**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM
VITAMINA C NO CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA À
HIPOXIA EM ALEVINOS DE PIAUÇU (*Leporinus obtusidens*)**

RICARDO FRANKLIN DE MELLO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal
e Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Mello, Ricardo Franklin de

Influência da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e resistência à hipoxia em alevinos de piaçu (*Leporinus obtusidens*) / Ricardo Franklin de Mello. - - Piracicaba, 1999.

41p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.

Bibliografia.

1. Alevino 2. Distúrbio fisiológico animal 3. Estresse animal 4. Exigência nutricional 5. Hipoxia 6. Nutrição animal 7. Vitamina C I. Título

CDD 639.375

Às pessoas que sempre estiveram ao meu lado, meus pais,

Luiz Geraldo de Mello Sobrinho

e

Ana Luiza Franklin de Mello,

e meus irmãos,

Leandro Franklin de Mello

e

Tatiana Franklin de Mello,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Tendo finalizado este trabalho, quero manifestar minha gratidão às pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que o mesmo pudesse ser realizado, em especial:

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, meu orientador, pela sua amizade, apoio, ensinamentos e todo o conhecimento técnico;

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

Ao Corpo Docente do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de aprendizado;

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelo auxílio e orientação na realização das análises estatísticas;

Aos funcionários do Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da ESALQ, Ismael Baldessin Júnior e Sérgio Vanderlei Pena e aos colegas Alexsandra Carmen “Bambina” Caseiro, Leonardo “Banana” Tachibana e Leandro Portz pela colaboração na condução do experimento;

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino, pela orientação e revisão das citações bibliográficas contidas no trabalho;

Aos colegas de turma, Ana Maria Barreto de Menezes “Linguissa” Sampaio e Gláucio Nogueira “Toyota” Toyama, pela troca de idéias e companhia nos estudos;

Aos meus grandes amigos, Ivan “TG” Vieira e Marco Antônio Álvares “Moxo” Balsalobre pelo apoio, companheirismo, amizade e conselhos durante este período;

À pessoa mais importante da minha vida nesses três anos, Mônica Accaui Marcondes de Moura, pela constante dedicação, paciência, confiança e incentivo incondicionais.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo	vii
Summary	ix
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
3. Material e Métodos	16
3.3. Ensaio 1	16
3.4. Ensaio 2.....	20
4. Resultados.....	22
4.1. Ensaio 1	22
4.2. Ensaio 2.....	24
5. Discussão	26
5.1. Ensaio 1	26
5.2. Ensaio 2.....	30
6. Conclusões	33
Referências Bibliográficas.....	34

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Variação da temperatura média da água das caixas durante o ensaio 1	23
--	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Composição das dietas experimentais.....	17
2. Composição das pré-misturas mineral e vitamínica utilizadas nas dietas.....	18
3. Médias de desempenho (GP-I, GP-II, GP-T e S%) dos alevinos sob os diferentes tratamentos	23
4. Médias das taxas de sobrevivência dos tratamentos após indução de hipoxia.....	24

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA COM VITAMINA C NO CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA À HIPOXIA EM ALEVINOS DE PIAUÇU (*Leporinus obtusidens*)

Autor: Ricardo Franklin de Mello

Orientador: Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino

RESUMO

O experimento objetivou avaliar a influência da suplementação de vitamina C na dieta de alevinos de piauçu (*Leporinus obtusidens*). Para tanto, foram estabelecidos dois ensaios. O primeiro ensaio, com duração de 105 dias, testou o efeito da suplementação de níveis crescentes de vitamina C (0, 50, 150, 250, 350, 450, 550, 650, 750 e 850 mg/kg) na dieta sobre o ganho de peso e sobrevivência da espécie, em um delineamento inteiramente casualizado ($n = 3$), com 20 peixes/parcela, em caixas de 250 L. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, tanto para o ganho de peso ($P > 0,4054$) como para a taxa de sobrevivência ($P > 0,5657$). No Ensaio 2 foi avaliada a influência da vitamina C na resistência dos alevinos ao estresse por hipoxia. Grupos de dez peixes aleatoriamente selecionados de cada parcela do Ensaio 1 foram estocados em cada um dos 30 “hapas” de 20 litros, alojados em caixa de 250 litros, num delineamento de blocos casualizados ($n = 3$). Foi observado que a suplementação com vitamina C na dieta não afetou significativamente ($P > 0,4032$) a sobrevivência dos alevinos de piauçu submetidos a estresse por hipoxia por um período de até 14 horas, com oxigênio dissolvido na água mantido abaixo de 1,0 mg/L. Embora nossas observações não tenham permitido constatar qualquer diferença entre os tratamentos para os parâmetros analisados, dados da literatura mostram que a suplementação dietética com ácido ascórbico tem um efeito benéfico nos índices de ganho de peso, sobrevivência e resistência ao estresse nas várias espécies de peixes. Desta maneira, podemos sugerir que novos estudos sejam realizados no sentido de se

definir o nível de suplementação adequado com vitamina C em dietas para alevinos de piaçu.

**INFLUENCE OF DIETARY VITAMIN C SUPPLEMENTATION ON
GROWTH AND RESISTANCE TO LOW DISSOLVED OXYGEN IN
PIAUÇU (*Leporinus obtusidens*) FINGERLINGS**

Author: Ricardo Franklin de Mello

Adviser: Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino

SUMMARY

Two trials were set up to evaluate the influence of different levels of dietary vitamin C supplementation on growth performance, survival rate and resistance to low dissolved oxygen (LODO) concentration of fingerling piauçu (*Leporinus obtusidens*). For Trial 1, groups of 20 fish were stocked in 250-L tanks ($n = 3$), in a totally randomized design, and fed diets containing 0, 50, 150, 250, 350, 450, 550, 650, 750, 850 mg of vitamin C/kg of diet. The results showed no significant differences amongst treatments in regard to weight gain ($P > 0.4054$) and survival rate ($P > 0.5657$). In Trial 2, groups of 10 fish of each replicate of Trial 1 were stocked in 20-L cages, in a randomized block design, and submitted to a 14-h LODO stress (1.0 mg DO/L). Fingerlings survival rate was not significantly affected by LODO levels ($P > 0.4032$) up to 14 hours after stressing conditions ceased. Even though no conclusions could be drawn from our results, literature data show that dietary vitamin C supplementation significantly affects the studied parameters. Therefore, it is suggested that more extensive studies shall be performed to determine dietary vitamin C requirements of the species.

1. INTRODUÇÃO

Porque os organismos do alimento natural são ricos em fatores de crescimento essenciais, especialmente minerais e vitaminas, peixes raramente apresentam sintomas de deficiência nutricional em seu ambiente natural (Brown & Gratzek, 1980). Por outro lado, invariavelmente, quando os peixes são cultivados intensivamente, a baixa disponibilidade do alimento natural nos viveiros de criação obriga o criador a fornecer dietas nutricionalmente completas para que os peixes não apresentem deficiências nutricionais e, conseqüentemente, baixa taxa de crescimento e maior suscetibilidade a doenças (Lovell, 1991; Wilson, 1995)

Segundo Lovshin (1997) o crescimento populacional na China levou à necessidade de incremento na produção de alimentos, entre eles o pescado. Entretanto, a limitação de espaço – áreas ocupadas por outras atividades agropecuárias – impedia a construção de novos viveiros, restando como alternativa o emprego de sistemas de produção mais intensificados para aumentar a produtividade. Para que isso fosse possível, era imprescindível o desenvolvimento da indústria de alimentação animal local, que veio a se consolidar no final da década de 80.

No Brasil, atualmente, o parque industrial encontra-se em bom estágio de desenvolvimento, sendo capaz de produzir alimentos de qualidade. Assim, contrariamente à China, nossa limitação parece ser de outra natureza: o desconhecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes aqui cultivadas.

Apenas cerca de 10 entre as quase 300 espécies cultivadas em todo o mundo têm suas exigências nutricionais definidas. Isso faz com que a formulação de dietas para peixes seja feita por aproximação às exigências destas 10 espécies, de acordo com a semelhança entre seus hábitos alimentares, faixa de conforto térmico, habitat (*e.g.* peixes de água doce ou salgada) etc. (Wilson, 1995). Por este motivo, grande parte das dietas comerciais disponíveis no mercado brasileiro são formuladas tendo por base informações obtidas com peixes exóticos, já que os estudos sobre as exigências nutricionais dos peixes das bacias nacionais são bastante recentes e as informações disponíveis ainda podem ser consideradas de pouca expressão, o que justifica a realização do presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie em estudo

O piaçu é conhecido cientificamente como *Leporinus obtusidens*. Jovens da espécie apresentam, em geral, oito faixas verticais enegrecidas na parte superior do corpo, entre a cabeça e o pedúnculo caudal. Por isso a espécie é bastante confundida com *Leporinus octofasciatus*. Entretanto, o piaçu apresenta nos flancos três manchas arredondadas e acinzentadas, geralmente nítidas, o que distingue as duas espécies. O piaçu é uma espécie reofílica e pode ser encontrada nas bacias dos rios Paraná e Paraguai (Géry *et al.*, 1987).

O piaçu é uma espécie de hábito alimentar onívoro, variando entre bentófaga a detritívora. Na fase de pós-larva alimenta-se do fitoplâncton e em estágios de maior desenvolvimento pode alimentar-se de frutos, insetos e, em cativeiro, de ração. Seu hábito bentófago permite ainda que aproveite larvas de insetos, larvas e ovos de moluscos, crustáceos etc., e sua característica de peixe detritívoro permite que utilize detritos orgânicos, como resíduos planctônicos, fezes de outros peixes e algas que se desenvolvem no fundo dos viveiros (Kubitza, 1998a). Apesar da espécie ser bastante apreciada no Brasil pelos adeptos da pesca recreativa, poucos estudos foram realizados com o objetivo de determinar as exigências nutricionais da espécie, a fim de viabilizar sua criação em sistemas intensificados.

2.2. Importância da vitamina C na nutrição de peixes

Como qualquer outra classe animal, os peixes necessitam de nutrientes como aminoácidos, minerais, ácidos graxos e vitaminas para a realização de suas funções fisiológicas vitais. De acordo com Lovell (1975; 1991) as principais diferenças entre as exigências nutricionais de peixes e de mamíferos e pássaros são a menor relação energia digestível:proteína de suas dietas: 8 – 10 kcal/grama de proteína para peixes e de 15 a 20 kcal/grama de proteína para mamíferos e pássaros. Peixes exigem ácidos graxos da série ω -3, enquanto animais terrestres necessitam de ácidos graxos da série ω -6 e, ao contrário dos animais terrestres, os peixes podem absorver minerais da água mas dependem totalmente de fontes exógenas de vitamina C, já que são incapazes de sintetizá-la.

As vitaminas são compostos orgânicos exigidos pelos animais para realização de suas funções vitais e crescimento normal e são agrupadas em lipo e hidrossolúveis. De acordo com NRC (1993) algumas vitaminas hidrossolúveis são exigidas em quantidades relativamente pequenas pelos peixes, tendo a função primária de coenzimas no metabolismo celular. Entre estas, encontram-se as vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, piridoxina e cianocobalamina), ácido pantotênico, niacina, biotina e ácido fólico. Existem outras três vitaminas hidrossolúveis que são exigidas em grandes quantidades – macrovitaminas, e não apresentam função de coenzima: colina, inositol e vitamina C. As vitaminas lipossolúveis exigidas pela maior parte dos peixes são as vitaminas A, D, E e K. De acordo com Lovell (1977) as exigências vitamínicas são afetadas pela idade, tamanho e taxa de crescimento, assim como por vários outros fatores ambientais e nutricionais.

Devido a ausência de uma enzima chamada L-gulonolactona oxidase, a maioria dos peixes é incapaz de sintetizar a vitamina C, ou L-ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) a partir da D-glucose ($C_6H_{12}O_6$), contrariamente a outros animais, como os mamíferos (Steffens, 1989). Desta maneira, a suplementação de vitamina C nas dietas de peixes criados em sistemas intensivos, onde não têm acesso ao alimento natural que constitui sua principal fonte de vitaminas, é absolutamente essencial (Lovell & Lim, 1978).

O metabolismo da vitamina C pelos peixes foi detalhado por Halver (1985). Existem três reservatórios de ácido ascórbico: o primeiro é o ácido ascórbico de troca rápida entre a dieta e o fígado; o segundo é representado pelo ascorbato-2-sulfato acumulado nos tecidos e é lentamente trocável; e o terceiro é representado pelo ácido ascórbico no cérebro. O autor denomina o L-ácido ascórbico de vitamina C₁, o ácido dehidroascórbico de dehidro C (forma oxidada) e o ascorbato-2-sulfato de vitamina C₂. Entretanto, Woodward (1994) afirma que é inadequado denominar o ascorbato-2-sulfato de vitamina C₂, pois tanto para peixes como para animais homeotermos, o valor nutricional do ascorbato-2-sulfato é muito reduzido.

Segundo Andriguetto *et al.* (1988) o ácido ascórbico que é rapidamente absorvido no trato intestinal é rapidamente oxidado a ácido dehidroascórbico. De acordo com Halver (1985) o ácido ascórbico pode ser novamente reduzido a L-ácido ascórbico pela dehidroascorbato redutase, já identificada em truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*). A razão L-ácido ascórbico:ácido dehidroascórbico reflete a dinâmica dos, ou controla os, processos celulares biossintéticos. O ácido ascórbico da dieta é convertido pela ascorbato-2-sulfossintetase em ascorbato-2-sulfato, uma forma mais estável que é armazenada no tecido conjuntivo. A enzima ascorbato-2-sulfohidrolase é a responsável pela reconversão a L-ácido ascórbico e sua atividade é inibida pelo próprio L-ácido ascórbico. A atividade conjunta dessas enzimas permite a manutenção de níveis essenciais de ácido ascórbico nos sistemas circulatório e intracelular dos tecidos.

Apesar de muitos estudos terem sido realizados com o intuito de definir as funções desempenhadas pela vitamina C, tanto em outros animais (Lehninger, 1991), como em peixes (Halver, 1985), algumas incertezas permanecem em relação aos resultados obtidos nestas pesquisas, muitas vezes conflitantes. Sabe-se que o ácido ascórbico é cofator de numerosas reações de hidroxilação, como as do triptofano, tirosina, lisina, fenilalanina e prolina – necessárias para a formação dos tecidos conjuntivos, cicatrizantes e regeneração de feridas e matriz óssea; para a síntese de corticosteróides – relacionada à reprodução; para facilitar a absorção de ferro (Halver, 1985; Halver, 1989; Tacon, 1991 e Masumoto *et al.*, 1991). O ácido ascórbico participa

ainda da biossíntese da carnitina, que está envolvida no metabolismo de lipídios (De Silva & Anderson, 1995). Além disso, devido ao alto poder de redução, a vitamina C pode participar na prevenção de oxidação de lipídios na dieta e nos tecidos, em ação sinérgica à da vitamina E (Masumoto *et al.*, 1991).

Segundo Hilton (1989) o ácido ascórbico não facilitaria a absorção de ferro, mas o colocaria numa forma mais disponível para o metabolismo. O autor mostra, ainda, que a vitamina C pode ter um “sparing effect” em relação à exigência de vitamina E, mas que a temperatura ambiente deve ter influência neste tipo de relação e que o papel da vitamina C na absorção ou metabolismo e excreção do cobre pode variar com a espécie em questão. A relação entre o ácido ascórbico e o ácido fólico foi estudada por Duncan & Lovell (1994), que demonstraram que dosagens de vitamina C de 200 mg/kg de dieta podem reduzir a exigência de ácido fólico para peixes desafiados com *Edwardsiella ictaluri*, e que níveis inadequados de ácido ascórbico na dieta podem interferir negativamente no papel do ácido fólico na síntese de eritrócitos. De acordo com Andriguetto *et al.* (1988) a vitamina C, em outros animais, seria necessária para a conversão do ácido fólico em ácido folínico – forma ativa do ácido fólico, cuja reação ocorre no fígado.

O sucesso da reprodução é também influenciado pela suplementação de vitamina C na dieta dos reprodutores. Soliman *et al.* (1986b) demonstraram que a suplementação da dieta de reprodutores de tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) com 1.250 mg/kg de vitamina C melhora a taxa de eclosão e a taxa de crescimento das larvas produzidas. Resultados semelhantes foram obtidos por Waagbo *et al.* (1989) com truta arco-íris, que suplementadas com vitamina C produziram maior taxa de eclosão e melhor sobrevivência das larvas. Dabrowski & Ciereszko (1996a) também estudaram o papel da vitamina C na nutrição de reprodutores de truta arco-íris e demonstraram que o ácido ascórbico protege contra a formação de radicais livres que podem produzir nucleotídeos oxidados, responsáveis por mutações durante a replicação do DNA das células espermáticas, que seriam transmitidas para a prole, reduzindo a taxa de sobrevivência de embriões. Outra observação importante relacionada à nutrição

vitamínica de reprodutores é que, de acordo com Dabrowski & Ciereszko (1996b), altos níveis de ácido ascórbico nos ovos são importantes para o desenvolvimento embrionário, na alimentação endógena, a partir do vitelo.

2.3. Estabilidade e formas da vitamina C

Muitos estudos têm sido realizados envolvendo a estabilidade da vitamina C após o processamento (peletização e extrusão) e estocagem das dietas, assim como a investigação de formas mais estáveis de suplementação de ácido ascórbico, de modo a reduzir as perdas. Segundo Tacon (1991) o ácido ascórbico pode ser lixiviado quando a ração entra em contato com a água ou pode ser destruído na presença de umidade, oxigênio, elementos traço, temperaturas elevadas, luz e lipídios oxidados. Para prevenir contra estes problemas podem ser utilizadas formas protegidas de vitamina C, como microencapsulada, com etilcelulose, ou ainda, pelo uso de formas mais estáveis. De Silva & Anderson (1995) recomendam que a suplementação das dietas seja realizada em quantidades cinco a dez vezes maior do que a exigida pelas respectivas espécies.

Para reduzir as perdas por lixiviação de vitaminas hidrossolúveis, entre elas a vitamina C, Kubitz *et al.* (1998) recomendam aos fabricantes de ração a adição de aglutinantes naturais ou sintéticos para aumentar a estabilidade dos grânulos na água, a utilização de estratégias e equipamentos adequados ao processamento, o uso de um “spray” de gordura que confira maior hidrofobia aos grânulos e, finalmente, a suplementação de dietas com fontes de vitaminas de baixa solubilidade, como é o caso do mono e polifosfato de ácido ascórbico.

No processo de peletização, até 73% da forma não-protetida de vitamina C pode ser retida, contra 82% da forma protegida com etilcelulose, enquanto que na extrusão, apenas 38% da forma não-protetida é retida contra 54% da forma protegida com etilcelulose (Lovell & Lim, 1978). Soliman *et al.* (1986a) estudaram a retenção de ácido ascórbico em diferentes formas e, apesar de não terem notado diferenças no desempenho de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que receberam dietas

suplementadas com as diversas fontes testadas, observaram que a taxa de retenção no alimento final foi de 26,2% para sal de sódio de ácido ascórbico, 33,5% para L-ácido ascórbico, 58% para ácido ascórbico revestido com glicerídeo e 94,7% para ascorbato-2-sulfato.

Gadient & Schai (1994) estudaram a estabilidade de diversas formas de vitamina C em dietas para camarões e concluíram que a retenção após o processamento era de 98% após a extrusão ou peletização quando a forma utilizada era ascorbil polifosfato, e variou de 78% na extrusão a 91% na peletização quando se utilizou ascorbil monofosfato. Além disso, as duas formas foram as que apresentaram maior estabilidade quando foram submetidas a testes de lixiviação de ácido ascórbico após a imersão da dieta na água. Resultados semelhantes foram obtidos por Gadient & Fenster (1994), que observaram, em dietas extrusadas para peixes, que tanto o ascorbil mono como o polifosfato apresentaram retenção acima de 90% após 3 meses de armazenamento, sendo muito superiores às formas protegidas com celulose ou silicone.

A perda de vitamina C de uma dieta suplementada com 470 mg/kg pode chegar a 66% num período de 30 segundos em contato com a água (Pannevis & Earle, 1994). O nível de suplementação de vitamina C também pode influenciar na porcentagem de retenção. De acordo com Soliman *et al.* (1994) a porcentagem de retenção de ácido ascórbico na dieta de peixes, após o processamento, é maior em dietas com maiores níveis de suplementação e pode variar de 20 a 44,7%, em dietas suplementadas com 450 a 1000 ppm de vitamina C, respectivamente.

A utilização de ascorbil palmitato como fonte de vitamina C para truta arco-íris, em substituição ao L-ácido ascórbico, foi descartada por Albrektsen *et al.* (1988), devido ao mau desempenho dos peixes até a oitava semana de experimento. Os autores especularam que talvez seja necessário um certo tempo para a ativação de um complexo enzimático específico para o metabolismo dessa fonte.

Shelbaek *et al.* (1990) compararam a estabilidade e a biodisponibilidade de um produto de ácido ascórbico revestido com polímero sintético (PCAA), L-ácido ascórbico cristalino (AA), ácido ascórbico revestido com etilcelulose (ECAA) e ácido

ascórbico revestido com glicerídeo (GCAA) e demonstraram que a retenção de vitamina C do PCAA é superior à do AA após a compactação e principalmente após a estocagem por 6 semanas, e que a biodisponibilidade das duas fontes é equivalente para truta arco-íris, descartando o uso de ECAA e GCAA. O uso de ascorbil-2-monofosfato de magnésio como fonte de ácido ascórbico foi estudado por Phromkunthong *et al.* (1994), que demonstraram que a exigência de vitamina C do “seabass” (*Lates calcarifer*) é muito inferior àquela verificada por outros autores que se utilizaram de L-ácido ascórbico, creditando esta diferença à maior estabilidade do primeiro composto.

Quando o L-ácido ascórbico foi substituído por ascorbato-2-sulfato, ascorbato-2-fosfato e ascorbil-6-palmitato não foram observadas diferenças entre as fontes alternativas e a fonte original, no que diz respeito ao desempenho do bagre do canal (Brandt *et al.*, 1985). Por outro lado, de acordo com El Naggar & Lovell (1991b) o L-ascorbil-2-monofosfato de magnésio tem uma atividade equimolar ao L-ácido ascórbico como fonte de vitamina C para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e embora a atividade vitamínica do L-ascorbil-2-sulfato exista, ela é muito menor que a dos outros compostos.

Resultados semelhantes foram obtidos por El Naggar & Lovell (1991a), que demonstraram que o L-ascorbil-2-sulfato tem atividade vitamínica limitada, enquanto o L-ascorbil-2-monofosfato tem potência no mínimo 1,74 vezes a do L-ácido ascórbico, no que se refere a manutenção dos níveis de ácido ascórbico nos tecidos. Mustin & Lovell (1992) demonstraram que L-ascorbil-2-monofosfato de sódio tem potência vitamínica equivalente ao L-ácido ascórbico e que o primeiro, como o L-ascorbil-2-monofosfato de magnésio, é altamente estável no processamento.

Observação semelhante foi feita por Woodward (1994), que defende a utilização de ascorbato-2-monofosfato ou ascorbato-2-polifosfato, como fonte de vitamina C na dieta de truta arco-íris, os quais seriam prontamente convertidos em L-ácido ascórbico. O autor descarta a utilização de ascorbato-2-sulfato para o mesmo fim, ressaltando o baixo valor nutricional deste composto para peixes e animais homeotermos. Mais recentemente, utilizando tilápia do Nilo, Abdelghany (1998) demonstrou que o L-

ascorbil polifosfato proporciona melhor desempenho do que o L-ácido ascórbico e o L-ascorbil-2-sulfato no que se refere a crescimento e eficiência alimentar.

2.4. Exigências quantitativas de vitamina C pelos peixes

A literatura técnica já traz as exigências dietéticas de vitamina C de algumas das espécies de peixes estudadas mais intensamente. Entretanto, é comum encontrar informações bastante variáveis para uma mesma espécie de peixe. Para espécies nacionais, como é o caso do piauçu, não existem na literatura informações quanto ao nível adequado de vitamina C na dieta.

Além disso, algumas recomendações, como por exemplo, 50 mg de vitamina C por kg de dieta para tilápia (NRC, 1993), não proporcionam crescimento satisfatório em criações comerciais, talvez pelo fato de os fabricantes não estarem adicionando vitamina C ao produto, ou ainda pela utilização de formas pouco estáveis. De acordo com Kubitza *et al.* (1998), 61,5% das rações comerciais de peixes encontradas no Brasil contêm menos do que 70% do nível de ácido ascórbico especificado no rótulo.

Os custos com o manejo alimentar e nutricional em piscicultura intensiva, correspondem a aproximadamente 60 a 70% dos custos de produção (Cyrino *et al.*, 1998). A suplementação vitamínica é um dos fatores que mais afetam a qualidade das rações comerciais. Assim, a definição precisa das exigências de cada uma das espécies criadas comercialmente, permitirá maior precisão na formulação destas rações, levando a uma redução nos custos de produção e tornando a atividade mais competitiva. As exigências de vitamina C para a maioria das espécies de peixes, de acordo com vários autores, podem variar de 10 a 1.250 mg/kg de ração (Tacon, 1991).

As suplementação dietética de vitamina C está relacionada ao estresse, à taxa de crescimento, ao tamanho do animal e a outros nutrientes presentes na dieta (Halver, 1989). As exigências de suplementação de vitamina C para máximos crescimento e eficiência alimentar do bagre do canal são de 50 mg/kg de dieta (Andrews & Murai, 1975). Entretanto, os resultados obtidos por estes autores não convergiram com aqueles

apresentados por (Lim & Lovell, 1978), que dizem que para evitar o aparecimento de sinais de deficiência dietética de vitamina C para a espécie, são necessários 60 miligramas de vitamina C por quilograma de alimento.

Soliman *et al.* (1994) recomendam a inclusão de 1.250 mg de vitamina C por quilograma na dieta de alevinos de tilápia do Nilo, o que corresponderia a 420 mg de vitamina C por quilograma de dieta após o processamento e estocagem. Para Lee *et al.* (1998) a suplementação de vitamina C em dietas do “korean rockfish” (*Sebastes schlegeli*) deve ser de, no mínimo, 103 mg/kg de L-ácido ascórbico para máximo crescimento e de 1.390 mg/kg para saturação nos tecidos.

Mahajan & Agrawal (1980) determinaram em 700 mg/kg de dieta a exigência de vitamina C para larvas da carpa indiana mrigal (*Cirrhina mrigala*). Os autores apontam para a possibilidade de os altos valores observados serem resultantes do fato dos experimentos terem sido iniciados logo após a absorção do saco vitelínico, o que condicionou o uso de partículas alimentares de tamanho reduzido e causou aumento nas perdas do nutriente por lixiviação.

De acordo com Li *et al.* (1998) o bagre do canal necessita de não mais que 50 a 100 mg/kg de vitamina C na dieta para apresentar crescimento e saúde adequados. Finalmente, num dos poucos estudos realizados para determinar a exigência de vitamina C com espécies nacionais, Castagnolli *et al.* (1994) demonstraram que 50 mg/kg são suficientes para assegurar crescimento normal ao pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2.5. Estresse x vitamina C

O conceito de estresse, segundo Francis-Floyd (s.d.), representa uma condição em que o animal é incapaz de manter um estado fisiológico normal devido a fatores chamados de estressantes. Estes fatores podem ser químicos – má qualidade da água, poluição ou mal manejo nutricional; biológicos – altas densidades de estocagem, presença de outras espécies de peixes agressivas ou territorialistas, microrganismos ou

parasitas; físicos – temperatura, luz, sons e gases dissolvidos; ou relacionados ao manejo – manuseio devido a despesca e transporte e tratamento de doenças.

As reações ocorridas nos peixes após a ação de um fator estressante foram extensivamente explicadas por Thomas (1990). De modo geral, os estímulos adversos são detectados por órgãos sensoriais e, a partir deles, chegam ao hipotálamo, que estimula as células cromafins a secretar catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), ocorrendo um aumento nos níveis dessas substâncias no plasma. O hipotálamo também estimula a liberação do fator liberador de corticotropina, que causa a liberação da corticotropina no sangue, a qual estimula a liberação de corticosteróides (principalmente cortisol) no sangue.

As catecolaminas e os hormônios corticosteróides estimularão a ocorrência de alterações bioquímicas e fisiológicas, chamadas de efeito secundário. As catecolaminas causam aumento dos níveis de glucose no plasma pela mobilização das reservas de glicogênio hepático (glicogenólise), enquanto os corticosteróides mantêm a hiperglicemia estimulando o catabolismo protéico e a gluconeogênese. Além disso, ocorrem distúrbios osmóticos e iônicos que levam ao decréscimo da osmolalidade em peixes de água doce. Assim, os mecanismos de defesa podem tornar-se comprometidos devido ao decréscimo de células vermelhas circulantes e uma diminuição da resposta imune a agentes infecciosos. Costa (1998) completa que, quando o fator estressante é severo, pode levar o peixe à perda da capacidade de realização de adaptações, chegando a um estado de exaustão e possivelmente a morte.

As alterações bioquímicas no organismo dos peixes ocorridas após a ação de um fator estressante dependem, principalmente, da natureza deste fator. Considerando uma fonte de estresse de natureza respiratória, essas alterações envolveriam o aumento dos níveis de epinefrina, norepinefrina e dopamina no plasma, a elevação da concentração de hemoglobina no sangue e de glucose no plasma, bem como a redução do glicogênio no fígado e nos músculos (Pickering & Pottinger, 1995).

Incluída na categoria de fatores estressantes químicos, a falta de oxigênio dissolvido na água é a principal causa da mortalidade de peixes em viveiros de

piscicultura (Hepher & Pruginin, 1981). De acordo com Boyd (1996) a quantidade de oxigênio exigida pelos animais aquáticos depende da espécie, tamanho, consumo de alimento, atividade, temperatura da água, da própria concentração de oxigênio dissolvido na água, etc.

De acordo com Durve & Lovell (1982) e Lovell (1982), a deficiência de vitamina C aumenta a suscetibilidade do bagre do canal à contração de infecções e doenças e reduz a resistência ao estresse. Outra observação importante é que, segundo Halver (1985), um aumento na tolerância a substâncias poluentes ocorre quando a concentração de vitamina C nos tecidos é elevada.

A influência do uso de anestésicos nas alterações dos níveis de cortisol e glucose no plasma sanguíneo do “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) após o manuseio e permanência em águas pouco profundas foram avaliadas por Thomas & Robertson (1991). Os autores constataram que o uso de anestésicos pode reduzir a intensidade das respostas bioquímicas de estresse causado pelo manuseio, mas que a exposição dos peixes aos anestésicos por longo tempo pode produzir efeito contrário.

Henrique *et al.* (1996) testaram a resposta fisiológica (níveis de glucose, proteína e triglicerídeos no plasma e glicogênio hepático e muscular) do “gilthead seabream” (*Sparus aurata*) a fatores estressantes como hipossalinidade, baixo nível da água e manuseio e constataram que apenas este último proporcionou alteração significativa nos níveis de ácido ascórbico e ascorbato-2-sulfato no baço e de glucose no plasma, indicando que para os outros dois fatores os peixes conseguiram se adaptar de forma adequada, minimizando as reações características de estresse.

Os resultados encontrados por Li *et al.* (1998) confirmam várias destas afirmações, mostrando que as concentrações de cortisol no soro sanguíneo são maiores quando os peixes sofrem algum tipo de estresse. Os mesmos autores demonstraram ainda que o nível de vitamina C na dieta não influencia o nível de cortisol no soro e que a concentração de ascorbato no fígado não foi influenciada pelo estresse.

2.6. Vitamina C e o sistema imunológico

A função do ácido ascórbico no fortalecimento do sistema imune de peixes também é pouco clara. Entretanto, de acordo com Ghittino (1989), a maioria dos estudos relacionando a deficiência de um nutriente específico à ocorrência de doenças nutricionais envolve a vitamina C. Verlhac & Gabaudan (1994) afirmam que a influência da vitamina C no sistema imune está relacionada à sua atividade antioxidante, que impede a formação de radicais livres, mantendo a integridade das células para o funcionamento normal do sistema imune. Fracalossi (1998) completa que o efeito benéfico das vitaminas antioxidantes A, E e C pode ser observado no acompanhamento do metabolismo das células que realizam fagocitose, como neutrófilos e macrófagos.

Observações condizentes com essa tese já haviam sido feitas por Navarre & Halver (1989), que verificaram que altas dosagens de vitamina C promovem aumento e maior persistência da resistência de truta arco-íris contra *Vibrio anguillarum*, quando aliada à imunização com vacina, e por Li & Lovell (1985), que observaram que altas dosagens de vitamina C na dieta de bagre do canal aumentam a resistência contra *Edwardsiella ictaluri*. Liu *et al.* (1989) demonstraram que o bagre do canal alimentado com 1.000 mg de vitamina C por kg de dieta apresentam uma DL – 50 para *E. ictaluri* 100 vezes maior que peixes privados de vitamina C, contrariamente aos resultados obtidos por Li *et al.* (1993), que mostraram que elevadas dosagens de vitamina C não são efetivas para assegurar a resistência contra *E. ictaluri*.

Hardie *et al.* (1991) demonstraram que salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com baixos níveis de vitamina C apresentava menor resistência à infecção por *Aeromonas salmonicida* do que peixes sob dietas mais suplementadas. Gapasin *et al.* (1998) observaram o aumento da resistência ao estresse por salinidade em “milkfish” (*Chanos chanos*) alimentados com dietas enriquecidas com vitamina C.

2.7. Sinais de deficiência

Os principais sinais clínicos de deficiências de vitamina C em peixes são: reduzida taxa de crescimento, deformidades espinais – como lordose e escoliose, má formação do colágeno, exoftalmia, fragilização do sistema capilar, hemorragias intramusculares e externas, edemas, anemia, perda de apetite, redução da cicatrização e da resistência imunológica (Wilson & Poe, 1973; Andrews & Murai, 1975; Lim & Lovell, 1978; Post, 1987; Lee *et al.*, 1998; Tacon, 1991). Outros sintomas como anorexia, movimentos convulsivos e irritabilidade (Mahajan & Agrawal, 1980), erosão da nadadeira caudal (Lim & Lovell, 1978 e Soliman *et al.*, 1986a), letargia e empalidecimento das brânquias (Navarre & Halver, 1989), deformidades no opérculo e nas lamelas das brânquias (Roberts & Bullock, 1989 e Gapasin *et al.*, 1998), escurecimento da pele e aumento da taxa de mortalidade (Teskeredzic *et al.*, 1989) também são associados a deficiências dietéticas de vitamina C. Os sinais subclínicos foram enumerados por Halver (1985) e abrangem as baixas concentrações de ácido ascórbico no fígado e no rim anterior, má formação do tecido cartilaginoso de suporte dos olhos, brânquias e nadadeiras, baixa taxa de triiodotironina (T_3) no soro sanguíneo e altas taxas de colesterol e triglicerídeos no plasma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, conduzidos em fases sucessivas. A primeira fase consistiu no ensaio de valor biológico das dietas e teve duração de 105 dias (15 semanas). A segunda fase consistiu do ensaio de indução à hipoxia e teve duração de 48 horas. Os experimentos foram desenvolvidos no interior de uma estufa dotada de um sistema de recirculação por filtragem mecânica da água, localizada no Setor de Piscicultura, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

3.1. Ensaio 1

Alevinos de piauçu *Leporinus obtusidens*, obtidos através de técnicas de propagação artificial pelo Projeto Pacu, Campo Grande, MS, foram alojados em caixas de 1.000 litros, onde passaram por um período de adaptação, recebendo uma dieta farelada de 40% de proteína bruta. Este período pré-experimental constou do tempo necessário para que não se registrasse mais mortandade no plantel, e teve a duração de 3 dias.

Em seguida os peixes foram contados, anestesiados com benzocaína na proporção de 1:20.000 (1 grama de anestésico para 20 litros de água), pesados em balança digital, e estocados em caixas de cimento amianto com capacidade de 500 L, com

um volume útil fixado em 250 L, na densidade de 20 peixes por caixa. Cada caixa correspondeu a uma unidade experimental, sendo os tratamentos distribuídos aleatoriamente às caixas num delineamento inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e três repetições.

Foram utilizadas dietas experimentais isoprotéicas (35% de P.B.) e isoenergéticas (3.200 kcal/kg), formuladas com os mesmos ingredientes (Tabela 1), mantendo ainda os mesmos níveis de suplementação vitamínica e mineral, apenas variando o enriquecimento com vitamina C.

Tratamento 1 (TCO): controle (sem enriquecimento com vitamina C).

Tratamento 2 (T050): 50 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 3 (T150): 150 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 4 (T250): 250 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 5 (T350): 350 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 6 (T450): 450 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 7 (T550): 550 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 8 (T650): 650 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 9 (T750): 750 mg de vitamina C por kg de ração.

Tratamento 10 (T850): 850 mg de vitamina C por kg de ração.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.

Alimentos	Quantidade (%)
Milho moído	32,70
Farelo de soja	34,50
Farinha de peixe	30,00
Óleo de soja	2,80
Pré-mistura mineral	0,1
Pré-mistura vitamínica	0,3

Os ingredientes utilizados na formulação das dietas foram peneirados manualmente em peneira de malha de 1 mm. Após a mistura manual dos ingredientes

básicos (farinha de peixe, farelo de soja e milho moído), adicionou-se o óleo de soja, as pré-misturas mineral e vitamínica e a vitamina C, separadamente, nesta ordem. A forma de vitamina C utilizada foi o L-ácido ascórbico Merck® (M = 176,13 g/mol). A composição das pré-misturas mineral e vitamínica está representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição das pré-misturas mineral e vitamínica utilizados nas dietas.

Mistura mineral	Quantidade/1000g de produto
Iodo (I)	1.500 mg
Cobalto (Co)	1.000 mg
Cobre (Cu)	10.000 mg
Zinco (Zn)	100.000 mg
Ferro (Fe)	100.000 mg
Manganês (Mn)	40.000 mg
Mistura vitamínica	
Vitamina A	15.000.000 UI
Vitamina D3	1.500.000 UI
Vitamina E	60.000 UI
Vitamina K3	3.000 mg
Vitamina B1 (tiamina)	3.000 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	8.000 mg
Vitamina B6 (piridoxina)	4.000 mg
Vitamina B12 (cianocobalamina)	40 mg
Ácido nicotínico	40.000 mg
Ácido pantotênico	20.000 mg
Ácido fólico	1.500 mg
Biotina	150 mg

Para o processo de granulação das dietas, as misturas receberam 40% de água e foram moldadas em um moedor de carne industrial da marca CAF Modelo 22 S. Os grânulos eram quebrados manualmente e submetidos a secagem em bandejas de metal, à sombra e sob ventilação forçada por 48 horas. Após secagem as dietas eram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e conservadas em super congelador.

Inicialmente, durante um período de 10 dias, foi aproveitado o pó originado do peneiramento da ração granulada – partículas de aproximadamente 1 mm, pois os peixes eram incapazes de capturar os grânulos alimentares intactos. A partir do décimo primeiro dia, a ração granulada foi triturada, originando grânulos de aproximadamente 2 milímetros de comprimento médio, que foram utilizados até a oitava semana do ensaio (1^a

biometria), quando passaram a ser utilizados os grânulos originais, de aproximadamente 5 milímetros de comprimento médio.

O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia, à vontade, quando também era monitorada a temperatura da água. A ração era adicionada em um anel flutuante de 12 centímetros de diâmetro a fim de evitar deriva excessiva dos grânulos, que flutuavam inicialmente, e passavam a afundar lentamente.

Os peixes mortos eram coletados das caixas na ocasião do manejo alimentar, contados e imediatamente examinados visualmente para detecção de eventuais sinais clínicos característicos de deficiência de vitamina C. Em cada caixa foram alojados dois cascudos (*Plecostomus sp.*), peixes detritívoros que consumiam a matéria orgânica gerada pelos restos de alimento e fezes dos peixes. Em adição, as caixas eram sifonadas três vezes por semana para eliminação da matéria orgânica e do “perifiton” acumulado nas paredes.

Quinzenalmente era realizado tratamento preventivo com a aplicação de uma solução de 0,1 ppm de verde de malaquita, a fim de evitar a infestação de ectoparasitas (Andrews *et al.*, 1988; Post, 1987). A partir do mês de abril, a queda da temperatura média da água das caixas exigiu a instalação de aquecedores individuais (marca Seven Star; modelo Aquarium Quartz Heater SH 3300) em cada uma das caixas, com o objetivo de manter a temperatura da água em níveis que não comprometessem o consumo de ração pelos peixes.

Foram realizadas duas biometrias – 8 semanas e final. Todos os peixes de cada uma das unidades experimentais eram capturados, contados, sedados com benzocaína na concentração de 1:20.000, pesados e a média de peso do lote era calculada. Os índices utilizados para avaliação do desempenho dos tratamentos foram: ganho de peso no período 1 (GP-I), ganho de peso no período 2 (GP-II), ganho de peso no período total (GP-T) e taxa de sobrevivência no período total (S%).

Os resultados foram submetidos a análise estatística através do “Proc npar1way” do SAS, ou análise estatística não paramétrica, sendo utilizado teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias. De acordo com Siegel (1956) a análise de

variância “one-way” por Kruskal-Wallis é bastante útil para determinar se amostras independentes pertencem a diferentes populações. Esta técnica testa a hipótese da nulidade que as amostras vêm da mesma população ou de populações idênticas com respeito às médias, que não apresentam distribuição normal (Campos, 1979).

3.4. Ensaio 2

Após o encerramento do Ensaio 1, os peixes foram reagrupados, por tratamento, em dez caixas de 250 litros, e iniciaram um novo período de adaptação, que teve a duração de cinco dias. Durante este período, os peixes receberam as dietas respectivas de cada tratamento, duas vezes ao dia, à vontade. Em seguida, os peixes foram estocados em grupos de 10 indivíduos em gaiolas de tela de polietileno de malha 5 milímetros, com volume útil de 20 litros, dotados de tampa. Foram colocadas três gaiolas em cada uma das caixas de 250 litros, totalizando 30 unidades experimentais agrupadas em blocos casualizados.

De acordo com Steffens (1989) a taxa metabólica serve para medir o grau de atividade dos peixes e pode ser classificada em três categorias: metabolismo basal (sem influência externa), metabolismo de rotina (ausência de fatores estressantes) e metabolismo de atividade (digestão de alimentos e realização de esforços extremos). Assim, o ensaio foi realizado em completo jejum, a fim de que os peixes mantivessem uma atividade metabólica de rotina, permitindo uma melhor padronização na medição do consumo de oxigênio pelos peixes.

A renovação de água foi totalmente interrompida de modo que a concentração de oxigênio dissolvido na água caísse a níveis considerados estressantes, a fim de testar a resistência dos peixes ao estresse por hipoxia induzida. O experimento teve duração de dois dias, período suficiente para que as caixas apresentassem níveis de oxigênio dissolvido na água em torno de 0,5 mg/L.

Durante este período, a temperatura e o nível de oxigênio dissolvido na água foram monitorados constantemente através da utilização de um oxímetro digital da marca

Mettler Toledo, modelo MO 128. Foi também estudada a taxa de sobrevivência dos diferentes tratamentos. Para tanto, à medida que ocorria mortandade, os dados eram anotados, com a numeração das respectivas gaiolas, caixas e horário.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio 1

Não foram observadas manifestações clínicas de deficiência de vitamina C durante praticamente todo o período experimental. Os únicos sintomas observados foram lordose e escoliose mas, mesmo assim, em poucos peixes e somente ao final do período experimental, não tendo relação aparente com o nível de suplementação da dieta.

A variação da temperatura da água durante o período experimental pode ser observada através da Figura 1. As médias de desempenho, no que se refere ao ganho de peso nos períodos GP-I, GP-II e total, bem como à taxa de sobrevivência são apresentadas na Tabela 3.

Figura 1. Variação da temperatura média da água das caixas durante o ensaio 1.

Tabela 3 – Médias de desempenho (GP-I, GP-II, GP-T e S%) dos alevinos sob os diferentes tratamentos.

Tratamento	GP-I (g)	GP-II (g)	GP-T (g)	Sobrevivência (%)
TCO	10,86 ± 1,50	3,95 ± 0,53	14,81 ± 1,69	90,00 ± 19,15
T050	11,53 ± 1,62	3,56 ± 1,28	15,08 ± 1,61	91,67 ± 4,71
T150	12,24 ± 1,99	3,81 ± 0,93	16,05 ± 2,81	83,33 ± 10,27
T250	10,96 ± 0,31	3,05 ± 1,65	14,01 ± 2,18	80,00 ± 7,07
T350	10,16 ± 1,54	3,57 ± 1,29	13,72 ± 0,38	83,33 ± 14,34
T450	9,20 ± 1,40	2,13 ± 0,68	11,33 ± 0,70	80,00 ± 12,24
T550	10,26 ± 1,57	2,27 ± 1,11	12,53 ± 2,64	98,33 ± 2,36
T650	10,79 ± 3,52	3,51 ± 1,99	14,30 ± 5,47	86,67 ± 10,27
T750	10,68 ± 0,68	3,37 ± 0,84	14,06 ± 1,35	91,67 ± 2,36
T850	11,64 ± 0,25	3,88 ± 1,20	15,52 ± 1,43	93,33 ± 4,71

Segundo Campos (1979) as pressuposições do teste estatístico utilizado – Kruskal-Wallis, a respeito do tipo de distribuição das observações, são: todas as observações são independentes; dentro de uma amostra, as observações são provenientes da mesma população; as populações são da mesma forma e contínuas. Desse modo, os resultados da aplicação do teste de Kruskal-Wallis para GP-I – $P > 0,7176$; para GP-II – $P > 0,7306$; para GP-T – $P > 0,4054$; e para S% – $P > 0,5657$, revelam que não foram observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

4.2. Ensaio 2

O nível de oxigênio dissolvido na água (OD) atingiu 1,0 mg/L ou menos em quase todas as caixas às 20:50 h do segundo dia do ensaio. Isso significa que, até o final do experimento, níveis de OD permaneceram abaixo de 1,0 mg/L por 14 horas. Durante o ensaio foi possível observar que os peixes apresentavam aceleração dos batimentos das nadadeiras e opercular, devido ao aumento da atividade muscular. Ao final do ensaio, os peixes remanescentes em cada uma das gaiolas foram contados, e as médias das taxas de sobrevivência de cada tratamento estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias das taxas de sobrevivência dos tratamentos após indução de hipoxia.

Tratamento	Taxa de sobrevivência (%)
TCO	100,00 $\pm$ 0,00
T050	100,00 $\pm$ 0,00
T150	96,67 $\pm$ 4,71
T250	96,67 $\pm$ 4,71
T350	96,67 $\pm$ 4,71
T450	96,67 $\pm$ 4,71
T550	90,00 $\pm$ 8,16
T650	100,00 $\pm$ 0,00
T750	100,00 $\pm$ 0,00
T850	100,00 $\pm$ 0,00

Os dados relacionados na Tabela 4 não apresentam distribuição normal, o que justifica, novamente, a utilização de um teste não-paramétrico para comparação de médias como é recomendado por Campos (1979). Assim, os dados foram submetidos ao mesmo tipo de análise utilizada no Ensaio 1, análise não paramétrica (“Proc npar1way” do SAS) por Kruskal-Wallis, não sendo constatada diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,4032$), no que se refere a taxa de sobrevivência após indução de hipoxia.

5. DISCUSSÃO

5.1. Ensaio 1

De acordo com Akiyama (1991) os resultados de um experimento de nutrição de peixes dependem de fatores como: espécie, idade, estado fisiológico dos animais, condições experimentais, delineamento experimental, composição e qualidade da dieta e processamento. Assim, a heterogeneidade na forma de condução das diversas pesquisas pode levar a resultados e conclusões diferentes para trabalhos similares.

Os níveis de suplementação de vitamina C testados neste experimento (50 a 850 mg/kg) encontram-se na faixa de níveis recomendados para a grande maioria das espécies de peixes cultivados no mundo, que de acordo com Tacon (1991) variam de 10 a 1.250 mg/kg. É comum, em literatura, encontrar recomendações em torno de 50 mg de vitamina C por quilograma de dieta, para espécies como bagre do canal (Andrews & Murai, 1975; Lim & Lovell, 1978 e Li *et al.*, 1998), tilápia (NRC, 1993) e até para pacu (Castagnolli *et al.*, 1994). Entretanto, a determinação das exigências de ácido ascórbico, podem estar relacionadas à presença de fatores estressantes, taxa de crescimento, tamanho do animal e outros nutrientes (Halver, 1989), que podem variar bastante de um experimento para outro.

Como foi possível observar neste experimento, outro fator importante para determinar o nível de suplementação adequado para dieta de peixes é a forma da vitamina C empregada na confecção da dieta. No presente estudo, a utilização de vitamina C na forma de L-ácido ascórbico possivelmente contribuiu para que as perdas de vitamina C das dietas fossem bastante elevadas.

A utilização de formas protegidas, como o ácido ascórbico revestido com polímero sintético, glicerídeo ou etilcelulose (Shelbaek *et al.*, 1990) e, principalmente, de formas mais estáveis como ascorbato-2-monofosfato ou ascorbato-2-polifosfato, teria sido uma alternativa para conservar os níveis de vitamina C mais próximos do nível desejado (El Naggar & Lovell 1991a; Mustin & Lovell, 1992; Gadient & Schai, 1994; Gadient & Fenster, 1994; Phromkunthong *et al.*, 1994; Woodward, 1994, Abdelghany, 1998 e Kubitz *et al.*, 1998). Contrariamente, apenas Brandt *et al.* (1985) concluíram que, apesar destes produtos poderem ser empregados como fontes alternativas, não há diferença no que diz respeito ao crescimento dos peixes, em relação ao uso de L-ácido ascórbico em comparação às outras fontes recomendadas.

Devido ao tamanho inicial reduzido dos peixes utilizados, a dieta foi administrada inicialmente na forma farelada ou triturada, o que possivelmente aumentou as perdas de vitamina C por lixiviação. Fato semelhante foi observado por Mahajan & Agrawal (1980) que creditaram o aumento das perdas de vitamina C ao pequeno tamanho de partículas utilizados em estudo conduzido pelos autores. Além disso, o fato de a ração ter passado pelo processo de granulação com adição de água, pode ter contribuído para que ocorressem perdas consideráveis de vitamina C, primeiro por lixiviação, depois devido ao aumento da temperatura pelo que passam os ingredientes no processo. Este aumento de temperatura, embora discreto, pode ter contribuído para inativação de parte da vitamina C adicionada, uma vez que a fonte utilizada é termolábil. Nossas observações encontram suporte nas afirmações de Lovell & Lim (1978) para quem, após a granulação da dieta, apenas 73% do ácido ascórbico na forma não-protetida (L-ácido ascórbico) é retido no material granulado.

Soliman *et al.* (1986a) demonstraram que a retenção de L-ácido ascórbico após o processamento e o armazenamento por oito semanas é de no máximo 33,5%. Assim sendo, com base nestas considerações e apenas para exemplificar, o tratamento com maior nível de suplementação (850 mg/kg) apresentaria aproximadamente 620 mg de vitamina C por quilograma de dieta após o processamento, e em torno de 285 mg de vitamina C por quilograma de dieta após o armazenamento por oito semanas. Em adição, se considerarmos os resultados de Soliman *et al.* (1994), que mostram que dietas com menores níveis de suplementação apresentam perdas de vitamina C proporcionalmente maiores, variando de 20 a 44,7%, podemos afirmar que as dietas, principalmente aquelas de níveis de suplementação mais baixo, apresentavam uma quantidade de vitamina C bastante reduzida.

Foi também possível notar que o consumo da ração pelos peixes não ocorria imediatamente após o seu fornecimento (os animais quase sempre esperavam que o tratador se afastasse para iniciar a captura dos grânulos). Esse tempo de contato da dieta com a água pode ter sido suficiente para promover perdas consideráveis de vitamina C, que é hidrossolúvel. Essa inferência é fundamentada na afirmativa de Tacon (1991), que menciona que um dos fatores que contribuem para as perdas de ácido ascórbico é a lixiviação que ocorre quando a ração entra em contato com a água. Além disso, as perdas de vitamina C de uma dieta podem chegar a 66% num período de apenas 30 segundos após contato com a água (Pannevis & Earle, 1994). Durante este experimento, este período alcançava alguns minutos.

Trabalhos de Andrews & Murai (1975), Lim & Lovell (1978) Soliman *et al.* (1986a), Navarre & Halver (1989), Phromkunthong *et al.* (1994) e Li *et al.* (1998) mostraram não haver diferenças significativas entre os tratamentos utilizados, como ocorreu em nosso estudo, porém, na maioria deles, os tratamentos testados apresentavam diferenças em relação ao grupo controle. Estas observações contrariam os resultados aqui obtidos, onde o grupo privado de vitamina C não apresentou desempenho inferior aos outros tratamentos, no que se refere a ganho de peso e taxa de sobrevivência.

Um comportamento semelhante foi observado em relação ao aparecimento de sinais de deficiência nos diversos tratamentos avaliados. Na maior parte dos trabalhos publicados na área (Wilson & Poe, 1973; Lim & Lovell, 1978; Soliman *et al.* 1986a; Navarre & Halver, 1989; Phromkunthong *et al.*, 1994) foi observada a ocorrência de sinais de deficiência de vitamina C no grupo controle, enquanto peixes que receberam dietas suplementadas com vitamina C não apresentaram sinais clínicos de deficiência. Em contrapartida, em nosso estudo, até mesmo no grupo controle, não foram observadas manifestações de deficiências nutricionais através de sinais clínicos, da mesma forma que ocorreu com o experimento de Li *et al.* (1998).

Os únicos sinais característicos de deficiência de vitamina C observados durante o período experimental foram o aparecimento de lordose e escoliose em alguns exemplares. Esta mesma sintomatologia foi associada à deficiência de vitamina C por Wilson & Poe (1973); Andrews & Murai (1975); Lim & Lovell (1978); Post (1987); Lee *et al.* (1998); Liu *et al.* (1989) e Tacon (1991). Entretanto, neste experimento, a existência de alguns animais com lordose e escoliose pode ser explicada pelo comportamento dominante de alguns animais sobre outros da mesma população, impedindo que estes tivessem oportunidade de ingerir a quantidade de alimento suficiente, que pudesse lhes garantir suprimento adequado de vitamina C, o que não permite que a ocorrência destes sinais possa ser associada ao nível de suplementação de cada tratamento.

Uma dificuldade em apontar corretamente as exigências de vitamina C pelo piaçu é o fato desta ser uma espécie onívora, mas com adaptações do seu hábito alimentar entre detritívoro e bentófago. De acordo com Kubitz (1998a) o piaçu tem capacidade de aproveitar resíduos orgânicos, fezes de outros peixes e algas, que podem ter contribuído para o fornecimento de nutrientes aos peixes.

Essa dificuldade é ainda maior se levarmos em conta o fato de a água usada na estufa ser reutilizada, num sistema de recirculação que contava apenas com um mecanismo de remoção de sólidos em suspensão (“baffles”), o que permitiu que esta água contivesse uma quantidade suficiente de organismos planctônicos que teriam contribuído

para o fornecimento de micronutrientes, entre estes a vitamina C, aos peixes. Durante o experimento pôde-se observar, principalmente no tanque de sedimentação onde está localizado o removedor de sólidos, que a água apresentava uma coloração de tom esverdeado, mesmo com a ação dos cascudos e com o sifonamento regular das caixas.

A baixa taxa de crescimento observada, principalmente em GP-II (Tabela 3), quando houve uma queda brusca da temperatura da água (Figura 1), pode ter contribuído para reduzir as diferenças entre os tratamentos. Isso porque, talvez, com o aumento do consumo de ração, os tratamentos que receberam maior suplementação de vitamina C poderiam ter proporcionado um desempenho melhor, aumentando a diferença em relação aos tratamentos que receberam menor suplementação. Outro fator que poderia ter contribuído para aumentar o consumo de ração seria a realização de uma ou duas refeições diárias adicionais.

Uma hipótese que poderia explicar a igualdade entre os tratamentos seria a quantidade de vitamina C contida em cada um dos ingredientes utilizados na formulação. A dieta era constituída de 30% de farinha de peixe, 32,7% de milho e 34,5% de farelo de soja. A soma dos teores de vitamina C contidos nestes ingredientes pode ter sido suficiente para atingir o nível de vitamina C exigido pela espécie. Entretanto, essa suposição é pouco consistente, já que a vitamina C é termolábil e os ingredientes utilizados são obtidos através de processos que envolvem temperaturas bastante elevadas – *e.g.* processo de cozimento e secagem da farinha de peixe e tratamento térmico para inativação de compostos anti-nutricionais do farelo de soja (Pezzato, 1995).

5.2. Ensaio 2

Muitos autores demonstraram que a utilização de megadoses de vitamina C na dieta é útil para reduzir o efeito de diversos tipo de estresse, com destaque para a hipoxia, bem como a incidência de doenças. Entretanto, neste experimento não foi possível observar qualquer influência da vitamina C sobre a resistência ao estresse causado por baixos níveis de oxigênio na água.

Boyd (1996) apresenta uma classificação para a reação de espécies de peixes tropicais à hipoxia em tanques de piscicultura: acima de 5 mg/L – nível ideal; entre 1 e 5 mg/L – crescimento lento; entre 0,3 e 1 mg/L – exposição prolongada pode ser letal; e entre 0 e 0,3 mg/L – morte em período de exposição curto. Entretanto, neste experimento, a exposição dos peixes de qualquer dos tratamentos a níveis de OD de 1,0 mg/L ou menores, por um período de até 14 horas, não causou o aumento da mortalidade dos animais. Isso permite inferir que a espécie pode suportar baixos níveis OD por várias horas, apresentando boa resistência ao transporte, como afirma Kubitza (1998b).

De acordo com Henrique *et al.* (1996) a intensidade de alteração de um certo parâmetro fisiológico varia com a espécie, com o fator estressante, com o tempo de exposição a este fator e com a capacidade da espécie de se adaptar ao fator estressante. Assim, é correto inferir que a intensidade do fator estressante considerado – baixos níveis de OD na água, foi insuficiente para causar mortalidade dos peixes. Embora não tenham sido observadas variações neste parâmetro tomado como variável para avaliação do desempenho dos tratamentos, provavelmente ocorreram outras alterações fisiológicas nos peixes, as quais não foram avaliadas, mas que puderam ser detectadas pela observação da ocorrência de reações que fazem parte do estágio de resistência contra o estresse dos peixes, como aumento da atividade muscular e do ritmo de batimentos operculares.

Portanto, para avaliar a intensidade da resposta fisiológica do piaçu aos baixos níveis de oxigênio na água e relacioná-los ao nível de suplementação da dieta com vitamina C, seria necessário a aplicação de técnicas bioquímicas que envolveriam processos bastante complexos não disponíveis nas condições em que foram realizados os ensaios aqui descritos. De acordo com Adams (1990) o emprego de técnicas que determinam a variação de indicadores biológicos para avaliar os efeitos do estresse têm como principal limitação a necessidade do uso de equipamentos de alto custo e que exigem treinamento adequado para operação.

Com emprego destas técnicas seria possível realizar a determinação das variações dos níveis de cortisol e de glucose no plasma sanguíneo (Thomas & Robertson, 1991 e Li *et al.*, 1998) e, ainda, níveis de proteína e triglicerídeos plasmáticos, glicogênio

hepático e muscular (Henrique *et al.* 1996), as quais consistem de eventos que ocorrem anteriormente à morte dos peixes como sintetizado por Costa (1998).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo foi importante para mostrar que nas condições em que foi desenvolvido, a suplementação de vitamina C, de 50 a 850 mg/kg, não apresenta influência significativa no ganho de peso e na taxa de sobrevivência de alevinos de piaçu. Entretanto, novos estudos são necessários para que se possa obter uma definição do nível de suplementação adequado em dietas para a espécie. Por outro lado, para que estes trabalhos possam apresentar resultados mais consistentes, alguns procedimentos devem ser realizados:

- utilizar como fonte de vitamina C uma forma mais estável do que o L-ácido ascórbico, como é o caso do ascorbil monofosfato e do ascorbil polifosfato;
- realizar análise bromatológica dos ingredientes e das dietas experimentais no que se refere a ácido ascórbico;
- utilizar água livre de matéria orgânica e outros nutrientes que possam colaborar para amenizar eventuais deficiências nutricionais;
- realizar as determinações de parâmetros fisiológicos que determinam a ocorrência de estresse para poder relacioná-lo aos níveis de vitamina C das dietas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGHANY, A. E. Feed efficiency, nutrient retention and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., fed diets containing L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulphate or L-ascorbyl-2-polyphosphate. **Aquaculture Research**, v. 29, p. 503 - 510, 1998.
- ADAMS, S. M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. In: ADAMS, S. M. (Ed.) **Biological indicators of stress in fish**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p. 1 - 8. (American Fisheries Symposium, 8).
- AKIYAMA, D. M. Future considerations for the aquaculture feed industry. In: AQUACULTURES FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, Singapore, 1991. **Proceedings**. Singapore: American Soybean Association, 1991. p.5 - 9.
- ALBREKTSSEN, S.; LIE, O, SANDNESS, K. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v. 71, p. 359 - 368, 1988.
- ANDREWS, C.; EXELL, A.; CARRINGTON, N. **The manual of fish health**. Blacksburg: Tetra Press, 1988. 208 p.

- ANDREWS, J. W.; MURAI, T. Studies on the vitamin C requirements of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **The Journal of Nutrition**, v. 105, p. 557 - 561, 1975.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A. de; BONA FILHO, A. **Nutrição animal**; As bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos. São Paulo: Nobel, 1988. 395 p.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Hatyai: Shrimp Mart, 1996. 482 p.
- BRANDT, T. M.; DEYOE, C. W.; SEIB, P. A. Alternate sources of vitamin C for channel catfish. **The Progressive Fish Culturist**, v. 47, p. 55 - 59, 1985.
- BROWN, E. E.; GRATZEK, J. B. **Fish farming handbook**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1980. 391 p.
- CAMPOS, H. de. **Estatística experimental não-paramétrica**. 3. ed. Piracicaba: ESALQ, Depto. Matemática e Estatística, 1979. 343 p.
- CASTAGNOLLI, N.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. do N. Efeitos da suplementação de vitamina C na nutrição do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 8.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3., Piracicaba, 1994. **Resumos**. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 48.
- COSTA, A. B. Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., Piracicaba, 1998. **Anais**. Campinas: CBNA, 1998. p. 73 - 96.
- CYRINO, J. E. P.; CARNEIRO P. C. F., BOZANO, G. L. N.; CASEIRO, A. C. Desenvolvimento da Criação de Peixes em Tanques-Rede: Uma análise dos fundamentos, viabilidade e tendências, baseada em experiências bem sucedidas no Sudeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10., Recife, 1998. **Anais**. Recife: Capítulo Sul-Americano da World Aquaculture Society. 1998. p. 409 - 433.
- DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. **Experientia**, v. 52, p. 97 - 100. 1996a.

- DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. The dynamics of gonad growth and ascorbate status in yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). **Aquaculture Research**, v. 27, p. 539 - 542, 1996b.
- DE SILVA, S. S.; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995. 319 p.
- DUNCAN, P. L.; LOVELL, R. T. Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, for growth, hematopoiesis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection. **Aquaculture**, v. 127, p. 233 - 244, 1994.
- DURVE, V. S.; LOVELL, R. T. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 39, p. 948 - 951, 1982.
- EL NAGGAR, G. O.; LOVELL, R. T. Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentrations of ascorbic acid in channel catfish. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 22, p. 201 - 206, 1991a.
- EL NAGGAR, G.O.; LOVELL, R. T. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. **The Journal of Nutrition**, v. 121, p. 1622 - 1626, 1991b.
- FRACALOSSI, D. M. Doenças nutricionais em peixes. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., Piracicaba, 1998. **Anais**. Campinas: CBNA, 1998. p. 97 - 122.
- FRANCIS-FLOYD, R. **Stress: its role in fish diseases**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, s. d. 4 p. (Circular, 919)
- GADIENT, M.; FENSTER, R. Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded fish feeds. **Aquaculture**, v. 124, p. 207 - 211, 1994.
- GADIENT, M.; SCHAI, E. Leaching of various vitamins from shrimp feed. **Aquaculture**, v. 124, p. 201 - 205, 1994.

- GAPASIN, R. S. J.; BOMBEO, R.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; NELIS, H. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. **Aquaculture**, v. 162, p. 269 - 286, 1998.
- GÉRY, J.; MAHNERT, V.; DLOUHY, C. Poissons Characoïdes non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysi). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 94, n. 2, p. 357 - 464, 1987.
- GHITTINO, P. Nutrition and fish diseases. In: HALVER, J. E. (Ed.) **Fish nutrition**. Washington: Academic Press, 1989. cap.13, p. 681 - 713.
- HALVER, J. E. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. In: COWEY, C. B.; MACKIE, A. M.; BELL, J. G. (Ed.) **Nutrition and feeding in fish**. London: Academic Press, 1985. p. 415 - 429.
- HALVER, J. E. The vitamins. In: HALVER, J. E. (Ed.) **Fish nutrition**. Washington: Academic Press, 1989. cap. 2. p. 31-109.
- HARDIE, L. J.; FLETCHER, T. C.; SECOMBES, C. J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 95, p. 201 - 214, 1991.
- HENRIQUE, M. M. F.; MORRIS, P. C.; DAVIES, S. J. Vitamin C status and physiological response of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to stressors associated with aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 27, p. 405 - 412, 1996.
- HEPHER, B.; PRUGININ, Y. **Commercial fish farming**. New York: John Wiley, 1981. 261 p.
- HILTON, J.W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, v. 79, p. 223 - 244, 1989.
- KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes**. Campo Grande: Projeto Pacu/Agropeixe, 1998a. 108 p.
- KUBITZA, F. **Técnicas de transporte de peixes**. Campo Grande: Projeto Pacu/Agropeixe, 1998b. 44 p.

- KUBITZA, F.; CYRINO, J. E. P.; ONO, E. A. Current status and future perspectives for commercial fish feeds in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO ANIMAL E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, Campinas, 1998. **Anais**. Campinas: CBNA, 1998. p. 193 - 214.
- LEE, K. J.; KIM, K. W. ; BAI, S. C. Effects of different diet levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 237 - 244, 1998.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1991. 725 p.
- LI, M. H.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. **Aquaculture**, v. 117, p. 303 - 312, 1993.
- LI, M. H.; WISE, D. J.; ROBINSON, E. H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, p. 1 - 8, 1998.
- LI, Y.; LOVELL, R. T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **The Journal of Nutrition**, v. 115, p. 123 - 131, 1985.
- LIM, C.; LOVELL, R. T. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **The Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1137 - 1146, 1978.
- LIU, P. R.; PLUMB, J. A.; GUERIN, M.; LOVELL, R. T. Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 7, p. 191 - 194, 1989.
- LOVELL, R. T. Nutritional deficiencies in intensively cultured catfish. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.) **The pathology of fishes**. Madison: University of Wisconsin Press, 1975. cap. 29, p. 721 - 731.
- LOVELL, R.T. **Fish feed & nutrition**. Do pond-raised catfish need vitamin C? **Commercial Fish Farmer and Aquaculture News**, v. 3, n. 3, 1p. 1977.

- LOVELL, R. T. Nutrition of aquaculture species. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4193 - 4200, 1991.
- LOVELL, R. T.; LIM, C. Vitamin C in pond diets for channel catfish. **Transactions of American Fisheries Society**, v. 107, p. 321 - 325, 1978.
- LOVSHIN, L. L. Modelos de desenvolvimento em piscicultura: as experiências asiática e norte-americana. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, Piracicaba, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p. 31 - 44.
- MAHAJAN, C. L.; AGRAWAL, N. K. Nutritional requirement of ascorbic acid by indian major carp, *Cirrhina mrigala*, during early growth. **Aquaculture**, v. 19, p. 37 - 48, 1980.
- MASUMOTO, T.; HOSOKAWA, H.; SHIMENO, S. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition In: AQUACULTURES FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, Singapore, 1991. **Proceedings**. Singapore: American Soybean Association, 1991. p.42 - 48.
- MUSTIN, W. G.; LOVELL, R. T. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. **Aquaculture**, v. 105, p. 95 - 100, 1992.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of fish**. Washington: National Academy Press, 1993. 114 p.
- NAVARRE, O; HALVER, J. E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**, v. 79, p. 207 - 221, 1989.
- PANNEVIS, M. C.; EARLE, K. E. Nutrition of ornamental fish: water soluble vitamin leaching and growth of *Paracheirodon innesi*. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 2633S - 2635S, 1994.
- PEZZATO, L. E. Alimentos convencionais e não-convencionais disponíveis para indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, Campos do Jordão, 1995. **Anais**. Campinas: CBNA, 1995. p. 33 - 52.

- PHROMKUNTHONG, W.; BOONYARATPALIN, M.; PHIMONJINDA, T.; STORCH, V. Use of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as a dietary source of ascorbic acid for sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) (Centropomidae). **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 955 - 957, 1994.
- PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.) **Environmental and ecological biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1995. cap. 17. p. 349 - 379.
- POST, G. **Textbook of fish health**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1987. 288 p.
- ROBERTS, R. J.; BULLOCK, A. M. Nutritional Pathology. In: HALVER, J. E. (Ed.) **Fish nutrition**. Washington: Academic Press, 1989. cap. 8, p. 423 - 473.
- SHELBAEK, T.; ANDERSEN, N. G.; WINNING, M.; WESTERGAARD, S. Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. **Aquaculture**, v. 84, p. 335 - 343, 1990.
- SIEGEL, S. **Nonparametric statistics: for the behavioral sciences**. Tokyo: McGraw-Hill, 1956. 312 p.
- SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 52, p. 1 - 10, 1986a.
- SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture**, v. 59, p. 197 - 208, 1986b.
- SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 269 - 278, 1994.
- STEFFENS, W. **Principles of fish nutrition**. Chichester: Ellis Horwood, 1989. 348 p.
- TACON, A. G. J. Vitamin nutrition in shrimp and fish. In: AQUACULTURES FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, Singapore, 1991. **Proceedings**. Singapore: American Soybean Association, 1991. p. 11 - 41.

- TESKEREDZIC, Z.; TESKEREDZIC, E.; HACMANJEK, M. High mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry caused by deficiency of vitamins C and B₂ in commercial fish farms in Yugoslavia. **Aquaculture**, v. 79, p. 245 - 248, 1989.
- THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In: ADAMS, S. M. (Ed.) **Biological indicators of stress in fish**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p. 9 - 28. (American Fisheries Symposium, 8).
- THOMAS, P.; ROBERTSON, L. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69 - 86, 1991.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 21 - 36, 1994.
- WAAGBO, R.; THORSEN, T.; SANDNES, K. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v. 80, p. 301 - 314, 1989.
- WILSON, R. P. Fish feed formulation and processing. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, Campos do Jordão, 1995. **Anais**. Campinas: CBNA, 1995. p. 53 - 68.
- WILSON, R. P.; POE, W. E. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. **The Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1359 - 1364, 1973.
- WOODWARD, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. **Aquaculture**, v. 124, p. 133 - 168, 1994.