso, inodoro, higroscópico, incolor e com sabor adocicado (Figura 2). É solúvel em água e etanol, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxino, e insolúvel em hidrocarbonetos (MORRISON, 1994). Por sua vez, pode ser proveniente tanto de fontes naturais, das gorduras animais e dos óleos vegetais, quanto da indústria petroquímica (SHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

Figura 2 - Fórmula estrutural plana do glicerol

Metabolicamente, o glicerol é um componente normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células. Ele é derivado de lipólise no tecido adiposo, hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue e gordura dietética (LIN, 1977).

Entretanto, existem poucas informações sobre as implicações metabólicas da suplementação exógena de glicerol na dieta, especialmente quando a suplementação atinge grandes proporções como um ingrediente energético das rações.

O glicerol é um componente estrutural importante dos triacilgliceróis e fosfolipídios. É o precursor para o gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário na via da lipogênese e gliconeogênese, e fornece energia através da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico (BRISSON et al., 2001).

O glicerol pode ser convertido a glicose pelo fígado (KREBS; NOTTON; HEMS, 1966) e rins (KREBS; LUND, 1996), fornecendo energia para o metabolismo celular.

A digestão dos triacilgliceróis ocorre no lúmen intestinal, que por sua vez, requer a participação das secreções pancreáticas e biliares. Durante a digestão, os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase pancreática, sendo esta controlada pelos hormônios epinefrina e glucagon, para formar ácidos graxos livres e monoacilgliceróis (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2008). Segundo Yuasa et al. (2003) uma parcela (aproximadamente 20%) de glicerol livre é liberada pelos monoacilgliceróis.

Quando ingerido, o glicerol é rapidamente absorvido pelo intestino, e mais lentamente pelo estômago e se distribui por todos os espaços intracelulares (LIN, 1977). O glicerol é transportado para dentro das células através de proteínas carreadoras, as aquaporinas (AQP), mais especificamente um subgrupo delas, as aquaporinas 3, 7 e 9, chamadas de aquagliceroporinas que fazem a difusão facilitada do glicerol pela membrana plasmática (HARA-CHIKUMA; VERKMAN, 2006; ROUDIER et al., 1998).

Uma vez absorvido, o glicerol pode ser convertido à glicose (EMMANUEL; BERZIN; ROBBLEE, 1983) via gliconeogênese ou oxidado para a produção de energia via glicólise e ciclo do ácido cítrico (ROSEBROUGH et al., 1980), que podem contar com 60% do destino metabólico do glicerol em condições basais (ROBERGS; GRIFFIN, 1998).

Antes que possa entrar na glicólise ou gliconeogênese (dependendo das condições fisiológicas), o glicerol é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato e isomerizado em D-gliceraldeído 3-fosfato (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2008) (Figura 3). Como fonte de energia, o glicerol pode também ser oxidado rendendo 22 mol de ATP/mol (BEST, 2006).

Segundo Lin (1977), o fígado é responsável por, aproximadamente, 3/4 da capacidade total do corpo de metabolizar o glicerol. Já o rim é o órgão responsável por cerca de 1/5 desta capacidade de metabolização do glicerol e também pela essencial reabsorção do glicerol, evitando excessos de perdas na urina. No entanto, o glicerol em concentração sérica de 1mM pode ser totalmente eliminado pelos rins.

Figura 3 - Reações bioquímicas envolvidas na síntese de glicerol e conversão metabólica para glicerol-3-fosfato, fosfatase e triacilglicerol

DHA = di-hidroxiacetona; DHA-P = di-hidroxiacetona fosfato; FAD⁺ = flavina-adenina dinucleotídeo; FADH = forma reduzida de flavina-adenina dinucleotídeo; FFA = ácidos graxos livres; GDH = glicerol desidrogenase; GK = glicerol quinase; GLUT4 = proteína transportadora de glicose; GPD = glicerol fosfato desidrogenase, L = lipase; NAD⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH = forma reduzida nicotinamida adenina dinucleotídeo. Fonte: Adaptado de Robergs e Griffin (1998)

Existem três enzimas responsáveis pelo metabolismo do glicerol, a glicerol quinase, a glicerol 3 fosfato desidrogenase citosólica (G₃P desidrogenase), ou G₃P oxiredutase, e a glicerol 3 fosfato desidrogenase mitocondrial, que é dependente de FAD (LIN, 1977).

A enzima glicerol quinase é a primeira a participar da metabolização do glicerol, sendo encontrada em grande parte no fígado e rins (ROBERGS; GRIFFIN, 1998), podendo realizar a oxidação do glicerol para obtenção de energia ou convertê-lo em glicose. Esta enzima é considerada uma fosfotransferase, pois catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para o glicerol, formando o glicerol 3 fosfato. A enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase citosólica, oxida NADH, reduzindo dihidroxiacetona a glicerol 3 fosfato e a enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna reduz FAD, que é utilizado pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Essas reações podem ser reversíveis dependendo do substrato em maior proporção

(ROBERGS; GRIFFIN, 1998); assim, a quantidade de glicose ou outros metabólitos gerados dependem da quantidade de glicerol consumido.

Em alguns tecidos, os níveis dessas enzimas podem ser moduladas pela insulina, corticosteróides e pelos hormônios da tireóide (LIN, 1977). Por exemplo, o aumento de glicerol quinase hepática é reflexo do aumento dos níveis séricos da insulina em condições de gliconeogênese. Já o aumento da enzima mitocondrial ocorre em condições de maior atividade respiratória dirigida pelos hormônios da tireóide e o significado da sensibilidade especial dos níveis da G_3P oxiredutase aos controles corticosteróides é determinado pelos tecidos neurais.

Estudos realizados por Lin et al. (1976) demonstraram o efeito do glicerol nas enzimas lipogênicas do fígado de ratos alimentados com dietas com alto teor de glicerol, proporcionando elevada atividade hepática da piruvato quinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima málica, enzima de clivagem do citrato e acetil Coa. As trioses formadas a partir de glicerol são direcionadas para formação de glicose.

No metabolismo do glicerol ocorre uma redução hepática da síntese de ácidos graxos em ratos resultando em um aumento na relação do $NADH / NAD$ citoplasmático. Entretanto, em aves o glicerol é um ótimo substrato para gliconeogênese em razão da atividade do glicerol quinase no fígado. Nesta espécie ocorre um efeito do glicerol na síntese de ácidos graxos, sendo semelhante ao efeito do 1,3- butanodiol, ou seja, no fígado aumenta a relação do $NADH / NAD$ citoplasmático (LIN; ROMSOS; LEVEILLE, 1976). Além disso, o glicerol pode aumentar a deposição de proteína, por causa da redução gliconeogênica a partir de aminoácidos, através da inibição da atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase ou glutamato desidrogenase (SIMON; BERGNER; SCHWABE, 1996).

Desta forma, o destino metabólico do glicerol pode ser dirigido, dependendo do tecido e do estado nutricional do animal, para o fornecimento de esqueleto carbônico para a gliconeogênese (EMMANUEL; BERZINS; ROBBLEE, 1983), para a produção de energia pela via da glicólise ou como precursor para a síntese de triacilgliceróis (BRISSEON et al., 2001).

Em animais em jejum, as concentrações de ácidos graxos e glicerol são similares na corrente sanguínea, associando que ambos têm distribuição similar (BERGMAN; KATZ; KAUFMAN, 1970).

Nos últimos anos, resultados de pesquisas indicam que o uso de glicerina proveniente da produção de biodiesel tem uma aplicação segura quando incluída na

formulação de rações para aves e suínos até cerca de 10%, não afetando o desempenho, a saúde, a qualidade da carcaça e da carne dos animais. Entretanto, como a qualidade da glicerina produzida industrialmente pode ser variável, seu uso deve ser feito com cautela até que novos estudos estabeleçam mais claramente todos os efeitos da alimentação de animais com a glicerina (MENTEN; MIYADA; BERENCHTEIN, 2008).

2.4 Uso da glicerina na alimentação animal

A utilização de glicerina bruta na alimentação animal já foi, no passado, alvo de estudos (BERNAL, 1978; WAGNER, 1994). Com o recente estímulo à produção de biodiesel, atualmente na literatura podemos encontrar alguns trabalhos desenvolvidos com o objetivo de determinar o efeito da glicerina bruta, proveniente de diferentes fontes e características, sobre o desempenho, características de carcaça e de qualidade de carne, bem como sobre características químicas e valores energéticos do glicerol.

A glicerina bruta, além de ser uma fonte energética, pode ser empregada na alimentação animal para melhorar a qualidade do pellet (GROESBECK et al., 2008), reduzir o pó das dietas e, pelo seu sabor adocicado, pode servir para melhorar o sabor das dietas (PIESKER; DERSJANT-LI, 2006).

Lammers et al. (2008a), avaliando até 10% de inclusão de glicerina bruta na dieta de leitões na fase de crescimento, não observaram qualquer efeito no desempenho dos animais. Estudos conduzidos por de Christopher (2009), substituindo lactose por glicerina na alimentação de leitões recém-desmamados, confirmam que a glicerina, além de melhorar a durabilidade do pellet, fluidez, eficiência e temperatura da peletizadora, pode ser adicionada nas dietas em níveis de até 5% sem prejudicar o desempenho dos animais.

Mendoza et al. (2010) concluíram que a inclusão em até 15% de glicerina purificada em dietas de suínos em terminação não causou efeitos prejudiciais sobre o desempenho, características quantitativas e qualidade da carne. Adicionalmente, Berenchtein et al. (2010) verificaram que a glicerina bruta pode ser utilizada como ingrediente energético nas rações de suínos em crescimento e terminação até o nível de 9%, sem afetar o desempenho, características de carcaça e qualidade de carne.

Em frangos de corte, Simon et al. (1996), avaliando o glicerol puro na dieta, com níveis de inclusão de 0, 5, 10, 15, 20 ou 25% em rações à base de milho e farelo de soja, concluíram que a inclusão de até 10% deste produto pode ser feita sem afetar o desempenho dos animais. Por outro lado, Cerrate et al. (2006), utilizando dietas contendo 2,5 ou 5% de glicerol, verificaram aumento no rendimento de peito, sugerindo que o seu uso pode melhorar a deposição de proteína corporal.

Estudos realizados por Abd-Elasamee et al. (2010) mostraram que níveis de 6 e 8% de glicerina bruta (84.65% de glicerol, 10.17% de umidade, 3.41% de Na e 3.445 kcal/kg de energia bruta) podem ser utilizados efetivamente em frangos de corte, sem afetar o desempenho, digestibilidade dos nutrientes e as características de carcaças.

Silva (2010), trabalhando com níveis de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de inclusão de glicerina bruta para frangos de corte, concluiu que de 1 a 7 dias houve um aumento no ganho de peso, consumo de ração e peso vivo, afirmando que a inclusão de glicerina até 10% foi eficaz. Já com 21 dias, os melhores resultados foram observados quando foram utilizados 5% de inclusão.

Do mesmo modo, Sehu et al. (2012) avaliaram a inclusão de 5 e 10% de glicerina na dieta de frangos de corte e concluíram que o nível de 5% pode ser incorporado na ração sem comprometer o crescimento e características de carcaça.

Alguns autores verificaram que a glicerina pode promover aumento na umidade das excretas. Gianfelici (2009) atribuiu o aumento da perda de água por via urinária, em frangos de corte consumindo glicerina, sendo resultado de menor reabsorção de água pelo intestino grosso ou maior excreção renal. O autor observou também, que a perda de água se acentua quando a glicerina na dieta vai além de 7,5%.

Silva (2010), avaliando a inclusão de níveis crescentes de glicerina em dietas de frangos de corte, detectou um aumento da umidade da cama das aves alimentadas com 10% de glicerina a partir da terceira semana de criação.

Para Freitas et al. (2011) observaram que a partir do 21º dia de criação das aves o tratamento com 12,5% de glicerina apresentou maior umidade da cama, e aos 40 dias, a partir de 7,5% de inclusão de glicerina obtiveram-se os maiores valores de umidade.

Cerrate et al. (2006) observaram aumento na umidade da cama com a inclusão de 10% de glicerina nas rações e possivelmente esse aumento da umidade

das excretas estaria relacionado com o excesso de 0,15% de potássio, proveniente do resíduo de catalisador utilizado na reação de transesterificação.

Em pesquisas realizadas por Yalcin et al. (2010), foi avaliado o efeito da inclusão de glicerina sobre a qualidade de ovos e parâmetros sanguíneos de poedeiras. Os autores observaram aumento do colesterol na gema do ovo para o nível de 7,5% de inclusão. Entretanto, não foi observado alteração nos parâmetros sanguíneos avaliados, porém, houve um menor consumo de ração com o nível de 7,5% em relação aos outros tratamentos. Em outros estudos, Pasquetti (2011) afirma que glicerina bruta e semipurificada até o nível de 15% pode ser usada em codornas de corte, de 15 a 35 dias de idade, sem afetar o desempenho.

Com relação à inclusão de 10% de glicerina na dieta para peixes, Neu (2011) concluiu que não afetou o ganho de peso, o consumo de ração e a eficiência alimentar, porém, quando adicionada em nível de 20%, houve redução no rendimento de filé.

Em pesquisas realizadas com cães, Lima et al. (2010) observaram que a adição de até 9% de glicerina semipurificada promove aumento da digestibilidade energética. No entanto, níveis mais elevados de inclusão resultam na produção de fezes menos consistentes pelos animais (NETO, 2011).

Em ruminantes, Schröder e Sudekum (2007), ao fornecerem glicerina bruta para novilhos leiteiros, concluíram que melhorou o suprimento de energia e auxiliou na prevenção de problemas de cetose. Já Bodarski et al. (2005) afirmaram que a inclusão de 3,1% de glicerina bruta na dieta de vacas leiteiras aumentou a produção e a proteína do leite. Para Krueger et al. (2010), usando até 40% de glicerol em estudo “in vitro” mostraram que o glicerol não afetou a digestibilidade da fibra. Com relação à performance dos animais, Parsons et al. (2009) verificaram que a glicerina bruta fornecida a bovinos de corte cruzados, variando de 0 a 16% de inclusão na dieta, melhorou o ganho de peso a partir da adição de 2% de glicerina bruta na dieta.

Estudos já realizados com a glicerina indicaram que pode se constituir numa boa fonte energética na formulação de rações para animais, porém, é necessário estar atento à composição deste subproduto e principalmente em relação aos níveis máximos de utilização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos no aviário experimental do Departamento de Zootecnia – Setor de Não Ruminantes, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, localizada no município de Piracicaba, SP. Em ambos os bioensaios, foram utilizados diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de frangos de corte.

No experimento I foram determinados os níveis de glicerol no soro sanguíneo e no fígado e parâmetros sanguíneos (colesterol e triglicerídeos). No experimento II avaliou-se o consumo de água, consumo de ração, umidade do conteúdo ileal e das excretas e histologia intestinal.

3.1 Experimento I

3.1.1 Instalações experimentais e animais

Foram alojados 120 pintos de corte machos sexados da linhagem Cobb-500®, em dois boxes de um aviário experimental durante o período pré-experimental de 1 a 20 dias de idade (Figura 4).

Figura 4 - Galpão experimental. A, vista externa e B, vista interna das instalações

Neste período, os animais receberam ração referência conforme os níveis nutricionais recomendado por Rostagno et al. (2011). Aos 20 dias idade as aves foram transferidas para uma sala de metabolismo. O bioensaio foi conduzido em

duas baterias metálicas para frangos em crescimento, cada uma com 12 gaiolas (Figura 5). Cada gaiola possui as dimensões de 0,70 m de comprimento, por 0,66 m de largura e 0,34 m de altura, piso de tela com comedouro e bebedouro de aço inoxidável tipo calha e uma bandeja inferior removível.

O período de adaptação às gaiolas e às dietas foi de três dias, antes de iniciar o experimento. A temperatura ambiente foi registrada diariamente, procurando-se manter as aves em termoneutralidade conforme sua idade (Apêndice A), usando-se ventilador e nebulizador.

Figura 5 - Gaiolas de metabolismo em A, vista frontal e B, vista lateral

3.1.2 Delineamento Experimental

Foram utilizados 100 frangos de corte, distribuídos em um delineamento inteiramente aleatorizado, totalizando cinco tratamentos com quatro repetições de cinco aves cada, perfazendo 20 unidades experimentais. As aves foram selecionadas a partir do peso médio do lote com variação de $\pm 5\%$.

3.1.3 Dietas e tratamentos experimentais

Os tratamentos experimentais consistiram de rações formuladas com níveis crescentes de glicerina de biodiesel, conforme descrito abaixo:

- T1 = dieta à base de milho, farelo de soja e óleo de soja, sem inclusão de glicerina;

- T2 = dieta com inclusão de 2,5% de glicerina de biodiesel;
- T3 = dieta com inclusão de 5,0% de glicerina de biodiesel;
- T4 = dieta com inclusão de 7,5% de glicerina de biodiesel;
- T5 = dieta com inclusão de 10,0% de glicerina de biodiesel.

A glicerina de biodiesel utilizada nas rações foi fornecida pela empresa Caramuru Alimentos Ltda. Amostras da glicerina foram coletadas e enviadas ao laboratório CBO Análises Laboratoriais, em Campinas-SP. A composição da glicerina utilizada no experimento encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da glicerina bruta utilizada nas rações

Análises	Unidade	Resultado
Glicerol	%	83,63
Umidade Karl Fischer	%	11,18
Extrato Etéreo	%	0,09
Matéria Mineral	%	6,97
Cloreto total	%	4,91
Sódio	%	1,83
pH solução aquosa	-	6,16
Metanol	mg/kg	397

Laboratório CBO Análises, Campinas-SP.

Em bomba calorimétrica foi determinado o valor de 3.620 kcal/kg de energia bruta e, para a formulação das rações, o valor da energia metabolizável foi considerado 90% do valor da energia bruta (3.258 kcal EMAn/kg). Para a formulação das dietas foram usados os valores de composição dos demais alimentos conforme descritos por Rostagno et al. (2011).

As composições percentuais das dietas e valores nutricionais calculados podem ser encontradas na Tabela 2. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Para introduzir a glicerina nas rações, foi estendida uma lona de plástico no chão, sobre o qual toda a glicerina a ser incorporada na ração foi primeiramente misturada ao farelo de soja e aguardado um tempo necessário para que a glicerina fosse absorvida pelo farelo de soja. Com isso, ela pode ser adicionada juntamente com os demais ingredientes, sem que ocorresse formação de grumos no misturador.

Tabela 2 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 21 a 35 dias

Ingredientes	Inclusão de Glicerina (%)				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Milho moído	56,531	53,564	50,596	47,629	44,661
Farelo de soja	35,302	35,799	36,295	36,792	37,291
Óleo de soja	4,817	4,906	4,997	5,086	5,176
Glicerina	0,000	2,500	5,000	7,500	10,000
Fosfato Bicálcico	1,310	1,314	1,318	1,322	1,325
Calcário Calcítico	0,889	0,886	0,883	0,880	0,877
Sal comum	0,458	0,344	0,230	0,115	0,002
DL-Metionina	0,269	0,272	0,275	0,278	0,281
L-Lisina HCl	0,150	0,141	0,132	0,123	0,113
L-Treonina	0,029	0,029	0,029	0,030	0,029
Suplemento Vitaminico ¹	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080
Cloreto de Colina 60%	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Agente anticoccidiano ²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Suplemento Mineral ³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Promotor de crescimento ⁴	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Valores calculados:					
EM (kcal/kg)	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150
PB (%)	20,74	20,72	20,71	20,70	20,68
Met. + Cist. dig. (%)	0,826	0,826	0,826	0,826	0,826
Metionina dig. (%)	0,542	0,543	0,544	0,545	0,547
Lisina dig. (%)	1,131	1,131	1,131	1,131	1,131
Treonina dig. (%)	0,735	0,735	0,735	0,735	0,735
Cálcio (%)	0,758	0,758	0,758	0,758	0,758
Fósforo disp. (%)	0,354	0,354	0,354	0,354	0,354
Sódio (%)	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Cloro (%)	0,324	0,328	0,332	0,337	0,341
Número de Mogin (mEq/kg)	202,68	201,60	200,52	199,43	198,35

¹Fornecido por quilograma de ração: Vitamina A, 7.200 UI; Vitamina D₃, 2.000 UI; Vitamina E, 16 UI; Vitamina K₃, 2 mg; Vitamina B₁ (Tiamina), 1,2 mg; Vitamina B₂ (Riboflavina), 4,8 mg; Vitamina B₆ (Piridoxina), 2,4 mg; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 9,6 µg; Ácido pantotênico, 9,6 mg; Niacina, 20 mg; Ácido fólico, 0,64 mg; Biotina, 0,048 mg; Selênio, 0,20 mg. ²Salinomicina 12%. ³Fornecido por quilograma de ração: Cu, 10 mg; Fe, 50 mg; Mn, 75 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn, 50 mg. ⁴Halquinol BP 80: 60% Clorihidroxiquinolina.

3.1.4 Parâmetros avaliados

3.1.4.1 Concentração de glicerol no soro sanguíneo das aves

Amostras de sangue foram coletadas aos 23, 26, 29, 32 e 35 dias de idade. A coleta foi realizada por punção na veia braquial com agulhas descartáveis em tubos a vácuo sem adição de anticoagulante. O volume de sangue coletado foi de aproximadamente 5 mL. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C para a obtenção do soro, o qual foi transferido para frasco de eppendorf identificado e armazenado em congelador (-18 °C) até sua análise bioquímica. O método utilizado para determinação do glicerol no soro foi por cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra performance liquid chromatography* – UPLC) (Acquity™, Waters). Esta técnica tem como vantagem principal o aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos, mesmo com vazões elevadas da fase móvel. Como resultado, não somente há o aumento da eficiência, mas também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor detectabilidade (SWARTZ, 2005).

3.1.4.2 Determinação dos parâmetros sanguíneos

Aos 35 dias de idade, foram retiradas ao acaso 4 aves por tratamento e identificadas individualmente por anilhas em uma das pernas. Para a coleta de sangue, as aves foram submetidas a jejum de ração por 12 horas. No dia seguinte, após o jejum, amostras de sangue foram coletadas conforme a descrição citada anteriormente (Figura 6). Amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA para a análise de triglicerídeos e o anticoagulante heparina sódica para análise de colesterol plasmático.

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e, em seguida, o plasma foi retirado com auxílio de pipeta manual e armazenado a -18 °C. A quantificação do colesterol e triglicerídeos foi realizada pelo método enzimático-colorimétrico utilizando-se kit comercial (Laborlab®), com leitura a 505 nm em espectrofotômetro, segundo metodologia de Lumeij (1997), expressos em mg/dL.

Figura 6 - Coleta de sangue

3.1.4.3 Concentração de glicerol no fígado das aves

A coleta do fígado foi realizada aos 36 dias de idade. Foram separadas ao acaso 4 aves por tratamento no dia anterior e identificadas individualmente por anilhas. As aves foram submetidas ao jejum alimentar por um período de 2 horas, seguida de uma hora de alimentação normal, visando fornecer alimento ao mesmo tempo às aves com o objetivo de proporcionar mesmo perfil metabólico de glicerol no fígado de todos os animais. Na sequência, foram sacrificadas por deslocamento da articulação crânio-cervical para coleta do fígado. O fígado coletado foi acondicionado em frascos plásticos previamente identificados por tratamento e congelados (-18°C), para posterior análise. O método utilizado para esta análise foi o mesmo adotado para a identificação de glicerol no soro, descrito anteriormente.

3.1.5 Análises estatísticas

Os dados referentes ao glicerol no soro das aves alimentadas com níveis crescentes de glicerina foram submetidos à análise de variância considerando-se a melhor estrutura de covariância, por se tratar de medidas repetidas no lote, para avaliar a importância dos efeitos de tratamentos (dietas), de tempos de amostragem e da interação tratamento x tempo. O modelo adotado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + w_{ij} + T_k + (DT)_{ik} + e_{ijk}, \text{ sendo:}$$

Y_{ijk} : observação na $i^{\text{ésimo}}$ dieta, $j^{\text{ésimo}}$ repetição e $k^{\text{ésimo}}$ tempo

μ : média geral;

D_i : efeito da $i^{\text{ésimo}}$ dieta;

w_{ij} : resíduo associado à parcela;

T_k : efeito do $t^{\text{ésimo}}$ tempo (dia de mensuração);

$(DT)_{ik}$: interação entre a $i^{\text{ésimo}}$ dieta e o $k^{\text{ésimo}}$ tempo;

e_{ijk} : erro experimental, assumindo $e_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

No caso de efeito significativo ($p < 0,05$) de dieta ou da interação, os dados foram submetidos à análise de regressão.

Os dados de glicerol no fígado, peso do fígado e parâmetros sanguíneos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo PROC GLM do pacote estatístico SAS[®] 9.2 e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS[®] (Statistical Analysis System) versão 9.2.

3.2 Experimento II

3.2.1 Instalações experimentais e animais

Este experimento foi conduzido em duas fases, sendo as aves alojadas inicialmente em gaiolas de metabolismo para pintos, e na segunda fase, transferidas para gaiolas apropriadas para frangos em fase de crescimento. Foram alojados 160 pintos machos da linhagem Cobb-500[®] provenientes de um incubatório comercial.

Na primeira fase, os pintos foram alojados em baterias metálicas com aquecimento. Foram utilizadas 20 gaiolas metabólicas da marca Petersime com

dimensões de 1 m de comprimento, por 0,68 m de largura e 0,20 m de altura. As gaiolas são providas de aquecedor elétrico, bebedouro e comedouro de aço inoxidável tipo calha, com piso de tela sob o qual existe uma bandeja inferior removível para a coleta das excretas. Cada parcela continha 8 aves para a fase pré-inicial e inicial, e foram criadas até os 21 dias de idade nessas gaiolas.

Aos 21 dias de idade, as aves de cada gaiola foram pesadas e selecionadas 4 aves por gaiola, com peso mais próximo ao peso médio do lote. Os grupos de cada gaiola foram mantidos e alojados em 20 gaiolas em duas baterias metálicas marca Petersime para frangos em crescimento, com dimensões de 0,70 m de comprimento por 0,66 m de largura e 0,34 m de altura, piso de tela, com bebedouro e comedouro de aço inoxidável tipo calha e uma bandeja inferior removível para a coleta das excretas. As aves permaneceram nas gaiolas até aos 42 dias de idade.

A temperatura ambiente foi registrada diariamente, procurando-se manter as aves em termoneutralidade conforme sua idade (Apêndice B).

3.2.2 Delineamento Experimental

Nas duas fases, as aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente aleatorizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, perfazendo 20 unidades experimentais. Até os 21 dias de idade havia 8 aves por unidade experimental e após os 21 dias de idade havia 4 aves por unidade experimental.

3.2.3 Dietas e tratamentos experimentais

Os animais foram submetidos aos mesmos tratamentos do experimento I. O programa nutricional foi composto por quatro rações experimentais, destinadas às diferentes fases de criação das aves: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 42 dias) (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

As rações foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental, na forma farelada e formulada a base de milho e farelo de soja, conforme níveis nutricionais recomendados por Rostagno et al. (2011).

Tabela 3 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 1 a 7 dias

Ingredientes	Inclusão de Glicerina (%)				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Milho moído	48,905	45,940	42,970	40,002	37,035
Farelo de soja	43,586	44,081	44,580	45,078	45,574
Óleo de soja	3,426	3,517	3,606	3,696	3,786
Glicerina	0,000	2,500	5,000	7,500	10,000
Fosfato Bicálcico	1,863	1,867	1,871	1,875	1,878
Calcário Calcítico	0,913	0,909	0,906	0,903	0,900
Sal comum	0,508	0,394	0,280	0,165	0,052
DL-Metionina	0,325	0,327	0,331	0,334	0,337
L-Lisina HCl	0,143	0,134	0,125	0,116	0,107
L-Treonina	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046
Suplemento Vitaminico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de Colina 60%	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080
Agente anticoccidiano ²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Suplemento Mineral ³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Promotor de crescimento ⁴	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Valores calculados:					
EM (kcal/kg)	2.960	2.960	2.960	2.960	2.960
PB (%)	23,92	23,91	23,89	23,87	23,86
Met. + Cist. dig. (%)	0,953	0,953	0,953	0,953	0,953
Metionina dig. (%)	0,631	0,633	0,634	0,635	0,636
Lisina dig. (%)	1,324	1,324	1,324	1,324	1,324
Treonina dig. (%)	0,861	0,861	0,861	0,861	0,861
Cálcio (%)	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920
Fósforo disp. (%)	0,470	0,470	0,470	0,470	0,470
Sódio (%)	0,220	0,220	0,220	0,220	0,220
Cloro (%)	0,353	0,357	0,362	0,366	0,370
Número de Mogin (mEq/kg)	236,19	235,11	234,03	232,95	231,87

¹Fornecido por quilograma de dieta: Vitamina A, 9.000 UI; Vitamina D₃, 2.500 UI; Vitamina E, 20 UI; Vitamina K₃, 2,5 mg; Vitamina B₁ (Tiamina), 1,5 mg; Vitamina B₂ (Riboflavina), 6 mg; Vitamina B₆ (Piridoxina), 3 mg; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 12 µg; Ácido pantotênico, 12 mg; Niacina, 25 mg; Ácido fólico, 0,8 mg; Biotina, 0,060 mg; Selênio, 0,25 mg. ² Salinomicina 12%. ³Fornecido por quilograma de dieta: Cu, 10 mg; Fe, 50 mg; Mn, 75 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn, 50 mg. ⁴Halquinol BP 80: 60% Clorihidroxiquinolina.

Tabela 4 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 7 a 21 dias

Ingredientes	Inclusão de Glicerina (%)				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Milho moído	53,873	50,906	47,938	44,971	42,003
Farelo de soja	38,540	39,037	39,534	40,032	40,530
Óleo de soja	3,848	3,938	4,028	4,117	4,207
Glicerina	0,000	2,500	5,000	7,500	10,000
Fosfato Bicálcico	1,534	1,538	1,542	1,545	1,549
Calcário Calcítico	0,945	0,942	0,939	0,936	0,932
Sal comum	0,482	0,368	0,254	0,140	0,026
DL-Metionina	0,290	0,293	0,296	0,299	0,302
L-Lisina HCl	0,161	0,151	0,142	0,133	0,123
L-Treonina	0,042	0,042	0,042	0,042	0,043
Suplemento Vitaminico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de Colina 60%	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080
Agente anticoccidiano ²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Suplemento Mineral ³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Promotor de crescimento ⁴	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Valores calculados:					
EM (kcal/kg)	3.050	3.050	3.050	3.050	3.050
PB (%)	22,02	22,01	22,00	21,98	21,96
Met. + Cist. dig. (%)	0,876	0,876	0,876	0,876	0,876
Metionina dig. (%)	0,577	0,578	0,579	0,580	0,582
Lisina dig. (%)	1,217	1,217	1,217	1,217	1,217
Treonina dig. (%)	0,791	0,791	0,791	0,791	0,791
Cálcio (%)	0,841	0,841	0,841	0,841	0,841
Fósforo disp. (%)	0,401	0,401	0,401	0,401	0,401
Sódio (%)	0,210	0,210	0,210	0,210	0,210
Cloro (%)	0,339	0,343	0,347	0,351	0,356
Número de Mogin (mEq/kg)	216,01	214,93	213,85	212,77	211,69

¹Fornecido por quilograma de dieta: Vitamina A, 9.000 UI; Vitamina D₃, 2.500 UI; Vitamina E, 20 UI; Vitamina K₃, 2,5 mg; Vitamina B₁ (Tiamina), 1,5 mg; Vitamina B₂ (Riboflavina), 6 mg; Vitamina B₆ (Piridoxina), 3 mg; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 12 µg; Ácido pantotênico, 12 mg; Niacina, 25 mg; Ácido fólico, 0,8 mg; Biotina, 0,060 mg; Selênio, 0,25 mg. ² Salinomycin 12%. ³Fornecido por quilograma de dieta: Cu, 10 mg; Fe, 50 mg; Mn, 75 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn, 50 mg. ⁴Halquinol BP 80: 60% Clorihidroxiquinolina.

Tabela 5 - Composição percentual e valores nutricionais calculados das dietas de 35 a 42 dias

Ingredientes	Inclusão de Glicerina (%)				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
Milho moído	60,461	57,495	54,525	51,560	48,568
Farelo de soja	31,854	32,350	32,846	33,343	33,845
Óleo de soja	4,768	4,858	4,948	5,037	5,135
Glicerina	0,000	2,500	5,000	7,500	10,000
Fosfato Bicálcico	1,095	1,099	1,103	1,106	1,110
Calcário Calcítico	0,796	0,792	0,790	0,786	0,783
Sal comum	0,444	0,330	0,216	0,103	0,000
DL-Metionina	0,243	0,246	0,250	0,252	0,256
L-Lisina HCl	0,163	0,154	0,145	0,136	0,126
L-Treonina	0,026	0,026	0,027	0,027	0,027
Suplemento Vitaminico ¹	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Cloreto de Colina 60%	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
Suplemento Mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Valores calculados:					
EM (kcal/kg)	3.200	3.200	3.200	3.200	3.200
PB (%)	19,48	19,47	19,45	19,44	19,42
Met. + Cist. dig. (%)	0,774	0,774	0,774	0,774	0,774
Metionina dig. (%)	0,504	0,505	0,507	0,508	0,509
Lisina dig. (%)	1,060	1,060	1,060	1,060	1,060
Treonina dig. (%)	0,689	0,689	0,689	0,689	0,689
Cálcio (%)	0,663	0,663	0,663	0,663	0,663
Fósforo disp. (%)	0,309	0,309	0,309	0,309	0,309
Sódio (%)	0,195	0,195	0,195	0,195	0,199
Cloro (%)	0,317	0,321	0,325	0,330	0,341
Número de Mogin (mEq/kg)	189,25	188,17	187,09	186,01	184,98

¹Fornecido por quilograma de dieta: Vitamina A, 5.400 UI; Vitamina D₃, 1.500 UI; Vitamina E, 12 UI; Vitamina K₃, 1,5 mg; Vitamina B₁ (Tiamina), 0,9 mg; Vitamina B₂ (Riboflavina), 3,6 mg; Vitamina B₆ (Piridoxina), 1,8 mg; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 7,2 µg; Ácido pantotênico, 7,2 mg; Niacina, 15 mg; Ácido fólico, 0,48 mg; Biotina, 0,036 mg; Selênio, 0,15 mg. ²Fornecido por quilograma de dieta: Cu, 10 mg; Fe, 50 mg; Mn, 75 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn, 50 mg.

3.2.4 Parâmetros avaliados

3.2.4.1 Consumo de água e ração

As aves foram submetidas a um período de adaptação às instalações e às dietas experimentais por três dias. O consumo de água e o consumo de ração foram registrados durante o período de 24 horas a cada quatro dias, totalizando dez coletas durante todo o período experimental.

3.2.4.2 Umidade das excretas

A coleta das excretas iniciou-se 16^o de idade, período em que as aves não receberam mais aquecimento, pois este alterava a umidade das excretas. As excretas produzidas no período de 3 horas foram coletadas nos mesmos dias em que foi registrado o consumo de água e ração.

Para evitar perdas de excretas durante as coletas, as bandejas foram revestidas com plástico. Durante as coletas foram tomados todos os cuidados necessários, para evitar a presença de penas, escamas e ração nas excretas. Na sequência, as excretas foram acondicionadas em recipientes de alumínio previamente identificados e congeladas a -18 °C até o final do período de coleta.

Ao final do ensaio, estas foram descongeladas, homogeneizadas e uma amostra significativa foi retirada e pesada. Em seguida, foram submetidas à pré-secagem em estufas de circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas, posteriormente foram pesadas e trituradas em moinho com peneira de 1 mm. Na sequência, foi levada a estufa a 105 °C por 24 horas, para a obtenção da matéria seca final.

3.2.4.3 Umidade do conteúdo ileal

Para a coleta do conteúdo ileal, quatro aves por tratamento foram abatidas por deslocamento cervical no 42^o dia de idade. Constantemente, as aves que permaneciam nas gaiolas eram estimuladas ao consumo, para evitar que o segmento do íleo coletado contivesse pouco conteúdo, o que prejudicaria o procedimento de coleta da digesta.

Imediatamente após o abate, o intestino foi exposto por incisão abdominal, e foi seccionado a 4 cm distal do divertículo de Meckel e 4 cm proximal da junção íleo-cecal, obtendo-se um segmento de aproximadamente 30 cm. Na sequência, com uma leve pressão manual no segmento, o conteúdo foi recolhido em recipiente plástico devidamente identificado por tratamento e repetição, pesado e levado ao freezer até seu processamento (Figura 7).

Figura 7 - Remoção da digesta ileal

As amostras foram mantidas em freezer a -18°C por 24 horas e, em seguida, liofilizadas em equipamento modelo Savant Modulyo D-115, Thermo Electron Corporation, USA, operando à temperatura de -52°C e pressão na câmara de vácuo de 10 mbar. O tempo requerido para a liofilização de um lote contendo 20 amostras foi de 72 horas. Após a retirada do material do liofilizador, estes foram levados ao dessecador e pesados.

3.2.4.4 Avaliação histológica do duodeno

Aos 42 dias de idade, foi retirada aleatoriamente uma ave por unidade experimental (quatro aves por tratamento) e submetidas a jejum alimentar por 12 horas antes do abate.

Os animais foram abatidos por deslocamento cervical e foi coletado um fragmento de ± 1 cm do intestino delgado na curvatura da alça duodenal. Na sequência, os fragmentos foram lavados cuidadosamente com solução salina a 0,9%

e mergulhados em solução fixadora de Bouim. Após 24 horas de fixação do material, estes foram submetidos a cortes de 3 mm e fixados novamente por 24 horas e depois armazenados em álcool 70% para posterior preparação das lâminas.

Na sequência as amostras foram submetidas ao processamento histológico convencional e incluídas em blocos de parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Em cada lâmina havia 3 cortes os quais foram corados pelo método hematoxilina/eosina.

A morfometria para altura de vilos e profundidade de criptas foi realizada em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 equipado com câmera de captura de imagens Axiocam MRc (Carl Zeiss).

3.2.5 Análises estatísticas

Os dados referentes ao consumo de água e ração e umidade das excretas das aves alimentadas com níveis crescentes de glicerina foram submetidos à análise de variância considerando-se a melhor estrutura de covariância, por se tratar de medidas repetidas no lote, para avaliar a importância dos efeitos de tratamentos (dietas), de tempos de amostragem e da interação tratamento x tempo. O modelo adotado foi o mesmo do Experimento I.

Os dados referentes à umidade do conteúdo ileal foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS[®] 9.2 e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Para a avaliação histológica os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento PROC MIXED do pacote estatístico SAS[®]. Quando verificado efeito significativo às mesmas foram submetidas à análise de regressão polinomial.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS[®] (Statistical Analysis System) versão 9.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

4.1.1 Concentração de glicerol no soro sanguíneo e no fígado das aves

Os resultados da inclusão de glicerina bruta nas dietas x tempo de amostragem de glicerol no soro sanguíneo encontram-se na Figura 8. Foi detectada interação ($P < 0,05$) entre os níveis de glicerina e o tempo de coleta na variável concentração de glicerol no soro sanguíneo, sendo que houve aumento aos 3, 6 e 9 dias de concentração de glicerol para as aves consumindo 10,0% de glicerina na ração e retornando ao nível do controle após o 9º dia.

Figura 8 - Concentração de glicerol no soro sanguíneo em frangos de corte de 23 aos 35 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta

Neste estudo, observou-se que as aves foram capazes de metabolizar o glicerol com mais facilidade em dietas contendo até o nível de 7,5% de glicerina bruta, corroborando com os resultados encontrados por Gianfelici (2009).

Segundo Lin (1977) os níveis normais de glicerol plasmático para ratos é 0,1 mM e para humanos é 0,05-0,1 mM. Simon et al. (1996) avaliando a concentração

de glicerol no plasma sanguíneo em frangos de corte, 2 horas após alimentação, observaram que animais consumindo dieta controle apresentaram nível de 0,65 mM de glicerol plasmático, e que a concentração aumentou para 4,36 mM com o fornecimento de 5% de glicerol na dieta, e variou de 11,24 a 54,17 mM com a suplementação de até 20% de glicerol na dieta. Em outro estudo realizado por Simon et al. (1997) frangos de corte recebendo 10% de glicerol na dieta, a concentração de glicerol no músculo do peito aumentou de 0,4 $\mu\text{mol/g}$ para 7,7 $\mu\text{mol/g}$.

Portanto observou-se neste bioensaio que concentração de glicerol no soro está abaixo dos valores encontrados pelo autor supracitado, pois estes variaram de 15 mg/100g (1,80 mM) a 85 mg/100g (9,00 mM) com a suplementação de até 10% de glicerina na dieta.

Segundo Robinson e Newsholme (1969) a atividade enzimática de transformação do glicerol é limitada, e quando consumido em excesso, ele pode não ser totalmente metabolizado e ter seu nível aumentado no sangue.

Estudos realizados por Lammers et al. (2008a) observaram que suínos em terminação conseguem metabolizar o glicerol em níveis de até 10% na dieta. Para Neto (2011) a capacidade de metabolização do glicerol em cães é maior do que em outros animais não ruminantes.

Em aves, o mesmo não ocorre, pois com a inclusão de 10% de glicerol na dieta a capacidade de metabolização do glicerol é excedida, causando um aumento do glicerol no sangue (GIANFELICI, 2009).

Do mesmo modo Min et al. (2010) concluíram que em altas taxas de inclusão de glicerol, as aves aparentemente não são capazes de metabolizar todo o glicerol absorvido.

Na Figura 9, podemos avaliar as médias relacionadas no consumo de ração das aves, durante o período em que foram realizadas as coletas de sangue para a análise do glicerol. Porém, a relação entre o consumo de ração e o aumento da concentração de glicerol no sangue não estão diretamente relacionados.

De acordo com a Figura 9, o consumo de ração foi maior nas concentrações de 5,0% e 2,5% de glicerina bruta, por consequência, os animais alimentados com os respectivos tratamentos tiveram um pequeno acréscimo da concentração de glicerol no sangue, sendo capazes de metabolizar o glicerol facilmente.

As aves que receberam dietas contendo 7,5% e 10,0% de glicerina consumiram menos ração, e de acordo com a Figura 1 observou-se um aumento considerável da concentração de glicerol no sangue, principalmente no tratamento com 10,0% de glicerina bruta.

Figura 9 - Consumo médio de ração (g) de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta na dieta

Sabe-se que a metabolização do glicerol é feita principalmente pelo fígado e rins, e outros tecidos como o cérebro, pulmão, mucosa intestinal, tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco, leucócitos, fibroblastos e espermatozóides também fazem o uso do glicerol, porém em menor quantidade (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2008).

Doerschuk (1951) afirma que o glicerol metabolizado no organismo animal depende de várias enzimas, e que a enzima glicerol quinase é uma das limitantes para o seu uso (VERNON; WALKER, 1970).

Lin et al. (1976) relataram que o uso do glicerol depende das enzimas glicerol quinase e deidroxiacetona fosfato desidrogenase. Quando superadas as capacidades de transformação destas duas enzimas, o glicerol deixa de ser metabolizado, sendo, conseqüentemente, eliminado pelo organismo (HANSEN et al., 2009). Presume-se que o excesso do glicerol, seja excretado na urina,

principalmente, quando utilizados altos níveis de inclusão (BARTELT; SCHNEIDER, 2002; DASARI, 2007; GIANFELICI, 2009).

O excesso de glicerol fornecido na dieta dos animais pode induzir a adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, especialmente no fígado, podendo alterar também os rins (CRYER; HARTLEY, 1973).

Lin et al. (1976) estudaram o efeito da glicerina na atividade lipogênica em ratos e frangos, e comprovaram que a adição de 20% de glicerina na dieta de ratos, por três semanas, causou aumento do peso de fígado e um aumento marcante na atividade de enzimas lipogênicas nesse órgão. Por outro lado, nos frangos não foi verificada alteração no peso de fígado e ocorreu uma queda na atividade das enzimas lipogênicas.

Porém, neste estudo, em avaliações visuais realizadas no fígado durante o abate, não foram encontrados alterações na cor ou presença de lesões, o que está de acordo com Kijora et al (1995), que também não encontraram alterações hepáticas ou renais em suínos alimentados com dietas contendo até 10% de glicerina.

Com relação à concentração de glicerol no fígado, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 6). Os resultados diferem de Simon et al. (1997) que concluíram que a concentração de glicerol no fígado aumentou de 18 $\mu\text{mol/g}$ para 40 $\mu\text{mol/g}$, conforme o nível de glicerol na dieta.

Tabela 6 - Peso do fígado (PF) e concentração de glicerol no fígado (CGF) das aves submetidas a diferentes concentrações de glicerina bruta na dieta

Variáveis	Glicerina Bruta (%)						C.V (%)
	N	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
PF (g)	4	56,30 ^{ns}	51,30 ^{ns}	48,80 ^{ns}	49,00 ^{ns}	47,00 ^{ns}	12,97
CGF (mg/100g)	4	42,86 ^{ns}	37,90 ^{ns}	45,44 ^{ns}	28,44 ^{ns}	34,62 ^{ns}	38,26

^{ns} : não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

C.V(%): Coeficiente de variação

n: número de repetições/tratamento

Desse modo, os resultados avaliados no biensaio comprovaram que não foram detectados excesso de glicerol no fígado, uma vez que, grande parte do metabolismo do glicerol ocorre no fígado e nos rins.

4.1.2 Parâmetros sanguíneos

O glicerol presente na glicerina pode ser utilizado como precursor para a síntese de triacilgliceróis pelo organismo (BRISSON et al., 2001).

Os primeiros estudos avaliando a utilização da glicerina na alimentação animal e seus efeitos nos níveis plasmáticos foram realizados por Narayan e McMullen (1979). Estes estudos mostraram efeito estimulador da glicerina fornecida a aves e ratos sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol.

Entretanto, no presente estudo, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) nas concentrações de triacilgliceróis e colesterol total entre o grupo controle e os grupos que receberam dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina (Tabela 7).

Se for tomada como referência a faixa de variação de triacilgliceróis ($71,4 \pm 19,4 \text{ mg dL}^{-1}$), descrita por González et al. (2001) e Evans et al. (1977) ($150 \pm 14 \text{ mg dL}^{-1}$) para frangos de corte sadios da linhagem Cobb aos 32 dias de idade, os valores encontrados por ambos os autores estão superiores aos obtidos neste estudo (aproximadamente 37 a 40 mg dL^{-1}). Possivelmente, o glicerol foi utilizado mais intensamente para a produção de glicose ou para o fornecimento de energia.

Tabela 7 - Valores médios dos teores de sanguíneos de triacilgliceróis e colesterol total de aves alimentadas com níveis crescentes de glicerina bruta (21 a 35 dias de idade)

Variáveis	Glicerina Bruta (%)						C.V (%)
	n	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
Triacilgliceróis (mg dL^{-1})	4	39,7 ^{ns}	39,1 ^{ns}	39,1 ^{ns}	37,5 ^{ns}	37,2 ^{ns}	19,19
Colesterol total (mg dL^{-1})	4	131,3 ^{ns}	137,4 ^{ns}	150,1 ^{ns}	149,2 ^{ns}	151,0 ^{ns}	16,32

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

C.V (%): Coeficiente de variação

n: número de repetição/tratamento

Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira et al. (2008), quando adicionou resíduos de manga em quantidades crescentes à ração de frangos de corte, e observou uma redução nos índices de triacilgliceróis. Souza et al. (2010) avaliaram a suplementação de cromo na dieta de frangos de corte (0, 150, 300, 450 e $600 \mu\text{g/kg}$) e observaram diminuição dos níveis de triglicerídeos.

Da mesma forma, Carrijo et al. (2005) relataram que a administração de alho em dietas para frangos de corte reduziu os níveis séricos de colesterol e triacilgliceróis. Mendonça et al. (2000) avaliando a inclusão de níveis crescentes de óleo de peixe na dieta de poedeiras verificaram redução numérica das concentrações de triacilgliceróis e colesterol plasmáticos, embora significância estatística não tenha sido observada devido à alta variabilidade do experimento.

Com relação aos resultados de colesterol total, é possível afirmar que não houve efeito da glicerina bruta sobre os teores de colesterol. Os valores encontrados estão dentro da faixa de valores mencionados na literatura para aves, que foram $131,33 \pm 19,75 \text{ mg dL}^{-1}$, de acordo com Abd-Elsamee et al. (2010).

Entretanto, pode-se notar que os níveis mais altos de glicerina na dieta resultaram em aumento não significativo de cerca de 15% no colesterol sanguíneo total.

4.2 Experimento II

4.2.1 Consumo de água e ração

Na Figura 10 encontram-se os resultados referentes ao consumo de água das aves que receberam ração com níveis crescentes de glicerina. As análises indicaram que houve interação ($P < 0,05$) entre os níveis de glicerina e o consumo de água. No entanto, no 4º dia de idade, aves consumindo dietas com inclusão de glicerina bruta nos níveis de 2,5%; 7,5% e 10,0% tiveram um aumento significativo ($P < 0,05$) no consumo de água. Do mesmo modo, no 8º dia de idade, o consumo de água foi significativamente maior ($P < 0,05$) para tratamentos com 5,0%; 7,5% e 10,0% de inclusão de glicerina.

Presume-se que o aumento do consumo de água dos animais durante o 4º e 8º dia de idade, esteja relacionado a um período de adaptação em que as aves passaram a se alimentar com glicerina. É importante salientar que foram corrigidos os teores de sódio e cloro da glicerina para a formulação da dieta.

Gianfelici (2009) avaliando o consumo diário de água em frangos de corte alimentados com glicerina nos níveis de 0; 2,5; 5,0 e 10,0% no período de 21 a 38

dias de idade, observou um aumento no consumo e excreção de água a partir do nível de 7,5% de glicerina na dieta.

Os resultados do presente estudo não se assemelham aos encontrados por Gianfelici (2009). Provavelmente este aumento no consumo e excreção da água passa ser atribuído a não correção do teor de sódio da glicerina na ração, excedendo possivelmente as recomendações nutricionais de sódio para estes animais.

*Efeito significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

Figura 10 - Estimativa do consumo de água em frangos de corte 1 a 40 dias de idade alimentados com glicerina na dieta

De acordo com Simon et al. (1997), o aumento no consumo e excreção de água pelas aves, pode ser influenciado pelos níveis de sódio ou potássio presentes na glicerina, os quais podem variar dependendo do processamento para obtenção desse produto.

Dependendo do catalisador utilizado na produção do biodiesel, a glicerina bruta gerada pode conter 6 a 8% de sais de sódio ou potássio. No entanto, nos processos adotados nas plantas do Brasil é mais comum a presença do cloreto de sódio, sendo que as especificações da indústria apontam um limite de 7% para este sal. Esta quantidade equivale a aproximadamente 2,75% de sódio na glicerina bruta, e uma adição de 10% de glicerina bruta na ração seria responsável pelo aporte de

0,275% de sódio na ração, o que já excede os valores de exigências nutricionais para frangos de corte (0,19 a 0,22% de sódio), segundo (Rostagno et al., 2011).

Para Min et al. (2010) a presença significativa de NaCl na glicerina para a alimentação de aves, pode ser uma preocupação com sua utilização nas rações, pelo aumento na ingestão e excreção de água e, conseqüentemente, na umidade da cama. Desequilíbrios no balanceamento de eletrólitos, causados por excesso de Na ou K, levam a efeitos negativos na qualidade da cama.

Com relação ao consumo de ração houve uma interação ($P < 0,05$) entre os níveis de glicerina e o consumo de ração. Observou-se que houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no 8º e 12º dia de idade das aves consumindo 2,5% e 7,5% de glicerina bruta na dieta e uma redução no consumo de ração no tratamento com 10,0% de glicerina (Figura 11). Nas demais idades, até o 40º dia de idade, não foram identificadas qualquer tendência dos níveis de glicerina na dieta sobre o consumo de ração.

*Efeito significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

Figura 11 - Estimativa do consumo de ração em frangos de corte 1 a 40 dias de idade alimentados com glicerina na dieta

Estudos realizados anteriormente por Simon et al. (1997), Cerrate et al. (2006) e Silva (2010), utilizando glicerina na dieta para frangos de corte, concluíram que níveis elevados de glicerina na ração proporcionaram aumento no consumo de ração nos primeiros dias de criação das aves.

Porém, os resultados deste experimento demonstraram um aumento no consumo de ração no nível de 2,5% de glicerina na dieta, discordando com os resultados encontrados pelos autores anteriores, que se referem um aumento no consumo de ração em função de maiores níveis de glicerina na ração.

Já Lammers et al. (2008b), testando inclusão de até 15% de glicerina bruta na dieta de galinhas poedeiras, não observaram qualquer efeito sobre o consumo diário de ração ou na produção de ovos, peso dos ovos e massa dos ovos produzidos.

Os resultados não se assemelham aos encontrados por Fernandes et al. (2012), que não observaram efeito sobre o consumo de ração, avaliando inclusões de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5% de glicerina destilada na ração em frangos de corte de 1 a 8 dias de idade, que também não corroboram com Silva et al. (2012) que concluíram um aumento no consumo de ração conforme aumentava o nível de glicerina na dieta em frangos de corte de 22 a 34 dias de idade.

Ainda na Figura 11, nota-se uma tendência geral de decréscimo no consumo de ração no 36° e no 40° dia de idade das aves. Presume-se que essa diminuição tenha ocorrido porque os animais não se encontravam na zona de termoneutralidade nesses dias, uma vez que as temperaturas registradas dentro da sala de metabolismo neste período atingiram a máxima de 30 °C.

Conforme Azevêdo et al. (2007), a zona de termoneutralidade é uma faixa de temperatura ambiente efetiva na qual o animal não sofre estresse pelo frio ou pelo calor. Dentro da zona de termoneutralidade o custo fisiológico é mínimo, a retenção de energia da dieta é máxima, a temperatura corporal e o apetite são normais, consequentemente há condições para uma ótima produção.

Analisando as Figuras 10 e 11, podemos observar uma diminuição no consumo de água no 40° dia de idade das aves, concomitante ao baixo consumo de ração, pois este está diretamente relacionado ao consumo de água.

Na Figura 12 encontram-se os dados da relação consumo de água:consumo de ração. Não foi encontrada diferença ($P>0,05$) entre tratamentos com diferentes níveis de inclusão de glicerina.

Nota-se que os valores da relação consumo de água:consumo de ração se mantiveram na faixa de 2,0 a 2,5, apresentando-se dentro dos padrões estabelecidos pelo Nutrient Requirements of Poultry (1994) para frangos de corte.

Figura 12 - Relação do consumo de água (mL) com o consumo de ração (g) de frangos de corte alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta

4.2.2 Umidade das excretas e conteúdo ileal

Avaliando os dados da umidade das excretas do 16° ao 40° dias de idade (Figura 13), pode-se observar que animais consumindo dietas com inclusão de 5,0%; 7,5% e 10,0% de glicerina bruta tiveram a umidade aumentada significativamente ($P < 0,05$) no 16° e 20° dia de idade, mas não nas demais coletas.

Os resultados se assemelham aos encontrados por Gianfelici (2009) que observou um aumento significativo na umidade das excretas, com altos níveis de glicerina na dieta.

*Efeito significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

Figura 13 - Efeito das dietas com níveis crescentes de glicerina bruta na umidade das excretas em frangos de corte

Em estudos realizados por Boso (2011) avaliando a inclusão de glicerina bruta e semipurificada na dieta para poedeiras, o autor concluiu que houve um aumento na umidade das excretas conforme aumentava o nível de glicerina na ração, e a principal causa desse aumento foi atribuída ao nível de sódio presente nas glicerinas, de 1,990 e 1,040% para a glicerina bruta e semipurificada, respectivamente.

Do mesmo modo, Lammers et al. (2008b), trabalhando com poedeiras, notaram que usando dietas contendo 15% de glicerina, a umidade de excreta foi significativamente maior do que nos outros tratamentos. Esses autores concluíram que o aumento da umidade, foi devido a uma falta de balanceamento de sódio da ração, pois a glicerina utilizada tinha 1,26% de sódio e não foi ajustada em relação à ração basal que continha 0,21% de sódio, excedendo assim os níveis recomendados para poedeiras.

Cerrate et al. (2006) também observaram aumento na umidade da cama com a inclusão de 10% de glicerina nas rações e possivelmente esse aumento da umidade das excretas estaria relacionado com o excesso de 0,15% de potássio, proveniente do resíduo de catalisador utilizado na reação de transesterificação.

Observações semelhantes foram realizadas por Dilworth et al. (1971), Hurwitz et al. (1973), Borges et al. (1996) e Murakami et al. (1997).

Dados semelhantes a esses foram encontrados por Silva (2010) avaliando a inclusão de níveis crescentes de glicerina em dietas de frangos de corte, detectou um aumento da umidade da cama das aves alimentadas com 10% de glicerina a partir da terceira semana de criação.

Guerra (2011) também notou aumento da umidade de cama de frangos de corte quando usou 10% de inclusão de glicerina bruta, pressupondo que este aumento poderia estar relacionado com altos teores de sódio e potássio da dieta.

Portanto neste experimento, observou-se que não houve aumento da umidade das excretas (exceto no 16° e 20° dia) e que o consumo de água pelas aves não influenciou a umidade das excretas, uma vez que, foram realizados todos os ajustes necessários em relação aos teores de sódio e cloro da glicerina nas dietas.

Vale ressaltar que durante o período experimental observou-se, a partir do 32° dia de idade, que aves consumindo dietas com 7,5% e 10% de glicerina apresentaram excretas com aspecto diarréico, possivelmente proveniente de um excesso glicerol que foi eliminado na urina pelos animais.

Neste contexto, sabe-se que existe uma limitação na ativação de enzimas para utilização de glicerol (DOPPENBERG; VAN DER AAR, 2007) e que altos níveis de inclusão de glicerina na dieta proporcionam baixo conteúdo energético, pois o sistema enzimático (glicerol quinase) torna-se saturado na conversão do glicerol para glicerol-3-fosfato, sendo este glicerol em excesso, excretado.

Com relação aos resultados da umidade da digesta ileal, não foi encontrado diferença ($P>0,05$) entre tratamentos com inclusão de glicerina na ração (Tabela 8).

Tabela 8 - Umidade da digesta ileal em frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta

Variável	Glicerina Bruta (%)						C.V (%)
	n	0	2,5	5,0	7,5	10,0	
Umidade da digesta (%)	4	81,1 ^{ns}	82,5 ^{ns}	82,2 ^{ns}	81,7 ^{ns}	81,8 ^{ns}	2,02

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

C.V (%): Coeficiente de variação

n: número de repetições/tratamento

Os resultados corroboram com Gianfelici (2009) que não encontrou qualquer efeito da glicerina na umidade do conteúdo ileal. Na Figura 14 pode-se observar que durante a coleta do conteúdo da digesta, estas se apresentaram com aspecto normal.

Figura 14 - Aspecto da digesta ileal durante a coleta

Portanto, o uso da glicerina na dieta para frangos de corte não provoca alteração na consistência da digesta ileal.

4.2.3 Avaliação histológica do duodeno

Foram avaliadas a altura de vilosidades, profundidade de criptas e a relação altura de vilosidade:profundidade de cripta em frangos alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (0; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10,0%).

Houve efeito linear ($P < 0,01$) dos níveis de glicerina, aumentando a profundidade de cripta e reduzindo a relação altura de vilosidade:profundidade de cripta, sem afetar o comprimento da vilosidade (Figuras 15 e 16).

Tabela 9 - Altura das vilosidades (AV), profundidade das criptas (PC) e relação altura de vilosidade:profundidade de cripta (AV:PC) do duodeno de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade em função dos tratamentos experimentais

Variáveis	Glicerina Bruta (%)						Efeito ¹	P
	n	0	2,5	5,0	7,5	10,0		
AV (µm)	4	1054	1191	956	1075	1053	NS	0,44
PC (µm)	4	119	119	164	204	209	L	<0,01
AV:PC (µm)	4	8,9	10,9	6,02	5,28	5,03	L	<0,01

n: número de repetições/tratamento

¹Efeito linear (L); efeito não significativo (NS)

Diversos fatores relacionados à nutrição, manejo, genética e sanidade podem influenciar a relação altura de vilosidade e profundidade de criptas (FUKAYAMA et al., 2005). Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por Schwarz et al. (2002) que observaram que frangos de corte recebendo *Saccharomyces cerevisiae* na dieta, apresentaram maiores profundidades de cripta.

Pluske et al. (1997) e Utiyama (2004) afirmam que a maior profundidade de cripta indica maior atividade proliferativa celular, para garantir adequada taxa de renovação epitelial, compensando as perdas nas alturas das vilosidades, fato este contraditório ao que se observou neste experimento, uma vez que não houve diferença na altura dos vilos com o uso de glicerina na ração.

Figura 15 - Fotomicrografia da mucosa de duodeno de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (GB) na dieta. Setas indicam os pontos utilizados para medição da altura de vilosidades e cabeças de seta para a profundidade de criptas. A-B: tratamento controle; C-D: tratamento com 2,5% de GB; E-F: tratamento com 5,0% de GB

Figura 16 - Fotomicrografia da mucosa de duodeno de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com níveis crescentes de glicerina bruta (GB) na dieta. Setas indicam os pontos utilizados para medição da altura de vilosidades e cabeças de seta para a profundidade de criptas. A-B: tratamento com 7,5% de GB; E-F: tratamento com 10,0% de GB

5 CONCLUSÕES

A glicerina de biodiesel pode ser incluída nas rações de frangos de corte em até 7,5% sem influenciar a metabolização do glicerol no organismo. No entanto, níveis elevados de glicerina na ração podem induzir alterações metabólicas em frangos de corte com aumento do glicerol sanguíneo, do consumo de água, da umidade das excretas e da taxa de reposição celular do epitélio intestinal.

REFERÊNCIAS

ABD-ELSAMEE, M.O.; ABDO, Z.M.A.; EL-MANYLAWI, M.A.F.; SALIM, I.H. Use of crude glycerin in broiler diets. **Egypty Poultry Science**, Giza, v. 30, p. 281-295, 2010.

AZEVÊDO, D.M.; AZEVEDO, D.; SOUZA, E.S. O estresse térmico em bovinos leiteiros Parte 2: O ambiente e o animal. **Agrolink**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=2786>>. Acesso em: 10 out. 2012.

BARTLET, J.; SCHNEIDER, D. Investigation on the energy value of glycerol in the feeding of poultry and pig. **Union for the Promotion of Oilseeds-Schriften Heft**, Berlin, v. 17, p. 15-36, 2002.

BERENCHTEIN, B.; COSTA, L.B.; BRAZ, D.B.; ALMEIDA, V.V.; TSE, M.L.P.; MIYADA, V.S. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 7, p. 1491-1496, 2010.

BERGMAN, E.N.; KATZ, M.L.; KAUFMAN, C.F. Quantitative aspects of hepatic and portal glucose metabolism and turnover in sheep. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 219, n. 3, p. 785-793, 1970.

BERNAL, J. Efecto de la inclusión de glycerol o aceite vegetal a dietas com melaza para suínos e aves em crecimiento. **Veterinária México**, México, v. 3, p. 91-94, 1978.

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

BODARSKI, R.; WERTELECKI, T.; BOMMER, F.; GOSIEWSKI, S. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding TMR with glycerin (Glycerol) supplement at periparturient period. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Poland, v. 8, p.1-9, 2005.

BONNARDEAUX, J. Glycerin overview. **Department of agriculture and food**, Western, 2006. Disponível em: <http://159.207.224.130/content/SUST/biofuel/GLYCERINOVERVIEW.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2012.

BORGES, S.A.; ARIKI, J.; JERÔNIMO JR., R.; STRINGHINI, J.H. Níveis de sal (NaCl) em rações de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1996. p.27-30.

BOSO, K.M.O. **Utilização de diferentes tipos de glicerina na alimentação de poedeiras comerciais**. 2011. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2011.

BRASIL. Resolução ANP nº 42, de 16 de dezembro de 2009. Dispõe sobre a especificação do Biodiesel B100. Brasília, 2009. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em: 15 maio 2012.

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

CARRIJO, A.S.; MADEIRA, L.A.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; GONÇALVES, J.C.; CRUZ, V.C.; KUIBIDA, K.V.; PINHEIRO, D.F. Alho em pó na alimentação alternativa de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 673-679, 2005.

CERRATE, S.E.; YAN, F.; WANG, Z.; COTO, C.; SACAKLI, P.; WALDROUP, P.W. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 5, n.11, p. 1001-1007, 2006.

CHRISTOPHER, S.M. **Evaluation of the Nutritional Value of glycerol, a byproduct of biodiesel production, for swine**. 2009. 54p. (Master Animal Science) - North Carolina State University, Raleigh, 2009.

CRYER, A.; HARTLEY, W. Studies on the adaptation of rats to a diet high in glycerol. **International Journal of Biochemistry**, London, v. 4, p. 293-308, 1973.

COSTA, B.J.; OLIVEIRA, S.M.M. de. Produção de biodiesel. **Tecpar**, Curitiba, 2006. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br/dossies-tecnicos>. Acesso em: 24 maio 2012.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, EUA, v. 28, p. 225-231, 2005.

DASARI, M.A. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Bloomington, v. 79, p.16-19, 2007.

DILWORTH, B.C.; SCHULTZ, C.D.; DAY, E.J. Observations with broilers fed varying dietary sodium chloride levels from 56 to 63 days of age. In: ANNUAL PFIZER RESEARCH CONFERENCE, 19., 1971, Chicago. **Proceedings...** Chicago: PFIZER, 1971. p. 98-101.

DOERSCHUK, A.P. Some studies on the metabolism of glycerol-1-C14. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 39-44, 1951.

DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P.J. Biofuels: Implications for the feed industry. **Wageningen Academic Publishers**, Netherlands, v. 1, p. 73-88, 2007.

DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A.; KIDD, M.T.; WEBER, T.E.; BREGENDAHL, K. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. **Poultry Science**, Savoy, v. 87, p. 317-322, 2008.

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**, Colchester, v. 24, p. 565-571, 1983.

EVANS, A.J.; BANNISTER, D.W.; WHITEHEAD, C.C.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A. Changes in plasma lipid and glucose levels during the onset of fatty liver and kidney syndrome in chicks. **Research in Veterinary Science**, London, v. 23, p. 275-279, 1977.

FELIZARDO, P.M.G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura**. Lisboa: Instituto Técnico, 2003.123p.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J. F.; BERKEMEIR, R.; BORDADO, J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Management**, New York, v. 26, n. 5, p. 487-494, 2006.

FERNANDES, M.L.; BARBOSA, F.C.; SANTOS, E.T.; SILVA, F.F.; DOURADO, R.L.B.; FARIAS, L.A. Glicerina na alimentação de frangos de corte de 1 a 8 dias de idade criados em baterias metálicas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 2012. p. 1-3.

FREITAS, L.W.; ZAVARIZE, K.C.; MENTEN, J.M.F.; PEREIRA, R.; LIMA, M.B.; SILVA, C.L.S. Qualidade da cama de frangos alimentados com níveis crescentes de glicerina. In: CONFERÊNCIA FACTA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011, Santos. **Anais...** Santos: Facta, 2011. 1 CD-ROM.

FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERALDO, A.; KATO, R.K.; MURGAS, L.D.S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 2316-2326, 2005.

GERPEN, J.V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, Netherlands, v. 86, p.1097-1107, 2005.

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

GONZÁLEZ, F.H.D.; HAIDA, K.S.; MAHL, D.; GIANNESI, G.; KRONBAUER, E. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, p.141-147, 2001.

GOTT, P. Variation in the Chemical Composition of Crude Glycerin. **The Ohio State University**, Columbus, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1811/37082>>. Acesso em: 29 out. 2012.

GROESBECK, C.N.; MCKINNEY, L.J.; DEROUCHÉY, J.M.; TOKACH, M.D.; GOODBAND, S.S.; DRITZ, J.L.; NELSEN, A.W.; DUTTLINGER, A.C.; FAHRENHOLZ, A.C.; BEHNKE, K.C. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 201-202, 2008.

GUERRA, R.L.H.; MURAKAMI, A.E.; GARCIA, A.F.Q.M.; URGNANI, J.F.; MOREIRA, I.; PICOLI, K.P. Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.12, n. 4, p.1038-1050, 2011.

GUYTON, A.C. **Textbook of Medical Physiology**. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 1014p.

HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A.S. Physiology roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, p. 1386-1392, 2006.

HAZEL, P.; PACHAURI, R.K. Bioenergy and agriculture: promises and challenges. **International Food Policy Research Institute**, Whashington, v. 14. p. 1-12, 2006.

HANSEN, C.F.; HERNANDEZ, A.; MULLAN, B.P.; MOORE, K.; TREZONA-MURRAY, M.; KING, R.H.; PLUSKE, J.R. 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**, Austrália, v. 49, p. 154-161, 2009.

HURWITZ, S.; COHEN, I.; BAR, A.; BORNSTEIN, S. Sodium and chloride requirements of the chick: relationship to acid-base balance. **Poultry Science**, Savoy, v. 52, n. 3, p. 903-909, 1973.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; KUPSCH, R.D.; HAGEMAN, L. Glycerol as a feed component in fattening pigs. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 345-360, 1995.

KREBS, H.A.; NOTTON, B.M.; HEMS, R. Gluconeogenesis in mouse-liver slices. **Biochemistry Journal**, London, v. 101, p. 607-617, 1966.

KREBS, H.A.; LUND, P. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemistry Journal**, London, v. 98, p. 210-214, 1966.

KRUEGER, N.A.; ANDERSON, R.C.; TEDESCHI, L.O.; CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; NISBET, D.J. Evaluation of feeding glycerol on free fatty acid production and fermentation kinetics in vitro. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 8469–8472, 2010.

LAMMERS, P.J.; KERR, B.J.; WEBER, T.E.; DOZIER, W.A.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K.; HONEYMAN, M.S. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 602-608, 2008a.

LAMMERS, P.; KERR, B.J.; HONEYMAN, M.; STALDER, K.; DOZIER, W.A.; WEBER, T.E.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008b.

LIAO, X.; ZHU, Y.; WANG, S-G.; LI, Y. Producing triacetyl glycerol with glycerol by two steps: esterification and acetylation. **Fuel Processing Technology**, Netherlands, v. 90, p. 988-993, 2009.

LIMA, D.C.; NETTO, M.V.T.; FELIX, A.P.; FAISCA, L.; BORTOLO, M.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibilidade de dietas contendo diferentes níveis de glicerina em cães In: SIMPÓSIO DE COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2010. p.79-81.

LIN, M.H.; ROMSOS, D.R.; LEVEILLE, G.A. Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acids synthesis in the rat and chicken. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 106, p. 1668-1677, 1976.

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

LOFRANO, R.Z.C. Uma revisão sobre biodiesel. **Revista Científica do UNIFAE**, São João da Boa Vista, v. 2, n. 2, p. 83-89, 2008.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. San Diego: Academic, 1997. 883p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria e Produção e Agroenergia. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 29 jun. 2012.

MENDONÇA, C.X.; MARTINS, A.P.; MORI, A.V.; SILVA, E.B.; MORI, C.S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípides plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 398-404, 2000.

MENDOZA, O.F.; ELLIS, M.; MCKEITH, F.K.; GAINES, A.M. Metabolizable energy content of refined glycerin and its effects on growth performance, and carcass and pork quality characteristics of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 88, p. 3887-3895, 2010.

MENTEN, J.F.M.; MIYADA, V.S.; BERENCHTEIN, B. Glicerol na alimentação animal. In: SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 1992, Campinas: **Anais...** Campinas: CBNA, 2008. p.101-114.

MENTEN, J.F.M.; ZAVARIZE, K.C.; SILVA, C.L.S. Biodiesel: Oportunidades do uso de glicerina na nutrição de aves. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4., 2010, São Pedro. **Anais...** São Pedro: CBNA, 2010. 1 CD-ROM.

MIN, Y.N.; YAN, F.; LIU, F.Z.; COTO, C.; WALDROUP, P.W. Glycerin-A new energy source for poultry. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2010.

MORRISON, L.R. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, 1994. 1152p.

MURAKAMI, A.E.; SALEH, E.A.; ENGLAND, J.A.; DICKEY, D.A.; WATKINS, S.E.; WALDROUP, P.W. Effect of level and source of sodium on performance of male broilers to 56 days. **Journal of Applied Poultry Research**, Washington, v. 6, n. 1, p.128-136, 1997.

NARAYAN, K.; MCMULLEN, J. The interactive effect of dietary glycerol and corn oil on rat liver lipids, serum lipids and serum lipoproteins. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 109, p.1836-1846, 1979.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th ed. Washington: National Academy Press, 1994. 176p.

NEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 10, p. 248-268, 2006.

NETO, B.P. **Uso de glicerina na alimentação de cães adultos**. 2011. 32p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

NEU, D.H. **Glicerol na dieta de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 58p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2011.

PASQUETTI, T.J. **Avaliação nutricional da glicerina bruta ou semipurificada, oriundas de gordura animal e óleo vegetal, para codornas de corte**. 2011. 110p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

PASTEUR, L. Production constante de glycerine dans la fermentation alcoolique. **Academy of Science of the Czech Republic**, Prague, v. 46, p. 857-856, 1858.

PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 653- 657, 2009.

PIESKER, M; DERSJANT-LI, Y. Glycerol in Animal Nutrition - versatile coproduct of biodiesel production. **Feedmagazine Kraftfutter**, Kraftfutter, v. 89, p. 16-23, 2006.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, London, v. 51, p. 215-236, 1997.

REHM, H.J. Microbial production of glycerol and other polyols. **Biotechnology**, Verlagsgesellschaft, v.6, p.51-59, 1988.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILLO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de Biodiesel. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, p. 44-51, 2007.

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

ROBINSON, J.; NEWSHOLME, A. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 112, p. 449, 1969.

ROSEBROUGH, R.W.; GEIS, E.; JAMES, P.; OTA, H.; WHITEHEAD, J. Effects of dietary energy substitutions on reproductive performance, feed efficiency and lipogenic enzyme activity on large white turkey hens. **Poultry Science**, Savoy, v. 59, p. 1485-1492, 1980.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.

ROUDIER N.; VERBAVATZ J.M.; MAUREL, C.; RIPOCHE, P.; TACNET, F. Evidence for the presence of Aquaporin-3 in Human red blood cells. *The Journal of Biological Chemistry*, London, v. 273, p. 8407-8412, 1998.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: user's guide. Version 9.2 ed. Cary, 2010.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Diets for ruminants. **University of Kiel**, Kiel, 2007. Disponível em: <http://regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm>. Acesso em: 19 maio 2012.

SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G.; FEDALTO, L.M.; BORGES, S.A.; SILVA, A.V.; PEDROSO, A.C. Efeitos de antimicrobianos, probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho e morfologia do jejuno de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, p. 35-41, 2002.

SEHU, A.; KUCUKERSAN, S.; COSKUN, B.; KOKSAL, B.H.; CITIL, O.B. Effects of dietary glycerol addition on growth performance, carcass traits and fatty acid distribution in cloacal fat in broiler chickens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 4, p.194-200, 2012.

SHUCHARDT, U.F.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, p. 199-210, 1998.

SILVA, C.L.S. **Glicerina proveniente da produção de biodiesel como ingrediente de ração para frangos de corte**. 2010. 81p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

SILVA, J.V.; SANTOS, N.C.; RIBEIRO, D.F.; BARBOSA, E.C.; SILVA, P.P.; DOURADO, R.L.B. Glicerina na alimentação de frangos de corte no período de 22 a 34 dias de idade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 2012. p. 45-48.

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

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

SOUZA, L.M.G.; MURAKAMI, A.E.; FERNANDES, J.I.M.; GUERRA, R.L.H.; MARTINS, E.N. Influência do cromo no desempenho, na qualidade da carne e no teor de lipídeos no plasma sanguíneo de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 808-814, 2010.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L.; BERG, J.M. **Bioquímica**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2008. 1114p.

SÜDEKUM, K.H. Co-products from biodiesel production. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. (Ed). **Recent advances in animal nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 2008. p. 210-219.

SWARTZ, M.E. Ultra performance liquid chromatography (UPLC™). **LCGC North America**, New York, v. 8, p.8-14, 2005.

UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém desmamados**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

VERNON, R.G.; WALKER, D.G. Glycerol Metabolism in the Neonatal Rat. **Biochemical Journal**, Portland, v. 118, n. 3. p. 531-536, 1970.

VIEIRA, P.A.F.; QUEIROZ, J.H.; ALBINO, L.F.T.; MORAES, G.H.K.; BARBOSA, A.A.; MÜLLER, E.S.; VIANA, M.T.S. Efeitos da inclusão de farelo do resíduo de manga no desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.12, p.2173-2178, 2008.

WAGNER, H. Glycerol in animal feeding - a byproduct of alternative fuel production. **Muhle + Mischfuttertechnik**, Berlin, v. 131, p. 621-622, 1994.

YALCIN, S.; EROL, H.; ÖZSOY, B.; ONBASILAR, İ.; ÜNER, A. Effects of glycerol on performance, egg traits, some blood parameters and antibody production to SRBC of laying hens. **Journal of Livestock Science**, České Budějovice, v. 129, n.1, p.129-134, 2010.

YUASA, H.; HAMAMOTO, K.; DOGU, S.; MARUTANI, T.; NAKAJIMA, A.; KATO, T.; HAYASHI, Y.; INOUE, K.; WATANABE, J. Saturable Absorption of Glycerol in the Rat Intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 11, p. 1633-1636, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Temperaturas mínimas e máximas registradas no interior da sala de metabolismo (Experimento I)

Data	Temperatura	
	Mínima	Máxima
20/08/2011	17,0	23,0
21/08/2011	16,0	19,5
22/08/2011	16,0	22,0
23/08/2011	18,0	22,0
24/08/2011	19,0	28,0
25/08/2011	20,0	26,0
26/08/2011	19,5	32,0
27/08/2011	21,0	30,0
28/08/2011	22,0	32,0
29/08/2011	22,0	33,0
30/08/2011	21,0	32,0
31/08/2011	15,0	21,0
01/09/2011	14,0	25,0
02/09/2011	16,0	24,0
03/09/2011	16,0	25,0
04/09/2011	15,0	23,0
05/09/2011	17,0	32,0

APÊNDICE B - Temperaturas mínimas e máximas registradas no interior da sala de metabolismo (Experimento II)

Temperatura			Temperatura		
Data	Mínima	Máxima	Data	Mínima	Máxima
18/10/2011	17,0	27,0	08/11/2011	19,0	30,0
19/10/2011	17,0	30,0	09/11/2011	21,0	29,0
20/10/2011	20,0	29,0	10/11/2011	23,0	34,0
21/10/2011	19,0	29,0	11/11/2011	23,0	33,0
22/10/2011	22,0	30,0	12/11/2011	24,0	31,0
23/10/2011	21,0	31,0	13/11/2011	21,0	28,0
24/10/2011	23,0	31,0	14/11/2011	19,0	23,0
25/10/2011	23,0	32,0	15/11/2011	18,0	24,0
26/10/2011	24,0	31,0	16/11/2011	18,0	23,0
27/10/2011	24,0	32,0	17/11/2011	18,5	23,0
28/10/2011	24,0	34,0	18/11/2011	18,0	29,0
29/10/2011	23,5	30,0	19/11/2011	19,0	28,0
30/10/2011	19,0	26,0	20/11/2011	19,0	30,0
31/10/2011	18,0	24,0	21/11/2011	20,0	32,0
01/11/2011	17,0	26,0	22/11/2011	20,0	27,0
02/11/2011	17,0	27,0	23/11/2011	19,0	29,0
03/11/2011	19,0	29,0	24/11/2011	20,0	30,0
04/11/2011	20,0	31,0	25/11/2011	21,0	31,0
05/11/2011	21,0	32,0	26/11/2011	19,0	31,0
06/11/2011	23,0	29,0	27/11/2011	18,0	30,0
07/11/2011	21,0	30,0	28/11/2011	18,0	29,5