

**Adriano Machado da Silva**

**Metformina no desempenho e composição corporal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com duas concentrações de carboidratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Florianópolis - SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Adriano Machado

Metformina no desempenho e composição corporal de  
tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com  
duas concentrações de carboidratos / Adriano Machado da  
Silva ; orientadora, Débora Machado Fracalossi -  
Florianópolis, SC, 2015.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Nutrição de peixes. 3. Carboidratos.  
4. Tilápia (*Oreochromis niloticus*). 5. Glicose. I.  
Fracalossi, Débora Machado. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.  
III. Título.

**Metformina no desempenho e composição corporal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com duas concentrações de carboidratos**

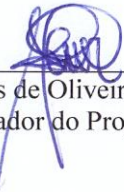
Por

ADRIANO MACHADO DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de


**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Evoy Zaniboni Filho

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jefferson Rotta

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria do Carmo Gominho Rosa



Dedico este trabalho a minha mãe, Nahita Machado, por todos os ensinamentos e amor incondicional, sendo a principal referência em minha vida.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e professora Débora Machado Fracalossi, pela oportunidade de repassar seu conhecimento e experiências que foram essenciais para a realização desta dissertação, por ser essa pessoa extremamente querida e aberta com todos os alunos. Agradeço principalmente por sua amizade.

Ao professor Gustavo Amadeu Micke pelas análises de sangue realizadas no Departamento de Química.

Ao meu amigo Jorge Filipe Banze, pela ajuda e parceria em todas as etapas de meu experimento, assim como à Renata Oselame Nobrega e Bruno Pierri.

A todos amigos e colegas que ajudaram de alguma maneira para que a pesquisa fosse realizada: Allan, Tharniê, Camila, Tati, Lizi, Fernando, Lula, Natyta, Vitor, Ana, Penélope, Lucas, Mayara e Sônia.

À equipe de análises do LABNUTRI: Amarilis, Jefferson e Janice.

A todos os amigos do “Bloco B”: Jhon, Gicella, Carol, Brunos e, em especial, ao Luciano Weiss, pela grande ajuda.

A todos os funcionários do LAPAD.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da minha bolsa de mestrado.





## RESUMO

Apesar do carboidrato ser o macronutriente que fornece a energia mais barata na composição de uma dieta, peixes possuem capacidade limitada para utilização de um de seus importantes constituintes: a glicose. A metformina (MET) é uma droga utilizada para o tratamento de diabetes, cuja função é reduzir os níveis de glicose no sangue, melhorando, assim, sua utilização pelos mamíferos. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da tilápia-do-Nilo com e sem a suplementação de 0,2% de MET, em dietas com 24% (24C) e 48% de carboidrato (48C), representando concentrações adequada e excessiva, respectivamente, deste macronutriente. Quatro grupos de 20 juvenis de tilápia-do-Nilo ( $22,00 \pm 1,45$  g) foram alimentados com cada uma das dietas experimentais duas vezes ao dia, por 80 dias. Houve interação entre a concentração de carboidrato e a presença de MET para a matéria seca e extrato etéreo corporal, as quais, na presença da droga, aumentaram nos peixes que receberam a dieta 48C, mas diminuíram naqueles que receberam a dieta 24C. Não houve efeito da suplementação de MET no desempenho dos peixes. Entretanto, o aumento na concentração de carboidrato na dieta propiciou o acúmulo de gordura corporal, aumentando significativamente os índices hepato e viscerossomáticos, enquanto o desempenho dos peixes diminuiu.

Palavras chaves: Aquicultura, Nutrição de peixes, Carboidratos, Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Glicose.



## ABSTRACT

Despite the carbohydrate is the macronutrient that provides the cheapest energy in the composition of a diet, fish have limited ability to use one of its major constituents: glucose. Metformin (MET) is a drug used for the treatment of diabetes, whose function is to reduce the glucose levels in the blood, thus improving its use by mammals. The objective of this study was to evaluate the performance of Nile tilapia with or without supplementation of 0.2% MET in diets with 24% (24C) and 48% carbohydrate (48C), representing adequate and excessive concentrations of this macronutrient, respectively. Four groups of 20 juveniles of Nile tilapia ( $22.00 \pm 1.45$  g) were fed each one of the experimental diets twice daily for 80 days. There was a significant interaction between the dietary concentration of carbohydrate and the presence of MET for body dry matter and ether extract. Those body composition fractions increased in the presence of the drug in fish fed diet 48C but decreased in those fed diet 24C. There was no effect of MET supplementation on fish performance. However, the increase in dietary carbohydrate concentration led to the accumulation of body fat, significantly increasing the hepato and viscerossomatic indexes, while decreased fish performance.

Keywords: Aquaculture, Fish nutrition, Carbohydrate, Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Glucose.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Extrusão das dietas e secagem em estufa com circulação forçada..... 67
- Figura 2.** Tanques-rede e caixas de 1000 L utilizadas para o experimento de desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ..... 67



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais..... 40
- Tabela 2.** Efeito das diferentes concentrações de carboidrato e da presença e ausência de metformina na dieta sobre o desempenho e índices hepato e vicerossomáticos de juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*..... 44
- Tabela 3.** Composição corporal final de juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentados com diferentes concentrações de carboidrato, na presença e ausência de metformina na dieta por 80 dias (expressa em matéria úmida) ..... 45





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

24C = Dieta com 24% de carboidrato

24C+MET = Dieta com 24% de carboidrato + 0,2% de Metformina

48C = Dieta com 48% de carboidrato

48C+MET = Dieta com 48% de carboidrato + 0,2% de Metformina

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

AMPK = Enzima proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

FAO = Food and Agriculture Organization of the United Nations

GLUT = Transportador de glicose

GLUT-1 = Transportador de glicose 1 (independente de insulina)

GLUT-4 = Transportador de glicose 4 (dependente de insulina)

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MET = Metformina

MPA = Ministério da Pesca e Aquicultura

NRC = National Research Council

OMS = Organização Mundial da Saúde



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>Aquicultura e tilapicultura .....</b>	<b>21</b>
<b>Carboidrato na nutrição de peixes.....</b>	<b>22</b>
<b>Metabolismo da glicose em peixes.....</b>	<b>26</b>
<b>Cloridrato de Metformina .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>Específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>35</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>Dietas experimentais e manejo alimentar .....</b>	<b>39</b>
<b>Peixes e condições experimentais .....</b>	<b>41</b>
<b>Coletas de amostras e análises .....</b>	<b>41</b>
<b>Análise de metformina no sangue .....</b>	<b>42</b>
<b>Análise estatística .....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>67</b>



## INTRODUÇÃO

### Aquicultura e tilapicultura

A aquicultura é o setor da produção animal que mais cresceu nas últimas décadas e a expectativa é que se mantenha neste ritmo, acompanhado principalmente pelo crescimento econômico dos países emergentes e pelo constante aumento do consumo de pescados pela população mundial (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004; FAO, 2014). Outro fato que ajuda na expansão dessa atividade é a estagnação da pesca, que sofreu alta desaceleração nas últimas três décadas, principalmente pelo esgotamento dos recursos pesqueiros. Por outro lado, a aquicultura cresceu em uma proporção muito alta, aumentando em aproximadamente doze vezes sua produção em relação à pesca (FAO, 2014).

No Brasil, essa tendência de expansão da atividade não é diferente. Adicionalmente, o país possui um enorme potencial hídrico, com 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 ha em reservatórios de água doce, comportando aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta (MPA, 2014).

Além disso, o pescado é uma fonte de proteína saudável, que possui um apelo comercial diferenciado em comparação à maioria das fontes proteicas de origem animal, o que aumenta sua procura pela população mundial e brasileira. Em somente uma década, no período de 2003 a 2013, o consumo *per capita* anual de pescado no mercado interno brasileiro sofreu um aumento de mais de 100%, passando de 4 kg para 9 kg. Apesar disso, ainda está abaixo daquele recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de 12 kg (FAO, 2012). Um dos fatores que ajudou a incrementar o consumo de pescado pelo mercado brasileiro foi o aumento da produção interna de pescados que, em 2011, mostrou um aumento de 31% em comparação ao ano anterior, enquanto a pesca extrativista aumentou somente 2%, confirmando a tendência mundial de estagnação dos recursos pesqueiros. Essa expansão se deve basicamente ao crescimento da piscicultura continental que, no mesmo período aumentou 38,1%, representando 86,6% do volume produzido no mercado aquícola brasileiro (MPA, 2009; MPA, 2011).

A espécie de peixe que possui maior representatividade produtiva em águas continentais no Brasil é a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família Cichlidae. Essa espécie

tem sua origem na parte oeste e leste da África e é a segunda espécie mais cultivada no mundo, principalmente por sua rusticidade e qualidades zootécnicas (POVH et al., 2005; FAO, 2012), somente perdendo para a família Cyprinidae, onde seus maiores representantes são as carpas. O Brasil é um dos sete maiores produtores de tilápia do mundo e essa espécie é uma das que mais cresce na piscicultura continental brasileira. Segundo o IBGE (2014), a tilápia sozinha representa 43,1% de toda piscicultura continental brasileira, com uma produção de 169 mil toneladas/ano em seu último levantamento. Ainda há discordâncias sobre esse valor total de produção, pois o MPA, que era o órgão responsável pelos levantamentos de produção aquícola anteriormente ao IBGE, registra que, em 2011, essa produção foi de 254 mil toneladas/ano (MPA, 2011).

Dentre as diversas espécies e híbridos de tilápias que são produzidos, cerca de 80% da produção é realizada com a espécie *Oreochromis niloticus*, ou tilápia nilótica, comumente chamada de tilápia-do-Nilo (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004), que é a espécie alvo desta dissertação.

## **Carboidratos na nutrição de peixes**

Com o crescimento cada vez maior da demanda por pescados, é preciso melhorar a produtividade dos sistemas para atender esse mercado em expansão, de forma a conciliar o lucro para o produtor, tornar o produto acessível à população e causar o menor impacto possível ao ambiente (NAYLOR et al., 2000). Para que isso aconteça, é imprescindível a pesquisa nas áreas de nutrição e alimentação dos peixes, pois os gastos com alimentação, em qualquer sistema intensivo, representa a maior parte do custo (EL-SAYED, 1999). Segundo Lima et al. (2011), esse custo pode variar, dependendo da intensificação do sistema, alcançando até 70% do custo total de produção, o que é decisivo na viabilidade econômica de uma piscicultura. Ainda, rações de baixa qualidade e mal formuladas afetam diretamente o crescimento dos animais, além de causar maior impacto ambiental, pois os nutrientes não aproveitados são excretados e podem causar problemas na qualidade das águas (SARDAR, 2007).

A maioria dos ingredientes, assim como as rações, é constituída de macro e micronutrientes, sendo os macronutrientes aqueles que são contidos ou exigidos em maior quantidade e, portanto, presentes em maior concentração na dieta: carboidratos, lipídios e proteínas.

Cada nutriente possui uma ou mais funções específicas nos organismos, sendo a principal função dos carboidratos o fornecimento de energia. Os carboidratos não são considerados nutrientes essenciais aos peixes, mas são uma fonte de energia de baixo custo. Os carboidratos representam cerca de 60 a 80% do total do peso da maioria dos grãos utilizados para rações de peixes e camarões, sendo utilizado de maneira direta como grãos ou indireta como seus subprodutos (TACON, 1987,1993).

São chamados de cereais os membros da família das gramíneas (Gramineae), que se constituem em alimentos utilizados tanto para o consumo humano como o animal. Exemplos típicos são o milho, arroz, sorgo, trigo, centeio, triticale, cevada, aveia e os painços. Segundo a FAO (1993), o milho é o principal ingrediente energético utilizado para alimentação animal e, juntamente com a soja, é a base das rações da maioria das espécies produzidas no mundo.

Apesar de existir uma grande quantidade de ingredientes ricos em carboidratos, que podem ser utilizados em rações de peixes, esse é um nutriente controverso, pois, segundo o NRC (2011), os peixes não apresentam exigência nutricional para carboidratos. Para Tacon (1988), a possível inexistência de exigência nutricional de carboidratos para os peixes se deve ao fato destes priorizar a síntese da glicose por meio da gliconeogênese, a partir de lipídios e proteínas. Entretanto, outros autores afirmam que, algumas espécies, quando alimentadas sem carboidratos, sofrem moderada queda no seu desempenho (WILSON, 1994; ANDERSON et al., 1984; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

Um ponto positivo da inclusão de carboidratos na dieta é o efeito poupador de proteína, comprovado para diversas espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares: salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) (BUHLER; HALVER, 1964), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (MEDLAND; BEAMISH, 1986), tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) (SHIAU; PENG, 1993), enguia-europeia (*Anguilla anguilla*) (HIDALGO et al., 1993), carpa indiana (*Labeo rohita*) (ERFANULLAH, 1995), perca-prateada (*Bidyanus bidyanus*) (STONE et al., 2003), jundiá (*Rhamdia quelen*) (MEYER; FRACALOSSO, 2004), *Cirrhinus mrigala* (SINGH et al., 2006), carpa-prateada (*Puntius gonionotus*) (MOHANTA et al., 2007), sea bream (GARCÍA-MEILÁN et al., 2014), linguado (*Solea senegalensis*) (GUERREIRO et al. 2014) e turbot (*Scophthalmus maximus*) (LIN et al., 2015).

O catabolismo de proteínas é reduzido quando há fornecimento adequado de carboidrato na dieta. Isto aumenta a retenção proteica e diminui a excreção de amônia para o ambiente aquático (COWEY; WALTON, 1989; SEENAPPA; DEVARAJ, 1995; HILLESTAD; JOHNSEN; ÅSGÅRD, 2001). O efeito poupador de proteína ou *protein-sparing* ocorre porque a glicose oriunda do carboidrato é utilizada e não aquela do catabolismo da proteína, que é um nutriente caro. O carboidrato, quando digerido e absorvido pelo intestino, transforma-se em glicose, que pode ser utilizada imediatamente para fornecer energia ou pode ser armazenada como glicogênio - principalmente no fígado e músculo - para a síntese de outros compostos, como aminoácidos não essenciais e triacilgliceróis ou, ainda, pode ser excretada, quando em excesso (LOVELL, 1989; DENG; REFSTIE; HUNG, 2001). Segundo Lovell (1989) e Wilson (1994), os peixes em geral possuem uma preferência por utilizar energia oriunda da catabolização dos aminoácidos, que são desaminados e sua parte carbonada oxidada, sendo convertida em carboidratos, lipídios ou outros compostos. Isso ocorre em maior quantidade quando há excesso de aminoácidos disponíveis na corrente sanguínea, sem a presença da glicose, sendo eles os primeiros nutrientes a serem consumidos para gerar energia (LOVELL, 1989). Entretanto, a proteína é o macronutriente mais caro numa formulação e a inclusão de carboidrato na dieta promove o *protein sparing effect*.

Segundo Walton e Cowey (1982), o sistema digestório e metabólico dos peixes possui essa preferência por utilizar a proteína e lipídio como fontes energéticas por uma questão de adaptação evolutiva, já que o ambiente aquático geralmente é escasso em carboidratos. Estudo recente realizado por Glencross et al. (2014), com juvenis de barramundi (*Lates calcarifer*), demonstrou claramente a preferência da utilização energética prioritária da proteína, seguida pelo lipídio e, por último, o carboidrato.

Do ponto de vista evolutivo, pode-se supor que peixes de hábitos alimentares específicos, como os piscívoros, teriam perdido algumas das suas capacidades metabólicas de utilizar doses significativas de glicose, dando preferência para os nutrientes encontrados em maiores quantidades na sua dieta alimentar, como as proteínas e lipídios (POLAKOF et al., 2012). Sendo assim, existem diferenças entre espécies: algumas possuem maior habilidade de aproveitar carboidratos que outras, sendo que normalmente essa habilidade está relacionada com o hábito alimentar. Por exemplo: peixes carnívoros, como salmão (*Salmo salar*) e truta arco-íris, não possuem uma digestão tão eficiente desse nutriente quanto peixes onívoros, como



o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e tilápia-do-Nilo, que não só digerem como aproveitam melhor os carboidratos, os quais podem ser incluídos em níveis maiores em suas dietas (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

Essa maior capacidade de digestão dos carboidratos pelas espécies onívoras e herbívoras condiz com sua história natural e capacidade adaptativa às fontes de nutrientes disponíveis (KROGDAHL et al., 2005). Outro aspecto importante está ligado ao tamanho do intestino das espécies. Geralmente, quanto maior a relação intestino:tamanho corporal, melhor será a digestão e absorção dos carboidratos. Desta maneira essa relação é maior em herbívoros, do que em onívoros e carnívoros, sucessivamente (KRAMER; BRYANT, 1995). Espécies onívoras também diferem quanto ao uso de carboidratos dietéticos. A tilápia-do-Nilo, onívoro típico com intestino longo apresenta maior digestibilidade do amido de diferentes fontes de carboidratos, quando comparada a um onívoro com tendência à carnivoría, como o jundiá, com intestino curto (GOMINHO-ROSA et al., 2015).

Além disso, também existe diferença quando se trata de uma espécie tropical ou de águas temperadas, sendo que as espécies tropicais são mais eficientes no uso de carboidratos, pois os ambientes tropicais geralmente possuem maior oferta de alimentos com maior quantidade de carboidrato em sua composição (WILSON, 1994).

Do ponto de vista do processamento da ração, um fator que auxilia a melhoria da digestibilidade dos alimentos e, principalmente, do carboidrato é o tratamento térmico. O calor utilizado causa uma modificação na estrutura química de alguns nutrientes, desnaturando proteínas, inativando fatores antinutricionais e gelatinizando o amido (ALONZO et al., 2000).

Segundo Cheng e Hardy (2003), na indústria de rações, a gelatinização do amido ocorre mediante o processo de extrusão, que é feita pela combinação de alta pressão, alta temperatura e umidade, resultando em mudanças físicas e químicas do amido presente na ração. Isso causa um cozimento do amido, destruindo sua estrutura granular, dissolvendo e despolimerizando suas macromoléculas (BARRON et al., 2001) e tornando-as mais fáceis de serem digeridas pelos animais (GARCÍA-ALONSO et al., 1999).

A maioria das espécies de peixes digere o amido com mais eficiência após sua extrusão e gelatinização (WILSON, 1994; KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; PANSERAT, 2009). Essa maior digestão ocorre em diversas espécies, mesmo com hábitos

alimentares diferentes como no caso dos carnívoros robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) (PERES; OLIVA-TELES, 2002), truta arco-íris (BERGOT; BREQUE, 1983; PODOSKINA et al., 1997) e onívoros, como carpa-comum (HERNÁNDEZ et al., 1994), tilápia híbrida e a herbívora carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) (TAKEUCHI et al., 1994).

As diferentes formas de carboidratos também são relevantes para o seu aproveitamento pelos peixes, que, em geral, aproveitam melhor os carboidratos complexos, como o amido, do que os açúcares simples, como a glicose (NEW, 1987). Em revisão sobre a utilização de carboidratos pelos peixes, Wilson (1994) afirma que, quando se utilizam ingredientes como o amido e a dextrina, a maioria das espécies assimilam esses produtos com maior eficiência do que quando são fornecidos açúcares mais simples.

Estudos realizados com tilápia híbrida demonstraram que, quando alimentada com carboidratos mais complexo do que a glicose e outros monossacarídeos, como é o caso do amido gelatinizado, o seu crescimento é maior (LIN et al., 1997; SHIAU; LIANG, 1995; SHIAU; CHEN, 1993). Estudo similar também realizado com a tilápia híbrida, feito por Shiau e Chuang (1995), avaliaram cinco fontes de carboidratos (glicose, maltose, lactose, sacarose e amido), a 44% de inclusão, em dietas isoproteicas e isolipídicas, sendo observado que os mono e dissacarídeos foram pior utilizados em comparação ao amido.

Provavelmente essa melhor utilização dos carboidratos complexos se deve por sua mais lenta digestão e absorção. Desta forma, a glicose é fornecida de maneira fracionada aos peixes, passível de aproveitamento mais eficiente no metabolismo.

### **Metabolismo da glicose em peixes**

Diversos estudos têm sido realizados para compreender melhor os problemas relacionados ao uso de carboidratos em peixes. Algumas espécies, após o consumo deste macronutriente, apresentam nível elevado de glicose sanguínea (hiperglicemia), o qual pode permanecer elevado durante horas e que parece estar relacionado a uma baixa tolerância à glicose (WILSON, 1994; GOUVEIA; DAVIES, 2004).

É um desafio compreender o porquê da má utilização dos carboidratos pelos peixes. Além de ocorrer uma hiperglicemia pós-prandial (pós-alimentação) persistente, que está associada a uma diminuição de crescimento, observa-se também, em alguns casos, a

presença de esteatose hepática ou comumente chamada de “fígado gordo” (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002; ENES et al., 2011).

Em ensaios de tolerância à glicose em peixes, foi observado que peixes alimentados com altos níveis de carboidratos apresentam hiperglicemia prolongada no plasma sanguíneo, característica similar ao que ocorre em mamíferos com diabetes (WILSON; POE, 1987). Alguns autores sugeriram que a reduzida utilização da glicose pelos peixes pode ser causada por uma insuficiente produção de insulina pelos mesmos, fazendo com que essa glicose não se desloque do sangue para dentro das células (WILSON; POE, 1987; HERTZ et al., 1989). A insulina é um hormônio secretado em resposta às altas concentrações de glicose no sangue e atua, principalmente, em tecidos periféricos, como o músculo esquelético, promovendo a assimilação celular de glicose e regulando a glicemia (VOET; VOET, 2006).

Hertz et al. (1989b), em pesquisas semelhantes, observaram que a concentração de insulina plasmática nos peixes foi tão alta quanto a encontrada em mamíferos. Outros autores também observaram que o aumento da ingestão de carboidratos resultou em um aumento dos níveis de insulina plasmática nos peixes (GUTIÉRREZ et al., 1991; MAZUR et al., 1992; PÁRRIZAS et al., 1994).

Em um experimento realizado por Wright et al. (1998), foram transplantados corpúsculos de ‘Brockmann’ de tilápias (estrutura correspondente ao tecido endócrino no pâncreas em peixes teleósteos) para ratos diabéticos. Neste experimento, foi observado que os ratos apresentaram normoglicemia em longo prazo, respostas glicêmicas ao jejum e quando desafiados a testes de tolerância à glicose, exibiram respostas similares a roedores saudáveis, fato que demonstra que o “pâncreas” dos peixes não seria o problema, nem sua produção de insulina. Esses fatos levantaram a hipótese de que o problema não está ligado à produção de insulina pelos peixes e sim que há ineficiência na capacidade receptora das células ao hormônio insulina, fazendo com que os mesmos apresentem problema semelhante ao de humanos com diabetes tipo 2 (produção insuficiente de insulina, e/ou resistência dos receptores periféricos à insulina).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-2) são peptídeos, que exercem seus efeitos sobre a célula através de suas ligações a receptores específicos, localizados na membrana plasmática das células (PLANAS et al., 2000). O IGF-I em mamíferos estimula a tomada de glicose e de aminoácidos, realizando a síntese de glicôgeno e proteína (ZORZANO et al., 1988).

Segundo Baños et al. (1998) e Planas et al. (2000) os receptores de IGF-I estão em predominância sobre os da insulina no músculo esquelético de peixes, sendo que isso é o contrário do que ocorre em mamíferos, o que pode ser uma explicação para a baixa captação de glicose pelo tecido muscular esquelético de peixes, pois os receptores de insulina são mais eficientes para retirada de glicose. Na visão de Baños et al. (1998), o IGF-I possui um papel importante na adaptação e metabolismo de peixes quando são submetidos a dietas ricas em carboidratos, mas a menor quantidade de receptores de insulina pode estar por trás da intolerância dos peixes a glicose.

Assim como a insulina plasmática, o número de receptores de insulina e IGF-I aumentaram no tecido esquelético muscular de trutas quando submetidas a uma dieta rica em carboidratos, o que favorece a retirada da glicose plasmática, melhorando o controle da glicemia e a metabolização da glicose pelo tecido (BAÑOS et al., 1998). Mesmo assim, diversos trabalhos citados anteriormente demonstraram que várias espécies sofrem com hiperglicemia e não metabolizam suficientemente a glicose ofertada, como no caso da truta.

Em mamíferos, a entrada de glicose nas células dos tecidos periféricos, como o tecido muscular esquelético, adiposo e cardíaco, é realizada por transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-4. No tecido muscular esquelético, o transportador GLUT-1 é insulino-independente e favorece o transporte basal da glicose. Já o GLUT-4 é insulino-dependente e quando os receptores das células são ativados pela insulina, ele se desloca da parte interna da célula para a membrana celular, transportando a glicose de fora para dentro da célula muscular, por isso a insulina causa um efeito hipoglicêmico (VOET; VOET, 2006).

Segundo Moon (2001), ainda não se decifrou se em peixes esse transporte ocorre da mesma maneira que em mamíferos. Entretanto, em um estudo feito por Wright et al. (1998), analisando diversos tecidos de tilápia e camundongo, foi observado que a expressão de GLUT-1 e GLUT-4 foi muito baixa comparada a dos camundongos, onde somente foi observada a expressão de GLUT-1 no coração e cérebro dos peixes, sendo que o GLUT-4 não foi expresso a nível de leitura em nenhum tecido. Em outro trabalho feito posteriormente por Wright Jr. et al. (2000), ele afirma que provavelmente há uma resistência periférica grave ou absoluta nos tecidos da tilápia em relação à insulina, possivelmente ocorrido pela falta ou baixa quantidade de GLUT-4 nesses tecidos, e isso seria um dos fatores de sua intolerância à glicose.

Tentando compreender melhor o metabolismo da glicose em peixes, foram realizadas pesquisas nos últimos anos, principalmente utilizando a insulina, para verificar seu efeito nas vias metabólicas e expressões gênicas de algumas espécies, aonde foram identificadas a presença dos transportadores de glicose GLUT 1 e 4, e foram verificados que em, alguns casos, os transportadores responderam ao hormônio.

Em um estudo com truta-marrom (*Salmo trutta*), Capilla et al. (2002) verificaram que quando estas foram submetidas à insulina, houve um aumento da expressão gênica dos transportadores de glicose GLUT-4 no tecido muscular esquelético vermelho, além de uma queda da hiperglicemia desses animais. O mesmo aumento nessa expressão gênica foi verificado para essa espécie *in vitro* (DÍAZ et al., 2007).

Outros testes realizados *in vitro* por Díaz et al. (2009), porém com truta arco-íris, registraram que as células musculares desta espécie apresentaram um aumento na expressão de GLUT-1 e GLUT-4, quando submetidas à insulina. Mais tarde, Polakof et al. (2010), também verificaram *in vivo* um aumento na expressão gênica de GLUT-1 e GLUT-4 em trutas arco-íris submetidas à insulina no seu tecido muscular esquelético e uma queda na glicemia desses animais.

A melhor expressão desses transportadores parece estar relacionada a um melhor controle glicêmico e transporte de glicose para dentro das células, mas ainda há poucos estudos testando a influência desses receptores na capacidade de utilização de glicose em peixes. Os transportadores de glicose (GLUTs) são relatados em diversos tecidos de peixes, inclusive o GLUT-4 que é insulino dependente e que se mostra pouco eficiente em tecidos musculares de peixes (POLAKOF et al., 2012).

Talvez, se esses transportadores fossem melhor expressos ou os receptores de insulina mais eficientes, os peixes poderiam utilizar melhor a glicose disponível após o consumo de carboidratos e, assim, este nutriente poderia ser incluído em maiores quantidades nas rações, diminuindo seu custo, tanto pela maior inclusão de carboidratos, como pela menor e melhor utilização da proteína nela contida.

### **Cloridrato de Metformina**

A metformina, ou cloridrato de metformina é o nome comercial dado ao composto dimetilbiguanida, derivado da guanidina. É um composto ativo hipoglicemiante (diminui a hiperglicemia), extraído da

erva *Galega officinalis*, utilizada desde a idade média na Europa para o tratamento da diabetes (BAILEY; DAY, 1989).

Atualmente, a metformina é a droga oral mais utilizada para o tratamento da diabetes do tipo 2, mas antes eram utilizadas outras drogas como a fenformina (também da família das biguanidas) que foi utilizada durante duas décadas nos EUA, mas acabou banida por sua associação com a acidose láctica em pacientes (MISBIN, 1977; LUFT; EGGSTEIN, 1978) e as sulfoniluréias e meglitinidas, que são drogas estimulantes de produção insulínica (RIGAS et al., 1968).

A metformina difere da fenformina em sua estrutura molecular, sendo mais polar, o que parece ajudar a amenizar os efeitos que causam a acidose láctica. Além disso, ela também demonstra não afetar substancialmente a absorção intestinal de glicose, como ocorre com as outras drogas (CZYZYK et al., 1968; GOOGARZI; BRYER-ASH, 2005).

A metformina reduz a produção hepática de glicose (inibe a gliconeogênese), aumenta a atividade do receptor de insulina de tirosina quinase e facilita a atividade do transportador de glicose nas células (GLUT4) (GOOGARZI; BRYER-ASH, 2005).

Apesar de décadas de utilização clínica, os mecanismos moleculares pelos quais a metformina consegue produzir esses efeitos ainda não foram completamente esclarecidos (GOOGARZI; BRYER-ASH, 2005). Estudos recentes demonstram que os efeitos da metformina estão relacionados à estimulação da enzima proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), tanto em animais como em humanos (ZHOU et al., 2001; FRYER et al., 2002; MUSI et al., 2002). A AMPK é uma serina/treonina quinase que atua como reguladora da homeostase energética celular e sistêmica e coordena vias metabólicas no sentido de equilibrar o suprimento de nutrientes com a demanda energética, atuando na estimulação das vias metabólicas que produzem ATP, como a oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e glicólise (TOWLER; HARDIE, 2007; OAKHILL et al., 2009).

Em resumo, a AMPK atua no fígado, diminuindo a lipogênese e estimulando oxidação de ácidos graxos, além de inibir a gliconeogênese (HARDIE; HAWLEY; SCOTT, 2006; MISRA; CHAKRABATI, 2007) e no músculo esquelético atua, principalmente, estimulando a captação de glicose por dois mecanismos: aumentando a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana celular e aumentando a sensibilidade dos receptores à insulina, esse último também atuando no fígado (SANTOMAURO JR et al., 2008).

Há estudos que demonstram que a AMPK também atua em funções hipotalâmicas, que modulam eventos relacionados com a fome e a saciedade, mas são necessários mais estudos sobre esse assunto (SANTOMAURO JR et al., 2008; RONNETT et al., 2009).

Pouquíssimos estudos foram realizados utilizando a metformina em peixes, sendo que alguns obtiveram resultados em nível de queda glicêmica e metabolismo dos animais.

Em estudo feito com carpa capim, onde foi aplicada metformina intraperitonealmente nos peixes, observou-se que houve uma queda na glicemia quando submetidos a um teste de tolerância à glicose (2 g/kg de peso vivo). Além disso, a droga inibiu a gliconeogênese, houve uma maior incorporação de proteínas no músculo branco, quando comparada ao tratamento controle e, como esperado, não ocorreu aumento na produção de insulina nesses animais, o que demonstra que esse efeito ocorreu pela droga e não pela insulina (HERTZ et al., 1989a).

Quando submetido a uma injeção de metformina, *zebrafish* (*Danio rerio*) apresentou diminuição da glicemia e uma inibição da via gliconeogênica, apresentando respostas bastante semelhantes às aquelas apresentadas por mamíferos (ELO et al., 2007).

Em trutas arco-íris, alimentadas com uma dieta rica em carboidratos (30% de amido) e com uma adição de metformina na dieta (0,25% da dieta) por três dias, foi observada uma redução significativa da glicemia pós-prandial desses animais, mas não foram verificadas maiores expressões gênicas de GLUT-4 ou enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (PANSERAT et al., 2009).

Mini-bombas osmóticas foram implantadas em truta-arco-íris contendo metformina (20 mg/kg<sup>-1</sup>/dia) e, após 11 dias, os peixes foram submetidos a um teste de tolerância à glicose, aplicando-se uma injeção intraperitoneal de glicose (250 mg/kg de peso vivo). Diferente do resultado obtido anteriormente, os peixes não apresentaram uma diminuição glicêmica (POLAKOF; SKIBA-CASSY; PANSERAT, 2009). Posteriormente, Polakof et al. (2011) realizaram um teste similar, mas desta vez submeteram os peixes a uma dieta rica em carboidratos (30% dextrina) por 11 dias, aonde foi observada queda na glicemia, que pareceu estar relacionada a uma maior expressão de GLUT-4 pelos peixes.

Em testes realizados *in vitro* com células musculares de truta-marrom, observou-se que a metformina estimulou significativamente a absorção de glicose pelas células e causou um aumento na atividade de AMPK, além de aumentar a quantidade de GLUT-4 na membrana das células (MAGNONI et al., 2012).

Ainda não existem estudos sobre o efeito da metformina em longo prazo no desempenho de peixes. Talvez o aproveitamento da glicose melhorasse se a metformina fosse administrada em longo prazo, gerando melhor eficiência energética e proteica pelo efeito poupador da utilização da proteína como fonte energética. Isto resultaria em maior deposição proteica no tecido muscular dos peixes, além de uma redução no acúmulo de gordura corporal, característica esta indesejável ao mercado consumidor.



## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Avaliar a suplementação de metformina em dietas com suprimento adequado e excessivo de carboidrato no desempenho e composição corporal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

### **Específicos**

- Verificar se os animais absorveram a metformina fornecida na dieta.
- Avaliar os índices zootécnicos (ganho em peso, conversão alimentar e retenção proteica) da tilápia, após ensaio alimentar.
- Determinar a composição corporal dos peixes.



## CAPÍTULO I

### **Metformina no desempenho e composição corporal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), quando alimentada com duas concentrações de carboidratos**

Adriano Machado da Silva<sup>1</sup>, Bruno Pierri<sup>1</sup>, Gustavo Amadeu Micke<sup>2</sup>,  
Débora Machado Fracalossi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

\*Autor correspondente: Débora Machado Fracalossi, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil. Telefone: +55 48 3389-5216. Endereço de e-mail: \*debora.fracalossi@ufsc.br

O artigo a seguir foi redigido conforme as normas da revista *Aquaculture Nutrition*, que encontram-se no Anexo.

## RESUMO

Apesar do carboidrato ser o macronutriente que fornece a energia mais barata na composição de uma dieta, peixes possuem capacidade limitada para utilização de um de seus importantes constituintes: a glicose. A metformina (MET) é uma droga utilizada para o tratamento de diabetes, cuja função é reduzir os níveis de glicose no sangue, melhorando, assim, sua utilização pelos mamíferos. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da tilápia-do-Nilo com e sem a suplementação de 0,2% de MET, em dietas com 24% (24C) e 48% de carboidrato (48C), representando concentrações adequada e excessiva, respectivamente, deste macronutriente. Quatro grupos de 20 juvenis de tilápia-do-Nilo ( $22,00 \pm 1,45$  g) foram alimentados com cada uma das dietas experimentais duas vezes ao dia, por 80 dias. Houve interação entre a concentração de carboidrato e a presença de MET para a matéria seca e extrato etéreo corporal, as quais, na presença da droga, aumentaram nos peixes que receberam a dieta 48C, mas diminuíram naqueles que receberam a dieta 24C. Não houve efeito da suplementação de MET no desempenho dos peixes. Entretanto, o aumento na concentração de carboidrato na dieta propiciou o acúmulo de gordura corporal, aumentando significativamente os índices hepato e viscerossomáticos, enquanto o desempenho dos peixes diminuiu.

Palavras chaves: hiperglicemia, nutrição, peixes, metformina, glicose.

## INTRODUÇÃO

Normalmente, peixes apresentam hiperglicemia sanguínea prolongada após o consumo de dietas ricas em carboidratos, o que está relacionado a uma baixa tolerância à glicose, similar ao que ocorre em mamíferos diabéticos (Wilson 1994; Gouveia & Davies 2004). Muitos estudos foram realizados para compreender melhor essa intolerância à glicose, que parece ser espécie-específica, mas também é influenciada pelo hábito alimentar, ambiente (tropical ou temperado) e diferentes formas de carboidratos (Polakof et al. 2012).

A baixa tolerância à glicose originou a hipótese inicial de que os peixes teriam uma baixa produção endógena de insulina e isso prejudicaria a absorção da glicose pelos tecidos, causando, assim a, hiperglicemia (Palmer & Ryman, 1972; Furuichi & Yone, 1980). Entretanto, esta teoria foi desafiada, quando se constatou que a produção de insulina endógena dos peixes não era inferior a de mamíferos, mas, em alguns casos, até superior (Thorpe & Ince 1976; Emdin 1982; Gutierrez et al. 1986). Wright et al. (1998) transplantaram corpúsculos de 'Brockmann' (estrutura correspondente ao tecido endócrino do pâncreas em peixes teleósteos) de tilápias para camundongos diabéticos e observaram que estes demonstraram respostas similares às de roedores saudáveis. Estes autores sugeriram que o problema não seria a baixa produção de insulina nos peixes, mas sim a ineficiência dos seus receptores e transportadores de glicose (GLUTs), já que a expressão de GLUT-1 e GLUT-4 na tilápia foi muito baixa se comparada a dos camundongos. Estudos mais recentes sugerem que, provavelmente, há uma resistência grave ou absoluta nos tecidos periféricos da tilápia em relação à insulina, possivelmente pela falta ou baixa quantidade de GLUT-4 nesses tecidos, e que isso explicaria, parcialmente, sua intolerância à glicose (Wright Jr. et al. 2000). Outro fator que parece estar ligado à baixa utilização de glicose pelos peixes é o fato destes possuírem preferência por utilizar a energia oriunda da catabolização dos aminoácidos (gliconeogênese) como fonte principal de energia em seu metabolismo (Lovell, 1989; Wilson, 1994).

Atualmente, a droga oral mais utilizada para tratamento de diabetes do tipo 2 é a metformina (MET), composto derivado da guanidina (Bailey & Day 1989). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas parece estimular a ativação da enzima proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), a qual regula diversas vias metabólicas e controla a homeostase energética nas

células (Towler & Hardie, 2007; Oakhill et al. 2009). Os efeitos principais da MET são: 1) redução da produção hepática de glicose (inibição da gliconeogênese), 2) aumento da capacidade receptora das células à insulina e 3) facilitação da atividade do transportador de glicose nas células (GLUT-4) (Googarzi & Bryer-Ash, 2005), os quais poderiam auxiliar no melhor aproveitamento da glicose pelos peixes.

A MET foi testada em poucas espécies de peixes, demonstrando resultados conflitantes, os quais são sumarizados a seguir. Entretanto, ainda não foi realizado nenhum estudo com tilápia-do-Nilo como espécie alvo, testando o efeito da MET em seu metabolismo ou desempenho. A MET foi aplicada intraperitonealmente em carpa comum (*Cyprinus carpio*) e observou-se uma queda na glicemia, quando os peixes foram submetidos a um teste de tolerância a glicose (2 g kg<sup>-1</sup> peso vivo). Além disso, a MET inibiu a gliconeogênese e ocorreu maior incorporação de proteína no músculo branco dos peixes (Hertz et al. 1989). Em zebrafish (*Danio rerio*), a injeção intraperitoneal de MET também causou queda na glicemia e inibição da via gliconeogênica (Elo et al. 2007). Similarmente aos resultados anteriores, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dieta contendo 30% de amido e suplementada com 0,25% de MET por três dias, apresentaram redução da glicemia pós-prandial, mas não foi verificado aumento na expressão gênica de GLUT-4 (receptor de glicose sensível à insulina) e de enzimas ligadas à glicólise (Panserat et al. 2009). Em outro estudo do mesmo grupo, utilizou-se uma mini-bomba osmótica implantada nas trutas, a qual fornecia 20 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de MET. Após 11 dias, as trutas foram submetidas a um teste de tolerância à glicose (250 mg.kg<sup>-1</sup> de peso vivo) e não houve diminuição na glicemia, diferentemente do resultado anterior obtido pelo grupo, demonstrando que a MET não causou o efeito esperado na espécie quando essa foi submetida de forma aguda à glicose (Polakof et al. 2009b). Em estudo posterior, realizado também com a implantação de mini-bomba osmótica em trutas recebendo a MET por feito por Polakof et al. (2011), dessa vez, apresentou queda na glicemia dos peixes quando comparadas ao grupo controle, onde ambos receberam somente uma dieta com 30% de dextrina. Essa queda na glicemia das trutas, possivelmente ocorreu pelo aumento da expressão de GLUT-4 e da enzima glicolítica, hexoquinase, verificados pelos autores nos peixes que receberam a MET. Por fim, em teste realizado *in vitro* com truta-marrom (*Salmo trutta*), observou-se que a MET estimulou a absorção de glicose pelas células e causou um aumento da atividade de AMPK e de GLUT-4 (Magnoni et al. 2012).

A maioria dos testes realizados até hoje com a administração de MET em peixes foram realizados em testes de curta duração e com foco nas alterações metabólicas e expressões gênicas das espécies. Até o presente momento, nenhum teste foi realizado para verificar o efeito da MET no desempenho zootécnico dos peixes quando a droga é fornecida por um período prolongado de tempo. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos da MET, quando fornecida na dieta por um período de 80 dias, no desempenho da tilápia-do-Nilo, espécie continental de importância na piscicultura mundial, que, apesar de seu hábito alimentar onívoro, também apresenta limitação para a metabolização da glicose em seus tecidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Dietas experimentais e manejo alimentar

Foram formuladas quatro dietas com ingredientes semipurificados, todas isolipídicas e isonitrogenadas (**Tabela 1**), para atender às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-Nilo (NRC 2011). Estas dietas possuíam concentrações variáveis de carboidrato e energia, a saber: 1) 24% de carboidrato na forma de amido (24C); 2) 24% de carboidrato na forma de amido, suplementada com 0,2% de MET (24C+MET); 3) 48% de carboidrato na forma de amido (48C) e 4) 48% de carboidrato na forma de amido, suplementada com 0,2% de MET (48C+MET). Portanto, o desenho experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial, com dois níveis de carboidrato, com e sem suplementação de MET.

A dose de MET escolhida para suplementação foi 0,2% da dieta, que forneceu  $50 \text{ mg} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  peixe, seguindo como referência Panserat et al. (2009). Esta dosagem é normalmente utilizada em estudos com mamíferos (Kirpichnikov et al. 2002) e está dentro do intervalo de dosagem já testado em peixes (Hertz et al. 1989; Elo et al. 2007; Panserat et al. 2009; Polakof et al. 2009a; Polakof et al. 2011).

Os ingredientes, assim como a MET, foram pesados, corrigidos para matéria seca, homogeneizados e levados à umidade de 23% para a extrusão (2 mm) a 80°C. Posteriormente, as dietas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 55°C, durante 6 h (**Figura. 1**).

Diariamente, os peixes foram alimentados na razão de 2,5% do peso vivo, duas vezes ao dia (9:00 am e 5:00 pm) por um período de 80 dias.

**Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais

Ingredientes, g kg <sup>-1</sup>	Dietas			
	24C	24C+MET	48C	48C+MET
Caseína <sup>1</sup>	300	300	300	300
Gelatina <sup>1</sup>	80	80	80	80
Amido de milho <sup>2</sup>	245	245	485	485
Celulose <sup>1</sup>	287	285	47	45
Óleo de peixe	7	7	7	7
Óleo de canola	30	30	30	30
Premix macromineral <sup>3</sup>	20	20	20	20
Premix vit. e micromineral <sup>4</sup>	10	10	10	10
Fosfato bicálcico	20	20	20	20
Butil-hidroxi-tolueno	0,2	0,2	0,2	0,2
Metformina <sup>5</sup>	-	2,0	-	2,0
<b>Composição, g kg<sup>-1</sup>, expresso na matéria seca</b>				
Matéria seca	929	909	916	905
Energia bruta <sup>6</sup> , kcal/kg <sup>-1</sup>	3279	3302	4438	4485
Proteína bruta	340	340	340	346
Extrato etéreo	39	40	41	40
Fibra detergente neutro, (FDN)	298	293	34	36
Extrativos não nitrogenados	280	284	542	536
Matéria mineral	43	43	43	42

<sup>1</sup> Rhoster LTDA (São Paulo, SP, Brasil). <sup>2</sup> Adram S.A. indústria e comércio (Maú da Serra, PR, Brasil). <sup>3</sup> Composição kg<sup>-1</sup>: fosfato bicálcico 130 g, cloreto de potássio 120 g, cloreto de sódio 130 g, sulfato de magnésio 620 g. <sup>4</sup> Composição kg<sup>-1</sup> de produto (Raguife Vaccinar, Belo Horizonte, MG, Brasil): ácido fólico 1.200 mg, ácido pantotênico 10.000 mg, BHT 5.000 mg, biotina 200 mg, cobalto 80 mg, cobre 3.500 mg, colina 100.000 mg, ferro 20.000 mg, iodo 160 mg, manganês 10.000 mg, niacina 20.000 mg, selênio 100 mg, vitamina (vit.) A 2.400.000 UI, vit. B<sub>1</sub> 4.000 mg, vit. B<sub>12</sub> 8.000 mg, vit. B<sub>2</sub> 4.500 mg, vit. B<sub>6</sub> 3.500 mg, vit. C 60.000 mg, vit. D<sub>3</sub> 600.000 UI, vit. E 30.000 UI, vit. K 3.000 mg, zinco 24.000 mg, inositol 25.000 mg. <sup>5</sup> Pharmanostra<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). <sup>6</sup> Energia bruta obtida mediante combustão em bomba calorimétrica.



## **Peixes e condições experimentais**

Foram utilizados machos de tilápia-do-Nilo da linhagem GIFT, adquiridos na piscicultura ACQUA SUL (Ilhota, SC, Brasil). Grupos de 20 peixes, com peso médio de  $22,00 \pm 1,45$  g (média  $\pm$  desvio padrão) foram estocados em quatro unidades experimentais (tanque rede circular de 80 L), contidas em um tanque de 1.000 L, o que constituía um bloco (**Figura. 2**). Os peixes de cada unidade experimental foram alimentados com as dietas experimentais, em quadruplicata (blocos). Os peixes foram aclimatados às condições experimentais por 10 dias, quando foram alimentados com ração comercial (36% de proteína bruta).

Os tanques de 1.000 L estavam conectados a um sistema de recirculação fechada de água doce (100% de renovação  $h^{-1}$ ), com controle de temperatura, aeração, filtragem mecânica e biológica. A temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram monitorados diariamente, resultando nas respectivas médias e desvios-padrão:  $28,02 \pm 0,20^{\circ}C$ ;  $5,92 \pm 0,30$  mg  $L^{-1}$  e pH  $7,13 \pm 0,15$ . A amônia total, nitrito e nitrato foram monitorados uma vez por semana, não excedendo  $0,42$  mg  $L^{-1}$ .

A cada 15 dias, foram realizadas biometrias para o registro do peso e ajuste da quantidade de ração ofertada. Antes das biometrias, os animais foram mantidos em jejum por 24 h. Esses dados foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices zootécnicos:

Ganho em peso (GP= peso final – peso inicial).

Ganho em peso diário (GPD= GP/tempo).

Taxa de crescimento específico (TCE=  $[(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}))/\text{tempo}] \times 100$ )

Conversão alimentar (CA= ingestão/GP)

Eficiência alimentar (EA= (GP/ingestão) x 100),

Consumo alimentar em peso vivo ao dia (IA=  $(\text{ingestão}/(\text{peso inicial} + \text{peso final})/2)/\text{tempo}) \times 100$ )

Consumo (C= ingestão/peixe)

Taxa de retenção proteica (TRP=  $[(\text{peso final} \times \text{proteína corporal final}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína corporal inicial})/\text{ingestão de proteína}] \times 100$ ).

## **Coletas de amostras e análises**

No início do experimento, foram coletados três grupos de cinco peixes para a análise de composição corporal inicial e, ao final, cinco peixes de cada unidade experimental para análise de composição

corporal final, índices hepato e viscerossomáticos. As amostras de peixe para composição corporal foram moídas, homogeneizadas e conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises de composição centesimal, as quais incluíram o teor de umidade (secagem até peso constante em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ ), extrato etéreo (EE) (método de Soxhlet), proteína bruta (PB) (método de Kjeldahl), fibra detergente neutro (FDN) (Van Soest), matéria mineral (MM) (incineração à  $550^{\circ}\text{C}$ ), extrativos não nitrogenados ( $\text{ENN} = (100) - (\text{PB} + \text{EE} + \text{FDN} + \text{MM})$ ). Estas análises seguiram metodologia padrão da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999).

### **Análise de metformina no sangue**

Para identificação e quantificação da metformina no sangue dos animais, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrofotometria de massas, seguindo metodologia modificada de Mistri et al. (2007). Foi coletado 1 mL de sangue da veia caudal de três peixes por unidade experimental, 3h pós-prandial, com seringa heparinizada. As amostras, que totalizaram 3 mL de sangue cada, foram homogeneizadas em tubos eppendorf, conservadas em gelo e centrifugadas a  $1503 \times g$  por 5 min para separação do plasma, o qual foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise.

### **Análise estatística**

O experimento foi delineado em arranjo fatorial  $2 \times 2$ , em blocos casualizados. Os dados de desempenho, composição corporal e índices hepato e viscerossomáticos foram submetidos aos testes de homoscedasticidade e normalidade, antes da análise de variância bicaudal (*two-way* ANOVA). O teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias, quando necessário. As análises estatísticas foram executadas utilizando o aplicativo STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc., 2004) e o nível de significância adotado foi 5%. Todos os dados apresentados em porcentagem foram anteriormente transformados (arcoseno) para as análises estatísticas.

## **RESULTADOS**

Não foi detectada a presença da MET nos peixes alimentados com as dietas 24C e 48C, mas naqueles alimentados com as dietas

24C+MET e 48C+MET foram encontrados  $1,78 \pm 1,37$  e  $1,98 \pm 0,93$   $\mu\text{g}$  de MET  $\text{mL}^{-1}$  de plasma, respectivamente.

A adição de MET não afetou significativamente ( $P < 0,05$ ) nenhuma das variáveis medidas. Entretanto, o aumento de carboidrato afetou significativamente ( $P < 0,05$ ) de maneira negativa o peso final, ganho em peso diário, taxa de crescimento específico, consumo ( $\text{g peixe}^{-1}$ ) e taxa de retenção proteica dos peixes e propiciou os maiores índices hepato e viscerossomáticos (**Tabela 2**). Houve interação entre a concentração de carboidrato e a suplementação de MET na dieta de tal forma que a suplementação com MET diminuiu o consumo alimentar nos peixes alimentados com a maior concentração de carboidrato, mas não o alterou naqueles alimentados com uma concentração adequada. Também houve interação significativa para os índices hepato e viscerossomáticos. A presença de MET propiciou uma diminuição no índice hepatossomático dos peixes alimentados com a concentração adequada de carboidrato, mas o aumentou naqueles alimentados com a concentração elevada. Já o aumento no índice viscerossomático foi maior na presença de MET em ambos os níveis de carboidrato.

A composição corporal final dos peixes foi afetada pelo aumento de carboidrato na dieta, havendo aumento significativo na matéria seca e no extrato etéreo. Houve interação entre a concentração de carboidrato e a presença de MET para a matéria seca e extrato etéreo corporal, as quais, na presença da droga, aumentaram nos peixes que receberam a dieta 48C, mas diminuíram nos que receberam a dieta 24C. As demais frações da composição corporal não foram afetadas pelo aumento de carboidrato ou pela presença de MET nas dietas (**Tabela 3**).

**Tabela 2.** Efeito das diferentes concentrações de carboidrato e da presença e ausência de metformina na dieta sobre o desempenho e índices hepato e vicerossomáticos de juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Variáveis	Dieta								Fonte de variação		
	Sem Metformina				Com Metformina				CHO	MET	Interação
	24% CHO	48% CHO	24% CHO	48% CHO	24% CHO	48% CHO	24% CHO	48% CHO			
Peso final <sup>1</sup> , g	127,53 ± 4,11 <sup>Aa</sup>	119,52 ± 1,49 <sup>Ba</sup>	129,05 ± 1,03 <sup>Aa</sup>	117,62 ± 1,13 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Ganho em peso diário, g	1,34 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	1,23 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	1,35 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Taxa de crescimento específico, % dia <sup>-1</sup>	2,22 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	2,14 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	2,24 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	2,12 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Conversão alimentar	1,33 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	1,36 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	1,31 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	1,34 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	ns <sup>2</sup>	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Eficiência alimentar, %	75,29 ± 1,98 <sup>Aa</sup>	73,52 ± 1,19 <sup>Aa</sup>	76,57 ± 1,04 <sup>Aa</sup>	74,44 ± 0,46 <sup>Aa</sup>	ns <sup>2</sup>	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Consumo, % peso vivo dia <sup>-1</sup>	2,37 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	2,30 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	2,33 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	2,23 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	ns <sup>2</sup>	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Consumo, g peixe <sup>-1</sup>	139,96 ± 1,72 <sup>Aa</sup>	132,70 ± 0,88 <sup>Ba</sup>	139,82 ± 0,59 <sup>Aa</sup>	128,42 ± 1,27 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				p < 0,05	
Taxa de retenção proteica, %	37,08 ± 1,10 <sup>Aa</sup>	35,06 ± 0,32 <sup>Ba</sup>	37,00 ± 0,20 <sup>Aa</sup>	35,33 ± 0,27 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				ns <sup>2</sup>	
Índice hepatossomático	1,75 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	1,95 ± 0,09 <sup>Ba</sup>	1,58 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	2,10 ± 0,11 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				p < 0,05	
Índice viscerossomático	10,38 ± 0,27 <sup>Aa</sup>	11,87 ± 0,5 <sup>Ba</sup>	11,05 ± 0,42 <sup>Aa</sup>	12,87 ± 0,25 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>2</sup>				p < 0,05	

<sup>1</sup> Peso inicial médio= 22,00 ± 1,45 g.

<sup>2</sup> Não significativo.

<sup>A,B</sup> Letras diferentes na mesma dosagem de metformina representam diferença significativa entre as concentrações de carboidrato. <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma concentração de carboidrato representam diferença significativa entre as dosagens de metformina.

**Tabela 3.** Composição corporal final de juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentados com diferentes concentrações de carboidrato, na presença e ausência de metformina na dieta por 80 dias (expressa em matéria úmida).

Composição corporal final, %	Diets						Fonte de variação			
	Sem Metformina		Com Metformina		CHO	MET	Interação	CHO	MET	Interação
	24% CHO	48% CHO	24% CHO	48% CHO						
Matéria seca	26,23 ± 0,65 <sup>Aa</sup>	27,58 ± 0,70 <sup>Ba</sup>	25,66 ± 0,29 <sup>Aa</sup>	29,42 ± 0,38 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>1</sup>	p < 0,05	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	p < 0,05
Proteína	16,30 ± 0,21 <sup>Aa</sup>	15,83 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	16,05 ± 0,20 <sup>Aa</sup>	15,98 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>
Extrato etéreo	5,82 ± 0,43 <sup>Aa</sup>	7,82 ± 0,53 <sup>Ba</sup>	5,36 ± 0,29 <sup>Aa</sup>	9,58 ± 0,39 <sup>Ba</sup>	p < 0,05	ns <sup>1</sup>	p < 0,05	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	p < 0,05
Cinzas	4,87 ± 0,57 <sup>Aa</sup>	4,75 ± 0,54 <sup>Aa</sup>	4,38 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	4,70 ± 0,60 <sup>Aa</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>	ns <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Não significativo.

<sup>A,B</sup> Letras diferentes na mesma dosagem de metformina representam diferença significativa entre as concentrações de carboidrato.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma concentração de carboidrato representam diferença significativa entre as dosagens de metformina.

## DISCUSSÃO

Somente os peixes que receberam MET na dieta apresentaram a droga no sangue, demonstrando que não houve contaminação entre as dietas experimentais e que os peixes conseguiram incorporar a droga via ração.

Os peixes que receberam as dietas contendo 48% de carboidrato apresentaram desempenho inferior para a maioria dos parâmetros zootécnicos medidos, quando comparados àqueles que receberam as dietas com 24% de carboidrato. Esse menor desempenho está relacionado ao excesso de carboidrato na dieta, que pode causar sobrecarga metabólica ao organismo (Hemre et al. 2002). Foi constatado para a tilápia-do-Nilo que uma elevada relação carboidrato:proteína na dieta diminuiu significativamente o crescimento dos peixes e piorou a conversão alimentar (Xiong et al. 2014). Dietas com excesso de carboidratos também causaram redução no crescimento de outras espécies continentais como carpa indiana (*Labeo rohita*) (Erfanullah & Jafri 1993), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Tekinay and Davies 2001; Gumus and Ikiz 2009) e carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (Tian et al. 2012).

Normalmente, o excesso de energia na dieta reduz o consumo dos animais, já que esses se alimentam para saciar sua exigência energética (Cowey & Cho 1993). Isto foi observado no presente estudo, onde o consumo foi significativamente menor nos peixes alimentados com as dietas contendo 48% de carboidrato. O menor consumo também refletiu no menor ganho em peso para estes peixes.

A taxa de retenção proteica dos peixes alimentados com a dieta 24C foi significativamente maior e sofreu influência somente da quantidade de carboidratos na dieta e não da suplementação com MET. Isto sugere que a dieta com 24% de carboidrato atende à exigência energética da espécie.

O maior acúmulo de gordura corporal observado nos peixes alimentados com 48% de carboidrato já era esperado, já que estas dietas contém mais energia. A ingestão desproporcionalmente alta de energia leva a um maior acúmulo de gordura corporal, produzindo peixes gordurosos, o que é uma característica indesejável ao pescado (NRC (2011). Diversos estudos demonstram que o excesso de amido na dieta está relacionado a um aumento do nível de ácidos graxos livres e triacilgliceróis plasmáticos, o que aumenta a lipogênese e incorporação final desses metabólitos no tecido adiposo, aumentando assim a

quantidade de lipídeos corporais (Munõz-Ramírez 2005; Corrêa et al. 2007; Gominho 2012) e a glicogênese no fígado, com maior acúmulo de glicogênio (Corrêa et al. 2007). Corroborando com esse aspecto, em um trabalho realizado com juvenis de tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*), observou-se que o aumento nas concentrações de amido na dieta causou um aumento no conteúdo lipídico corporal final desses animais (Wang et al. 2005). Houve também diferença significativa na quantidade de matéria seca corporal dos peixes que receberam a dieta com 48% de carboidrato. Esse resultado está relacionado à maior gordura corporal dos peixes, que reduz a quantidade de água, aumentando a fração matéria seca (Reinitz et al. 1983).

Os índices hepato e viscerossomáticos foram significativamente afetados pela concentração de carboidrato na dieta, além de refletirem uma interação entre a presença de MET e a concentração de carboidrato. Estes índices são utilizados para estimar o estoque energético dos peixes, pois energia é armazenada no fígado na forma de glicogênio e lipídios e, nas vísceras, como lipídios (Bidinotto et al. 1997; Chellappa et al. 1995; Nematipour et al. 1992). Portanto, os maiores índices hepato e viscerossomático nos peixes alimentados com as dietas 48C provavelmente está relacionado à maior quantidade de carboidrato na dieta, que causou maior acúmulo de glicogênio e gordura visceral, respectivamente, conforme também relatado para truta arco-íris (Kim & Kaushik 1992) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (Gominho 2012), além de aumento nos ácidos graxos livres e triacilgliceróis, que se armazenam no fígado na forma de lipídios (Gominho 2012).

Foram observadas interações significativas entre as concentrações de carboidrato e a presença de MET da dieta na gordura e matéria seca corporal dos peixes e em seus índices hepato e viscerossomáticos, assim como no consumo, de tal forma que a presença de MET na dieta com 48% de carboidrato promoveu o acúmulo de gordura corporal. Entretanto, o maior acúmulo de gordura corporal nos peixes que receberam a dieta 48% de carboidrato + MET foi inesperado, já que um dos efeitos esperados desta droga é a inibição da lipogênese e o aumento da lipólise (Hardie et al. 2006; Misra & Chakrabarti 2007). Entretanto, o maior acúmulo de gordura corporal aqui observado está de acordo com o encontrado em truta arco-íris por Polakof et al. (2011) e Panserat et al. (2009), onde a MET inesperadamente aumentou a expressão gênica de enzimas ligadas à lipogênese nos peixes alimentados com 30% de carboidratos na dieta. Polakof et al. (2011) acreditam que o mecanismo de ação da MET em peixes é diferente daquele relatado em mamíferos, onde não se observa maior expressão gênica de enzimas lipogênicas

(Ranganathan et al. 2006). Polakof et al. (2011) e Panserat et al. (2009) observaram, também, maior lipogênese em trutas arco-íris submetidas à insulina. Isso poderia explicar a maior lipogênese observada nos peixes com a adição de MET na dieta, pois como esta droga sensibiliza os tecidos musculares e adiposos (possuem transportadores GLUT-4) para a insulina, o efeito lipogênico da insulina pode ter potencializado o maior acúmulo de gordura. Outro fator que pode ser levado em consideração é uma maior metabolização da glicose pelos peixes, fazendo com que esses não excretassem parte da glicose fornecida, transformando esse excesso em gordura. Já no tratamento 48C, parte dessa glicose pode ter sido excretada, conforme relatado em trutas alimentadas com altos níveis de carboidratos digestíveis na dieta, onde a excreção da glicose urinária atingiu cerca de 30% da sua ingestão (Bureau, 1998).

A diminuição da gordura corporal no tratamento 24C+MET, possivelmente se deu pelo efeito lipolítico esperado da droga (Hardie et al. 2006; Misra & Chakrabarti 2007), quando os peixes receberam um nível adequado de carboidratos, o que não ocorreu quando houve excesso de carboidratos, conforme citado anteriormente. Similarmente, a dieta 24C+MET propiciou um menor índice hepatossomático, que pode estar relacionado a uma das aplicações da droga para mamíferos, que é no tratamento da esteatose hepática ou “fígado gordo” (Raso et al. 2009; Marchesini et al. 2001).

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas ao primeiro e último autores, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- Bailey, C.J. & Day, C., 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*, 12(8), pp.553– 564.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G.S. & Gouza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico do CEPTA*, 10, pp.53–60. Available at: <http://orton.catie.ac.cr/cgi->



bin/wxis.exe/?IsisScript=ASFA.xis&method=post&formato=2  
&cantidad=1&expresion=mfn=000931.

Bureau, D.P., J.B. Kirkland and C.Y. Cho. 1998. The partitioning of energy from digestible carbohydrate by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). pp. 163-166. In: McCracken, K.J., E.F. Unsworth and A.R.G. Wylie (editors). *Energy Metabolism of Farm Animals*, CAB International Press, Wallingford, UK.

Chellappa, S., Huntingford, F. A., Strang, R. H. C. and Thomson, R. Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47: 775-787. doi: 10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x

Colin B. Cowey & Cho, C.Y., 1993. Nutritional requirements of fish. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 52(3), pp.417-426.

Corrêa, C.F. et al., 2007. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 147(4), pp.857-862.

Elo, B. et al., 2007. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(3-4), pp.433-440.

Emdin, S.O., 1982. Effects of hagfish insulin in the atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. The in vivo metabolism of [<sup>14</sup>C]glucose and [<sup>14</sup>C]leucine and studies on starvation and glucose-loading. *General and comparative endocrinology*, 47(4), pp.414-425.

Furuichi, M. and Yone, Y., 1980. Effect of dietary dextrin levels on the growth and feed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle and the absorption of dietary protein and dextrin in fishes. *Bull. Jpn. Sot. Fish.*, 46: 225-229.

Gominho, M. do C.R., 2012. Carboidratos em dietas para jundiá, *Rhamdia quelen*: Desempenho, digestibilidade e metabolismo. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Tese (Doutorado em Aquicultura) - 112p.

Googarzi, M.O. & Bryer-Ash, M., 2005. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes, obesity & metabolism*, 7, pp.654–665.

Gouveia, A. & Davies, S.J., 2004. Modulation of the Post-Prandial Plasma Glucose Profile in Juvenile European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* Fed Diets Varying in Starch Complexity. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 35(3), pp.392–400.

Gutierrez, J. et al., 1986. Plasma glucagon levels in different species of fish. *General and comparative endocrinology*, 63(3), pp.328–333.

Hardie, D.G., Hawley, S. a & Scott, J.W., 2006. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology*, 574(Pt 1), pp.7–15.

Hertz, Y. et al., 1989. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 80(1-2), pp.175–187.

Kim, J.D. & Kaushik, S.J., 1992. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106(2), pp.161–169.

Kirpichnikov, D., Mcfarlane, S.I. & Sowers, J.R., 2002. Metformin: An Update. *Ann Intern Med* 137: 25-33p.

Lovell, R. T. 1989. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 260 p.

Magnoni, L.J. et al., 2012. AMP-Activated protein kinase plays an important evolutionary conserved role in the regulation of glucose metabolism in fish skeletal muscle cells. *PLoS ONE*, 7(2).

Marchesini, G. et al., 2001. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*, 358(9285), pp.893–894.

Misra, P. & Chakrabarti, R., 2007. The role of AMP kinase in diabetes. *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), pp.389–398.

- Mistri, H.N., Jangid, A.G. & Shrivastav, P.S., 2007. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(1), pp.97–106.
- Muñoz-Ramírez, A. P., 2005. Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, UNESP, Tese (Doutorado em Aquicultura) –138p.
- Navarro I, Capilla E, Castillo A, Albalat A, Díaz M, Gallardo MA, Blasco J, Planas JV, Gutiérrez J, Reinecke M, Zaccone G, Kapoor BG., 2006. Insulin metabolic effects in fish tissues. In: *Fish Endocrinology*. Enfield, NH: Science Publishers, p. 15–48.
- Nematipour, G.R., Brown, M.L. & Gatlin, D.M.I., 1992. Effects of dietary energy: protein ratio on growth characteristics and body composition of hybrid. , 107, pp.359–368.
- NRC (National Research Council), 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academic Press., 360p.
- Oakhill, J.S., Scott, J.W. & Kemp, B.E., 2009. Structure and function of AMP-activated protein kinase. *Acta Physiologica*, 196(1), pp.3–14.
- Palmer, T.N. and Ryman, B.E., 1972. Studies on oral glucose intolerance in fish. *Journal. Fish Biol.*, 4:311-319.
- Panserat, S. et al., 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(3), pp.R707–R715.
- Polakof, S. et al., 2011. Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: metformin and insulin interact in a tissue-dependent manner. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(1), pp.R166–R174.

Polakof, S. et al., 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), pp.1015–1045.

Polakof, S., Skiba-Cassy, S. & Panserat, S., 2009a. Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(6), pp.R1769–R1776.

Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Lecka-Czernik B, Rasouli N, Kern PA, 2006. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 47: 2444–2450.

Raso, G.M. et al., 2009. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *European Journal of Pharmacology*, 604(1-3), pp.125–131. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.013>.

Reinitz, G. et al., 1983. RELATIVE EFFECT OF AGE , DIET , AND FEEDING RATE ON THE BODY COMPOSITION OF YOUNG RAINBOW TROUT ( SALMO Rainbow trout fry were fed the U . S . Fish and Wildlife Service starter feed SD7 ( Reinitz et al ., 1979 ). After the fish reached an average weight o. *Aquaculture*, 35, pp.19–27.

Santomauro Jr, A.C. et al., 2008. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(1), pp.120–125.

Thorpe, a & Ince, B.W., 1976. Plasma insulin levels in teleosts determined by a charcoal-separation radioimmunoassay technique. *General and comparative endocrinology*, 30(3), pp.332–339.

Tian, L.X. et al., 2012. Effects of different dietary wheat starch levels on growth, feed efficiency and digestibility in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture International*, 20(2), pp.283–293.

- Towler, M.C. & Hardie, D.G., 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation Research*, 100(3), pp.328–341.
- Wang, Y. et al., 2005. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture Research*, 36(14), pp.1408–1413. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2109.2005.01361.x>.
- Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(1-4), pp.67–80.
- Wright, J.R. et al., 1998. GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *General and comparative endocrinology*, 111(1), pp.20–27.
- Wright Jr., J.R. et al., 2000. Glucose Homeostasis in the Teleost Fish Tilapia: Insights from Brockmann Body Xenotransplantation Studies I. *American Zoologist*, 40(2), pp.234–245.
- Xiong, Y. et al., 2014. Deep sequencing of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver transcriptome response to dietary protein to starch ratio. *Aquaculture*, 433, pp.299–306. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.009>.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), que busca aprofundar os conhecimentos sobre carboidratos na nutrição de peixes, a fim de otimizar sua utilização pelas diversas espécies de peixes.

Alguns aspectos práticos foram observados durante a realização do experimento, os quais são relatados aqui para contribuir no planejamento de futuros estudos com tilápia, utilizando as instalações do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD).

Os tanques-rede cilíndrico-cônico se mostraram bastante adequados para ensaio de crescimento com a tilápia-do-Nilo, ajudando a otimizar o espaço para experimentação. A tilápia-do-Nilo é uma espécie extremamente territorialista e hierárquica, sendo frequente a observação de comportamento agonístico (brigas) nos estudos desenvolvidos no LAPAD com esta espécie. Em experimento anterior, realizado com tilápia nestes mesmos tanques, foram utilizados 25 peixes  $10,60 \pm 0,09$  g por tanque-rede. Essa maior densidade parece ter criado um ambiente melhor para os indivíduos, com menos interação agonística que na densidade de 20 peixes por tanque-rede, utilizada no presente estudo. A escolha por uma menor densidade baseou-se no maior tamanho inicial dos peixes ( $22,00 \pm 1,45$  g). Um fator limitante para o uso destes tanques-rede pode ser o tipo de dieta a ser fornecida. Uma dieta de alta densidade, que afunde, pode prejudicar a observação do consumo dos peixes, pois a ração pode passar pelo fundo do tanque e assim ocorrer uma super estimativa dos dados de consumo.

Durante este trabalho, foi estabelecida parceria com o professor Gustavo Amadeu Micke (Departamento de Química, UFSC), para determinação da metformina no sangue dos peixes. Sem essa parceria, as análises da metformina não teriam sido realizadas.





## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALONSO, R.; AGUIRRE, A.; MARZO, F. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 159–165, 2000.

ANDERSON, J. et al. EFFECTS OF DIETARY CARBOHYDRATE AND FIBRE ON THE A problem in the development of complete artificial diets for aqua- culture is the high protein requirement of many species of fish since this component contributes a high proportion of feed costs . Jackson. **Aquaculture**, v. 37, p. 303–314, 1984.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, n. 8, p. 553– 564, 1989.

BAÑOS, N. et al. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. **Regulatory Peptides**, v. 77, n. 1-3, p. 55–62, 1998.

BARRON, C. et al. Microscopical Study of the Destructuring of Waxy Maize and Smooth Pea Starches by Shear and Heat at Low Hydration. **Journal of Cereal Science**, v. 33, n. 3, p. 289–300, 2001.

BERGOT, F.; BREQUE, J. Digestibility of starch by rainbow trout: Effects of the physical state of starch and of the intake level. **Aquaculture**, v. 34, n. 3-4, p. 203–212, 1983.

BUHLER, D. R.; HALVER, J. E. Nutrition of Salmonoid Fishes. Xi. Iodide Requirements of Chinook Salmon. **The Journal of nutrition**, v. 82, p. 475–482, 1964.

CAPILLA, E. et al. Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 283, n. 1, p. E44–E49, 2002.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 77–83, 2003.

COWEY, C. B.; WALTON, M. Intermediary metabolism. In: HALVER, J. E. ed. **Fish Nutrition**, New-York: Academic Press, 1989. p. 259–329.

CZYZYK A, Tawecki J, Sadowski J, Ponikowska I, Szczepanik Z. Effect of biguanides on intestinal absorption of glucose. **Diabetes**; 17: 492–498. 1968.

DE LIMA, M. R. et al. Farelo de resíduo de manga para tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 33, n. 1, p. 65–71, 2011.

DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HUNG, S. S. O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates. **Aquaculture**, v. 199, n. 1-2, p. 107–117, 2001.

DÍAZ, M. et al. Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 11, p. 5248–5257, 2007.

DÍAZ, M. et al. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 296, n. 3, p. R794–R800, 2009.

ELO, B. et al. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 38, n. 3-4, p. 433–440, 2007.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 149–168, 1999.

ENES P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. **Rev Fish Science** 19:201–215, (2011).

ERFANULLAH, A. K. J. Protein-sparing effect of dietary carbohydrate in diets for fingerling *Labeo rohita*. **Aquaculture**, v. 136, n. 3-4, p. 331–339, 1995.

FAO (FOOD & AGRICULTURE ORGANISATION). **The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome, 2012.**

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fish feeds and feeding in developing countries.** An interim report on the ADCP feed development programme. UNDP/FAO, ADCP/REP/83/18. Rome: FAO, 1983. In: <http://www.fao.org/docrep/Q3567E/q3567e00.htm#Contents> (acesso em 27/05/2015).

FRYER, L. G. D.; PARBU-PATEL, A.; CARLING, D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25226–25232, 2002.

GARCÍA-ALONSO, A. et al. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 181–187, 1999.

GARCÍA-MEILÁN, I.; ORDÓÑEZ-GRANDE, B.; GALLARDO, M. A. Meal timing affects protein-sparing effect by carbohydrates in sea bream: Effects on digestive and absorptive processes. **Aquaculture**, v. 434, p. 121–128, 2014.

GLENCROSS, B. et al. An analysis of the effects of different dietary macronutrient energy sources on the growth and energy partitioning by juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, reveal a preference for protein-derived energy. **Aquaculture Nutrition**, 2014.

GOMINHO-ROSA, M. D. C. et al. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. **Aquaculture**, v. 435, p. 92–99, 2015.

GOOGARZI, M. O.; BRYER-ASH, M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern

antidiabetic agents. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 7, p. 654–665, 2005.

GOUVEIA, A.; DAVIES, S. J. Modulation of the Post-Prandial Plasma Glucose Profile in Juvenile European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* Fed Diets Varying in Starch Complexity. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 35, n. 3, p. 392–400, 2004.

GUERREIRO, I. et al. Water temperature does not affect protein sparing by dietary carbohydrate in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 289–298, 2014.

GUTIÉRREZ, J. et al. Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, n. 4, p. 351–360, 1991.

HARDIE, D. G.; HAWLEY, S. A.; SCOTT, J. W. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. **The Journal of physiology**, v. 574, n. Pt 1, p. 7–15, 2006.

HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, 2002.

HERNÁNDEZ, M.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of Gelatinized Corn Meal as a Carbohydrate Source on Growth Performance, Intestinal Evacuation, and Starch Digestion in Common Carp. **Fisheries Science**, v. 60, n. 5, p. 579–582, 1994.

HERTZ, Y. et al. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 80, n. 1-2, p. 175–187, 1989a.

HERTZ, Y. et al. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium. **Aquaculture**, v. 76, n. 3-4, p. 255–267, 1989b.

HIDALGO, M. . et al. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. I. Influence of dietary carbohydrate level. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 105, n. 1, p. 165–169, 1993.

HILLESTAD, M.; JOHNSEN, F.; ÅSGÅRD, T. Protein to carbohydrate ratio in high-energy diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Research**, v. 32, n. 7, p. 517–529, 2001.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2013. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro, 2014. v. 41, 108p.

KRAMER, D. L.; BRYANT, M. J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 1. Ontogenetic allometry. **Environmental Biology of Fishes**, v. 42, n. 2, p. 115–127, 1995.

KROGDAHL, A. °; HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P. Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 103–122, 2005.

LIN, J. H. et al. Effect of feeding strategy and carbohydrate source on carbohydrate utilization by white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **Aquaculture**, v. 148, n. 2-3, p. 201–211, 1997.

LIN, Z.; JILIN, L. E. I.; CHUNXIANG, A. I. Protein-sparing effect of carbohydrate in diets for juvenile turbot *Scophthalmus maximus* reared at different salinities \*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, n. 1, p. 57–69, 2015.

LOVELL, R. T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 260 p, 1989.

LUFT, D.; EGGSTEIN, M. Lactic Acidosis in Biguanide-Treated Diabetics. **Diabetologia**, v. 87, p. 75–87, 1978.

MAGNONI, L. J. et al. AMP-Activated protein kinase plays an important evolutionary conserved role in the regulation of glucose metabolism in fish skeletal muscle cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MAZUR, C. N. et al. Utilization of dietary starch and glucose tolerance in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of different strains in seawater. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 10, n. 4, p. 303–313, 1992.

MEDLAND, F. W. .; BEAMISH, T. E. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v. 55, p. 35–42, 1986.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 331–343, 2004.

MISBIN, R. I. Phenformin-associated lactic acidosis: pathogenesis and treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 87, n. 5, p. 591–595, 1977.

MISRA, P.; CHAKRABARTI, R. The role of AMP kinase in diabetes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 3, p. 389–398, 2007.

MOHANTA, K. N.; MOHANTY, S. N.; JENA, J. K. Protein-sparing effect of carbohydrate in silver barb, *Puntius gonionotus* fry. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 311–317, 2007.

MOON, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 129, n. 2-3, p. 243–249, 2001.

MPA, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil 2009**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso em: 26 de junho. 2015.

MPA, MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil 2010**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso em: 26 de junho. 2015.

MPA, **Ministério da Pesca e Aquicultura**, 2014. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/potencial-brasileiro>> Acesso em: 19 de maio de 2015.

MUSI, N. et al. Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. July, 2002.

NAYLOR, R. L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1017–1024, 2000.

NEW, M.B. **Feed and feeding of fish and shrimp**. Rome, 275 p, 1987.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of fishes and shrimps**. National Academic Press, Washington, D.C. 2011

OAKHILL, J. S.; SCOTT, J. W.; KEMP, B. E. Structure and function of AMP-activated protein kinase. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 1, p. 3–14, 2009.

PÁRRIZAS, M. et al. Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. **Regulatory Peptides**, v. 53, n. 3, p. 211–222, 1994.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 205, p. 287–299, 2002.

PLANAS, J. V. et al. Fish Insulin , IGF-I and IGF-II Receptors : A Phylogenetic Approach. **American Zoologist**, v. 233, p. 223–233, 2000.

PODOSKINA, T. A; PODOSKIN, A. G.; BEKINA, E. N. Efficiency of utilization of some Potato starch modifications by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 152, p. 235–248, 1997.

POLAKOF, S. et al. Insulin-induced hypoglycaemia is co-ordinately regulated by liver and muscle during acute and chronic insulin stimulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. Pt 9, p. 1443–1452, 2010.

POLAKOF, S. et al. Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: metformin and insulin interact in a tissue-dependent manner. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 1, p. R166–R174, 2011.

POLAKOF, S. et al. Glucose metabolism in fish: A review. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 182, n. 8, p. 1015–1045, 2012.

POLAKOF, S.; SKIBA-CASSY, S.; PANSERAT, S. Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 297, n. 6, p. R1769–R1776, 2009.

POVH, J. A. et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 1–10, 2005.

RIGAS, A N. et al. Circadian variation of glucose, insulin, and free fatty acids during long-term use of oral hypoglycaemic agents in diabetes mellitus. **British medical journal**, v. 4, n. 5622, p. 25–28, 1968.

RONNETT, G. V. et al. AMPK in the brain: Its roles in energy balance and neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. SUPPL. 1, p. 17–23, 2009.

SANTOMAURO JR, A. C. et al. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 1, p. 120–125, 2008.

SARDAR, P. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and hemato-biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soy protein based diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 444, 2007.

SEENAPPA, D.; DEVARAJ, K. V. Effect of Different Levels of Protein, Fat and Carbohydrate on Growth, Feed-Utilization and Body Carcass Composition of Fingerlings in Catla-Catla (Ham). **Aquaculture**, v. 129, n. 1-4, p. 243–249, 1995.

SHIAU, S. Y.; CHEN, M. J. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1747–1753, 1993.

SHIAU, S. Y.; LIANG, H. S. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 4, p. 976–982, 1995.

SHIAU, S.-Y.; CHUANG, J.-C. Utilization of disaccharides by juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 133, n. 3-4, p. 249–256, 1995.



SHIAU, S.-Y.; PENG, C.-Y. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 117, n. 3-4, p. 327–334, 1993.

SILVEIRA, U. S. DA; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. D. C. Utilização E Metabolismo Dos Carboidratos Em Peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817–836, 2009.

SINGH, R. K.; BALANGE, A. K.; GHUGHUSKAR, M. M. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 680–684, 2006.

STONE, D. A J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 109–121, 2003.

TACON, A. G. J. **Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs**. Rome, FAO: FAO Fisheries, 64p. (Circular n° 856), 1993.

TACON, A.G.J. **The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – A training manual**. 1. – The essential nutrients. FAO – GCP/RLA/075/ITA. Brasília, D.F., pg.117, 1988. In: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB470E/AB470E00.htm#TOC> (acesso em 01/06/2015).

TACON, A.G.J. **The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual**. 2. Nutrient sources and composition. FAO/Italy AQUILA Project, Field Document, No. 5. Brasilia, Brazil, 1987. In: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB468E/AB468E00.htm> (acesso em 27/05/2015).

TAKEUCHI, T.; HERNÁNDEZ, M.; TAKESHI, W. Nutritive Value of Gelatinized Corn Meal as a Carbohydrate Source to Grass Carp and Hybrid Tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Fisheries Science**, v. 60, n. 5, p. 573–577, 1994.

TOWLER, M. C.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 328–341, 2007.

VOET, D., e J. VOET. **Bioquímica**. 3.ed. Artmed, Porto Alegre, RS, Brasil. 2006.

WALTON, M. J.; COWEY, C. B. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 59–79, 1982.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67–80, 1994.

WILSON, R. P.; POE, W. E. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. **The Journal of nutrition**, v. 117, n. 2, p. 280–285, 1987.

WRIGHT, J. R. et al. GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. **General and comparative endocrinology**, v. 111, n. 1, p. 20–27, 1998.

WRIGHT JR., J. R. et al. Glucose Homeostasis in the Teleost Fish Tilapia: Insights from Brockmann Body Xenotransplantation Studies1. **American Zoologist**, v. 40, n. 2, p. 234–245, 2000.

ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001.

ZIMMERMANN, S; FITZSIMMONS, K. Tilápicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart. p.239-266. 2004.

ZORZANO, A. et al. Insulin-like growth factor I binding and receptor kinase in red and white muscle. **FEBS Letters**, v. 234, n. 2, p. 257–262, 1988.

## ANEXO



**Figura 1.** Extrusão das dietas e secagem em estufa com circulação forçada.



**Figura 2.** Tanques-rede e caixas de 1000 L utilizadas para o experimento de desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).