

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**LIPÍDEO E VITAMINA C EM DIETAS PRÁTICAS PARA A
TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus***

DARIO ROCHA FALCON

Zootecnista

Orientadora: Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Cleide da Rocha Falcon e Renato Sylvio Falcon,

Minha eterna gratidão, admiração

e respeito pelo exemplo de dedicação, simplicidade, carinho e amor aos valores da vida,...

Amo vocês

Aos meus irmãos, *Rodrigo e Renata* pelo apoio e

amizade durante todos esses anos

Ao meu tio *João*, pelo carinho,

inspiração e lição de vida

Aos meus avós *Oswaldo e Oleme*,

pelo constante incentivo,

carinho e amor

Ao meu pequeno sobrinho *Murilo*,

que trouxe alegria a toda família

A minha tia *Cleunice* e minha prima *Carina*,

pela amizade e incentivo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Margarida M. Barros, pela dedicação irrestrita, atenção, confiança e incentivo, amizade e ensinamentos;

Ao Professor Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela oportunidade e confiança, amizade, incentivo, sabedoria e exemplo profissional;

À Indústria de Rações Socil Guyomarc'H na pessoa do Zootecnista Denis Arroyo Alves, diretor de desenvolvimento e de compras, pela parceria, confiança, sugestões e apoio financeiro;

À minha namorada Karolina Von Zubem, pela dedicação, paciência e amor em todos os momentos;

À toda equipe do Laboratório de Nutrição de Peixes – AquaNutri; Juliana de Barros Valle, Fernanda G. Sampaio, Geisa K. Kleemann, Jeisson Ferrari, Hamilton Hisano, Marcelo Sá, Giovani Gonçalves, Leonardo Tachibana, Jener Alexandre Sampaio Zuanon, Alexandra Silva, Márcia Siqueira, William Narvaez e Edson Freire, pelo exemplo, amizade e auxílio na realização desse trabalho. União e respeito acima de tudo. Obrigado pelas experiências compartilhadas;

Às minhas amigas Fernanda Garcia Sampaio e Juliana de Barros Valle pela ajuda e pelos momentos compartilhados;

À Professora Elizabeth Criscuolo Urbinati pelas sugestões e colaboração para a realização desse trabalho, à técnica Damaris Roviero e aos alunos do Pós Graduação Janessa Sampaio de Abreu e Richard Philip Brinn - CAUNESP, Jaboticabal, pelo auxílio nas análises realizadas;

Ao professor Carlos Roberto Padovani, Departamento de Bioestatística, pela orientação, atenção e auxílio na realização das análises estatísticas;

Aos professores e funcionários do Departamento Melhoramento e Nutrição Animal pelo auxílio e amizade;

Aos Professores Dr. Luiz Carlos Vulcano do Departamento de Reprodução animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio na análise de radiografia e ao Dr. Pedro de Magalhães Padilha do Departamento de Química, pela orientação e auxílio nas análises químicas;

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação da FMVZ, Posto de Serviço Lageado, Carmen Sílvia de Oliveira Pólo e Seila Cristina Cassineli Vieira, pela amizade, atenção e auxílios prestados;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Botucatu, pela oportunidade e privilégio que tive em realizar a Graduação e o Mestrado em Zootecnia nesta instituição;

Aos meus amigos de república e faculdade, Marcio (Moscô), Leandro (Uerê), Galetti (Loco), Daniel (Prepúcio), Ricardo (Loid), Cauê (Albedo), Bruno (Belô), Danilo (Xanadu), Iguana, Mimada, Catota, Murici, Ibiara (Tilápia), Janaína (Tcheca), Daniela (Xerenca), Bongo e aos amigos da república Grão de Boi.

A todos os que de alguma maneira contribuíram com este trabalho...

OBRIGADO!!!!!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1. Ácido ascórbico.....	02
2. Estresse.....	14
3. Lipídeos.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
Figura 1. Via secundária do metabolismo da glicose através do UDP-glucuronato..	01
Figura 2. Efeitos primários e secundários do estresse em peixes.....	16
CAPÍTULO II	
LIPÍDEO E VITAMINA C EM DIETAS PARA A TILÁPIA DO NILO	
<i>Oreochromis niloticus</i> PREPARATÓRIAS PARA O INVERNO.....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão.....	53
Referências.....	64
Figura 1. Histograma da porcentagem média de colágeno nas vértebras de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas contendo diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.....	72
Figura 2. Rx do peixe arraçado com a dieta ausente de suplementação de lipídeo e vitamina C.....	73
Figura 3. Rx do peixe arraçado com a dieta suplementada com lipídeo e vitamina C.....	73
Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais.....	74

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas e da carcaça dos peixes.....	75
Tabela 3. Valores médios de ganho de peso por peixe (GPP), consumo aparente da dieta, conversão alimentar aparente (CAA), gordura visceral (GV) e índice de gordura visceral (IGV) de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.....	76
Tabela 4. Valores médios da porcentagem de extrato etéreo (EE) no filé, no fígado, concentração de vitamina C no fígado e índice hepatossomático (IHS) de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.....	77
Tabela 5. Valores médios de eritrócitos (Erit), hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.....	78

CAPÍTULO III

LIPÍDEO E VITAMINA C NA FORMAÇÃO, MOBILIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM TILÁPIA DO NILO <i>Oreochromis niloticus</i> SUBMETIDAS À BAIXA TEMPERATURA.....	79
Resumo.....	80
Abstract.....	81
1. Introdução.....	82
2. Material e métodos.....	84
3. Resultados e discussão.....	87
Referências.....	102

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.....	109
---	-----

Tabela 2. Valores médios inicial e final do peso, gordura visceral (GV) e índice de gordura visceral (IGV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C e submetidos à diminuição da temperatura da água.....	110
Tabela 3. Valores médios inicial e final de extrato etéreo do fígado (EE), concentração plasmática de triacilglicerol (TG) e consumo aparente da dieta de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C e submetidos à diminuição da temperatura da água.....	111
Tabela 4. Composição percentual dos ácidos graxos das dietas experimentais.....	112
Tabela 5. Composição percentual dos ácidos graxos do filé.....	113
Tabela 6. Composição percentual dos ácidos graxos da gordura visceral.....	114

CAPÍTULO IV

SUPLEMENTAÇÃO DE LIPÍDEO E VITAMINA C E AS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DA TILÁPIA DO NILO <i>Oreochromis niloticus</i> APÓS ESTRESSE TÉRMICO.....	115
Resumo.....	116
Abstract.....	117
Introdução.....	118
Material e métodos.....	120
Resultados e discussão.....	123
Referências.....	135
Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.....	142
Tabela 2. Valores médios de eritrócitos (Erit), hematócrito (Htc) e hemoglobina (Hb) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.....	143

Tabela 3. Número médio de volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.....	144
Tabela 4. Concentração média de vitamina C (Vit C) no fígado de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.....	145
Tabela 5. Concentração média de cortisol plasmático e glicose plasmática de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.....	146
 CAPÍTULO V	
IMPLICAÇÕES.....	147

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Ácido ascórbico

Devlin (1997) descreveu a vitamina C ou ácido ascórbico (AA) como composto de seis carbonos, estreitamente relacionado à glicose (Figura 1). O autor destacou diversas funções dessa vitamina hidrossolúvel como por exemplo, forte agente redutor em várias funções metabólicas: atua no processo de hidroxilação da prolina e lisina; age poupando as vitaminas lipossolúveis A, E e algumas do complexo B, protegendo-as da oxidação.

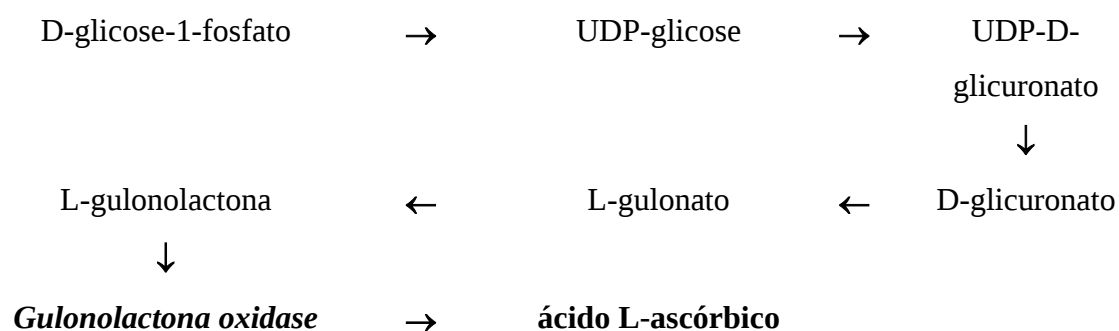


Figura 1. Via secundária do metabolismo da glicose através do UDP-glucuronato (adaptado de Lehninger et al., 1995)

Outras funções também estão descritas na literatura para a vitamina C. Lovell (1998) ressaltou a importância dessa vitamina na conversão do ácido fólico para ácido folínico e sua atuação no metabolismo da tirosina. A vitamina C promove também a síntese de carnitina a partir da lisina e da metionina (Miyasaki et al., 1995). Panush & Delafuente (1985) enfatizaram que essa vitamina possui habilidade de minimizar a quantidade de radicais livres decorrentes da respiração celular, evitando em parte a desestabilização da membrana lipídica.

Algumas espécies animais, dentre essas a maioria dos peixes (Albrektsen et al., 1988; Dabrowski & Moreau, 1996) não sintetizam a vitamina C em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase para sua síntese a partir da glucose (Lehninger et al., 1995; Wilson & Poe, 1973). Em função dessa característica essa vitamina deve ser

fornecida na ração em quantidades adequadas para suprir as necessidades metabólicas da espécie.

A vitamina C na sua forma natural, ácido ascórbico, é facilmente oxidada passando para a forma do ácido dehidroascórbico. Este composto por sua vez não possui grande afinidade para ser absorvido, podendo ser excretado (Bianchi et al., 1986; Buddington et al., 1993).

Segundo Tolbert et al. (1975) a vitamina C em meio neutro tendendo a alcalino torna-se muito susceptível à oxidação. O carbono dois do anel de lactona da vitamina C é o mais reativo e, conseqüentemente, fácil de se oxidar. Visando melhorar a estabilidade da vitamina C, esta pode ser química ou biologicamente alterada, podendo ser associada a outros elementos como por exemplo o fosfato, sulfato, sódio, magnésio, gorduras e etilcelulose, proporcionando proteção ao ácido ascórbico cristalino no interior da vitamina (Li & Robinson em Lim & Webster, 2001).

Assim, as diferentes formas de ácido ascórbico protegido, nada mais são que proteção ao carbono da posição dois. O ácido ascórbico polifosfatado (APP), originário da combinação dos grupamentos fosfatos com a cadeia carbônica da vitamina, possui grande estabilidade, permitindo a prevenção contra oxidação e conseqüente inativação (Tolbert et al., 1975).

Segundo Buddington et al. (1993) durante o processo de digestão, o ácido ascórbico protegido por um ou mais grupamentos fosfato, sofre hidrólise do grupamento fosfato principalmente na porção proximal do intestino, promovendo a liberação da vitamina em seu estado natural. Desta maneira, o ácido ascórbico possui grande afinidade de absorção, uma vez que é sódio dependente.

Os principais tecidos que armazenam ácido ascórbico nos peixes são o fígado, sangue, rim e pele (Halver, 1972). Segundo Hilton et al. (1978) a concentração dessa vitamina é influenciada diretamente pela concentração na dieta. El Naggar & Lovell (1991) e Guerin (1986), observaram que a concentração de ácido ascórbico no fígado de bagre do canal é representativa, alterando-se de acordo com o fornecido pela dieta.

O valor de 40 mg de vitamina C/kg da dieta prática foi determinado para evitar sinais clínicos de deficiência em truta arco-íris utilizando o ácido ascórbico protegido com etilcelulose (ECAA) como fonte de vitamina C (Hilton et al., 1978). Halver et al. (1969) determinaram valores de 40,0 a 100,0 mg AA/kg da dieta e Cho & Cowey

(1993), relataram que essa espécie exige valores menores que 10 mg de vitamina C/kg da dieta, para peixes com três gramas, utilizando o ácido ascórbico monofosfato (AMP) como fonte.

El Naggar & Lovell (1991) compararam o ácido ascórbico (AA), o L-ascorbil-2-monofosfato (AAP) e o L-ascorbil-2-sulfato (AAS) como diferentes fontes de suplementação de vitamina C para bagre do canal. Observaram que o AAP é 1,74 vezes mais eficiente que o AA na manutenção da concentração desta vitamina no fígado.

Abdelghny (1996) avaliaram o desempenho da tilápia do Nilo arraçoada com diferentes fontes de vitamina C, ácido L-ascórbico cristalino (AA), ácido L-ascórbico-2-sulfato (AS) e ácido 2-polifosfato (AAP). O AS e o AAP promoveram melhor ganho de peso e melhor conversão alimentar em relação ao AA, além de não demonstrar sinais de escorbuto. O melhor resultado de ganho de peso, conversão alimentar, porcentagem de sobrevivência e concentração de ácido ascórbico no fígado foi observado com o ácido 2-polifosfato.

Shiau & Hsu (1999) compararam a suplementação de vitamina C proveniente do L-ascorbil-2-monofosfato-Na (C2MP-Na) e do L-ascorbil-2-monofosfato-Mg (C2MP-Mg) para híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. Relataram que o C2MP-Mg possui 85,0% de eficiência em relação ao C2MP-Na e que os valores da concentração do ácido ascórbico nos tecidos aumentaram de acordo com o aumento da suplementação da dieta.

Segundo Devlin (1997), a vitamina C é necessária para a formação do colágeno, onde nos tecidos conectivos como ossos, cartilagens, dentina e dermes, exerce importância na formação da matriz orgânica (Bourne, 1946). Sua ação está no processo de hidroxilação da prolina e lisina para hidroxí-aminoácido agindo na conversão do pró-colágeno em colágeno, participando, portanto, na manutenção do tecido conjuntivo e processo de cicatrização. Segundo Gould (1958) a vitamina C participa da síntese do colágeno, conferindo assim maior resistência à fibra. Zanoni et al. (1982) e Lehninger et al. (1995) também destacaram a alta resistência à tensão, proporcionada pela proteína fibrosa do colágeno.

Wilson & Poe (1973) realizaram experimento com bagre do canal deficientes em vitamina C e com sinais característicos de escorbuto comparados a peixes sem deficiência. Observaram em relação a biosíntese de colágeno, que os peixes deficientes

apresentaram 42,0% a menos de colágeno em relação aos peixes normais, além de possuírem 13,0 e 15,0% a menos de hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente.

Lovell & Lim (1978) demonstraram que a suplementação de vitamina C em dietas para o bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, é necessária para prevenir contra a síndrome da coluna quebrada, deficiência característica da formação do colágeno. Também observaram diferença significativa na porcentagem de colágeno nas vértebras dos peixes arraçoados com dietas suplementadas quando comparado com os não suplementados; 26,1 e 23,8%, respectivamente. Em experimento com bagre africano, *Clarias gariepinus*, a suplementação também foi necessária para prevenir a síndrome da coluna quebrada, necessitando de no mínimo 46 mg de vitamina C/kg da dieta (Eya, 1996).

Al-Amoudi et al. (1992) avaliaram a suplementação de vitamina C (0,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0 mg de vitamina C/kg da dieta) em larvas de tilápia, *Oreochromis spilurus*, cultivadas em água do Mar Vermelho (40 ppt de salinidade). Concluíram que de 100,0 a 200,0 mg de vitamina C/kg da dieta são necessárias para se obter ótimo crescimento, e que a porcentagem de colágeno foi 31,8% inferior nos peixes que não receberam suplementação em relação ao tratamento que recebeu 150,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Halver et al. (1969) avaliando níveis de 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 ou 100,0 mg do ácido L-ascórbico por 100 g da dieta, para truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, e para salmão “coho”, *Oncorhynchus kisutch*, demonstraram que houve demora ou inibição do processo de cicatrização de ferimentos com a inclusão de baixos níveis de vitamina C. Concluíram que a quantidade de 100,0 mg AA/kg da dieta é necessária para o bom desempenho produtivo, porém níveis superiores devem ser acrescidos, às dietas, para determinar alta reserva em tecidos e rápida cicatrização.

Jauncey et al. (1985) testaram três níveis de suplementação de ácido ascórbico (0,0; 125,0 e 400,0 mg de vitamina C/100g da dieta), em relação à cicatrização de ferimento na musculatura da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Observaram processo de cicatrização acelerado nos peixes que receberam suplementação recomendada e acima desta, em relação aos peixes que receberam suplementação abaixo do recomendado. Segundo os autores este fato demonstrou a participação do ácido ascórbico na síntese de colágeno.

Estudos demonstraram que o ácido ascórbico possui influência na absorção, metabolismo e excreção de vários elementos minerais (Hilton, 1984). Atua no metabolismo do ferro como agente redutor transformando o íon ferro do estado férrico (Fe^{3+}) para a forma absorvível, ferroso (Fe^{2+}), liberando-o da proteína transportadora transferrina e da armazenadora, ferritina.

Maage et al. (1990) testando o efeito da suplementação de ácido ascórbico em dietas para o salmão do Atlântico, *Salmo salar*, em relação ao metabolismo de alguns minerais, destacaram a baixa concentração de ferro no fígado dos peixes que não receberam suplementação de ácido ascórbico. Andersen et al. (1998) avaliaram a inter-relação entre a vitamina C e ferro para salmão do Atlântico. Determinaram que a suplementação de ferro e de ácido ascórbico polifosfatado (APP) mantém a concentração hepática deste mineral, enquanto que a suplementação de ferro e ácido ascórbico etilcelulose (AAEC) determinou a redução significativa de ferro no fígado. A mesma correlação foi observada com a concentração hepática de vitamina C. Não foi determinada inter-relação significativa entre a vitamina C e ferro.

Lim et al. (2000) não observaram interação significativa entre o ácido ascórbico e o mineral ferro para o ganho de peso e conversão alimentar, porém foi significativa para a porcentagem de sobrevivência. Para os parâmetros sanguíneos a inter-relação foi significativa para número total de células, eritrócitos, hematócrito e hemoglobina. Observaram ainda significância para a concentração de ferro no fígado, porém não de vitamina C. Barros et al. (2002) avaliaram os efeitos dos níveis de vitamina C (125,0 375,0 e 1115,0 mg de vitamina C/kg da dieta) e níveis de ferro (30,0; 90,0 e 270,0 mg/kg da dieta) em dietas purificadas a base de albumina e gelatina para tilápia do Nilo por 73 dias. Não observaram inter-relação significativa da vitamina C e ferro nos parâmetros de desempenho produtivos e hematológicos.

A exigência de vitamina C, segundo Li & Robinson em Lim & Webster (2001) varia entre as espécies e também dentro da própria espécie. A linhagem, o tamanho e a idade também podem afetar a exigência. Pode-se acrescentar, ainda, o sistema de cultivo adotado. A literatura apresenta valores de exigência para várias espécies, que foram determinados objetivando o máximo desempenho produtivo e o aparecimento de sinais clínicos de deficiência.

Lovell & Lim (1978) observaram que bagres do canal estocados em baixas densidades (49 a 98 peixes/100m²) não necessitam de suplementação de vitamina C para obter bom desempenho em tanques escavados. O mesmo não ocorreu quando os peixes foram submetidos a altas densidades, 247 peixes/100m², necessitando de suplementação. Sugeriram, também, que para peixes produzidos em tanques-rede, onde altas densidades são utilizadas, é necessária a suplementação de vitamina C.

Para o bagre do canal, valores de exigência nutricional também estão descritos em função das diferentes fontes e tamanhos de peixes utilizados nos estudos. Andrews & Murai (1975) avaliaram peixes com tamanho inicial de 14,0 g e utilizam o ácido L-ascórbico cristalino (AA). Determinaram como exigência o valor de 25,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Esses mesmos autores estudaram peixes com peso médio inicial de dois gramas e demonstraram ser necessária a inclusão do dobro do valor anteriormente apresentado, ou seja, 50,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Para a tilápia azul, *Oreochromis aureus*, 50,0 mg de ácido L-ascórbico cristalino/kg da dieta foi determinado por Stickney et al. (1984) com peixes de 2,0 gramas, e para a tilápia híbrida, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, com 1,1 g foi determinado como exigência 79,0 mg de ácido L-ascórbico cristalino/kg da dieta. Para a espécie em estudo, ou seja, a tilápia do Nilo, Soliman et al. (1994) determinaram que a mesma necessita de 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Lim & Lovell (1978) testaram também o AA como fonte da vitamina para alevinos de bagre do canal e determinam que 60,0 mg de AA/kg da dieta foi necessário para o crescimento satisfatório. El Naggar & Lovell (1991) determinaram como exigência para alevinos da mesma espécie, 11,0 mg de vitamina C/kg da dieta para peixes de 13,0 g. Para peixes de 5,5 g foi recomendado 15,0 mg de APP/kg da dieta (Robinson, 1992).

Fracalossi et al. (1998) avaliaram níveis de suplementação de vitamina C (0,0; 25,0; 75,0 e 200,0 mg de vitamina C/kg da dieta) para Oscar, *Astronotus ocellatus*, e determinaram que o melhor nível de suplementação da vitamina para promover melhor crescimento, melhor conversão alimentar e evitar o aparecimento de sinais de clínicos de deficiência foi 25,0 mg de vitamina C/kg da dieta, não diferindo este nível significativamente para promover melhor crescimento dos níveis 75,0 e 200,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Martinez (1990) realizou experimento com o ciclídeo mexicano, *Cichlasoma urophthalmus*, e definiu que 40,0 mg de vitamina C/kg da dieta foi o mínimo necessário para manter o crescimento normal e que o mínimo para manter a boa saúde e prevenir doenças foi 110,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Estudos para a determinação da exigência nutricional dessa vitamina em diferentes temperaturas da água têm sido desenvolvidos. Durve & Lovell (1982) avaliaram a resistência do bagre do canal suplementado com ácido ascórbico nos níveis de 0,0; 30,0; 60,0 e 150,0 mg de vitamina C/kg da dieta e submetido a temperaturas de 23,0 e 33,0°C para ser desafiado com a bactéria *Edwardsiella tarda*. Observaram que a suplementação de 30,0 mg de vitamina C/kg da dieta foi o nível que melhor promoveu o crescimento e a formação de colágeno no bagre do canal, mas quando o peixe foi submetido ao desafio com a bactéria nas diferentes temperaturas, o nível de 150,0 mg de vitamina C/kg da dieta conferiu melhor resistência contra a infecção.

Sato et al. (1983) estudaram o efeito da temperatura da água sobre a deformação esquelética em trutas marrom, *Salmo trutta linnaeus*, alimentadas sem suplementação de vitamina C. Observaram taxa de deformidade esquelética maior nos grupos onde a temperatura passou de 16,0 para 20,0°C, em relação ao grupo controle mantido a temperatura constante de 20,0°C durante todo o experimento.

Li & Robinson (1994) estudaram o efeito da suplementação de vitamina C em relação à concentração da vitamina nos tecidos de bagre do canal submetidos às temperaturas de 31,0 e 10,0°C. Demonstraram que em duas semanas o fígado do peixe refletiu a quantidade suplementada na dieta, sendo esse o órgão que melhor caracteriza a concentração da vitamina C no peixe. Concluíram ainda que a concentração desta vitamina no fígado quando os peixes estão sob situação de estresse, tal como a passagem do verão para o inverno, cai drasticamente, sendo desta forma, importante manter a reserva dessa vitamina em períodos que antecedem a queda de temperatura.

Hwang & Lin (2002) avaliando o efeito de duas temperaturas (25,0 e 35,0°C) em relação à exigência de vitamina C para carpa comum, observaram que os valores de colágeno nas vértebras são superiores na temperatura de 25,0°C em relação a 35,0°C, independentemente da suplementação ou não de vitamina C. Concluíram também que o aumento da temperatura e a suplementação de vitamina C induzem decréscimo no nível de triglicerídeos plasmáticos.

Nitzan et al. (1996) estudaram o efeito da suplementação de ácido ascórbico polifosfatado (AAPP) em híbridos de tilápia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, submetidos a desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, e não constataram efeito significativo da suplementação em relação à porcentagem de sobrevivência. Neste mesmo experimento, também foi avaliado o efeito da suplementação dessa vitamina nos híbridos submetidos à temperatura de inverno, onde observaram tendência de maior ganho de peso nos peixes arraçoados com rações suplementadas em relação ao tratamento ausente de suplementação. O mesmo não ocorreu com a concentração dessa vitamina no fígado, sendo esta significativamente maior nos peixes que receberam suplementação. Blom & Dabrowski (2000) determinaram a suplementação de 360,0 mg de vitamina C/kg da dieta para acará bandeira, *Pterophylum scalare*, para manter o máximo estoque desta vitamina nos tecidos, proporcionando assim, maior sobrevivência dos peixes nos aquários.

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas objetivando avaliar a ação da vitamina C no sistema reprodutivo de peixes. Soliman et al. (1986) observaram o efeito da suplementação de vitamina C em reprodutores de tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, em relação à performance produtiva. Concluíram que a suplementação de vitamina C em reprodutores melhorou o desempenho das larvas nas primeiras semanas de vida, sendo que parte desta vitamina foi repassada para as larvas. Sandnes et al. (1984) testando o efeito da suplementação de vitamina C em reprodutores de truta arco-íris, observaram aumento do número e da qualidade dos ovos de truta suplementados com vitamina C em relação ao tratamento controle ausente de suplementação.

Dabrowski et al. (1988) em experimento com larvas de carpa comum, *Cyprinus carpio*, concluíram que a suplementação de vitamina C é necessária nesta fase para proporcionar bom desempenho. Para o salmão do Pacífico, *Oncorhynchus* spp., 50,0 mg AA/kg da dieta foi a exigência determinada por Halver et al. (1969). Para o “yellowtail”, *Seriola lalandi*, Shimeno (1991), determinou que são necessárias 122,0 mg de vitamina C/kg da dieta para alevinos.

Diversos sinais clínicos, da ausência ou insuficiência de suplementação do ácido ascórbico, estão descritos na literatura, em função da ampla participação metabólica dessa vitamina. Pode-se listar por exemplo: lordose, escoliose, hemorragias, perda do apetite, exoftalmia, redução na porcentagem de hematócrito, redução na concentração

de colágeno nos ossos, perda de escamas, deformidades operculares e de brânquias, cicatrização deficiente, prejuízo no metabolismo do ferro e anemia microcítica hipocrômica em diversas espécies de peixes (Halver et al., 1969; Wilson & Poe, 1973; Lim & Lovell, 1978; Agrawal & Mahajan, 1980; Shiau & Jan, 1992; Abdelghany, 1996; Hilton et al., 1978; Lim et al., 2000; Barros et al., 2002).

Doses de vitamina C maiores do que as necessárias para proporcionar desempenho normal em bagre do canal, vêm sendo recomendadas para prevenção de infecções bacterianas (Durve & Lovell, 1982; Li & Lovell, 1985). Porém, os resultados de pesquisas sobre o efeito da vitamina C em promover melhor resistência a doenças ainda são muito contraditórios em peixes. Liu et al. (1989) testando o efeito de megadoses de vitamina C sobre a resposta imunológica em bagre do canal, não observaram efeito significativo sobre a atividade do complemento e anticorpos. Porém, peixes que receberam 1000,0 mg de vitamina C/kg da dieta demonstraram resistência contra *Edwardsiella ictaluri*.

Segundo Eichbaum et al. (1977) e Navarre & Halver (1989) peixes com alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos apresentam melhor tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções por bactérias. Li & Lovell (1985) enfatizaram que dietas contendo megadoses de ácido ascórbico (3000,0 mg de vitamina C/kg da dieta) não aumentaram a atividade fagocítica, mas proporcionaram aumento significativo da produção de anticorpos e da atividade do complemento no sistema imunológico dos peixes.

Johnson & Ainsworth (1991) não observaram diferenças significativas na quantidade de neutrófilos e na porcentagem de fagocitose no rim anterior de bagre do canal suplementados com 100,0 ou 1000,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Li et al. (1998) não observaram diferenças significativas na produção de anticorpos em bagre do canal infectados por *Edwardsiella ictaluri* e suplementados com 3,0 a 256,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

A ausência dessa vitamina hidrossolúvel, comparada com a suplementação em níveis de 78,0 ou 390,0 mg AA/kg da dieta foi avaliada em bagre do canal e concluiu-se que os animais que receberam a dieta suplementada possuíam maior resistência ao estresse quando comparados aos não suplementados, porém não determinou-se diferença significativa entre as duas concentrações (Mazik et al., 1987).

Altos níveis de suplementação de vitamina C também são relacionados com o aumento da resistência frente a desafios com bactérias. Nesse sentido, Navarre & Halver (1989) observaram aumento da resistência contra *Vibrio anguillarum* em trutas arco-íris suplementadas com vitamina C (500,0; 1000,0 e 2000,0 mg/kg da dieta) em relação ao tratamento ausente de suplementação. Ressaltaram ainda os autores, que não houve diferença significativa entre os níveis suplementados. Resultado semelhante foi encontrado para salmão do Atlântico desafiado com *Aeromonas salmonicida* (Hardie et al., 1991; Waagbo et al., 1993). De forma oposta, outros estudos demonstraram que não há efeito significativo da suplementação com altas doses de vitamina C no aumento da resistência do salmão do Atlântico infectado com *Aeromonas salmonicida* ou *Vibrio anguillarum* (Erdal et al., 1991).

Lall et al. (1990) não encontraram melhora na resistência a doença e na produção de anticorpos para o salmão do Atlântico infectado com *Aeromonas salmonicida* ou *Vibrio anguillarum* quando receberam doses elevadas de ácido L-ascórbico cristalino (2980,0 mg de vitamina C/kg da dieta). Entretanto Shanks et al. (1991), trabalhando com salmão “coho”, alimentados com dietas suplementadas com níveis de vitamina C acima do recomendado, observaram diminuição das infecções bacterianas e aumento do valor percentual do hematócrito.

Li & Robinson (1993) observaram efeito quadrático significativo em bagres do canal suplementados com vitamina C, 0,0 a 2056,0 mg de vitamina C/kg da dieta, para ganho de peso e conversão alimentar. Entretanto não observaram efeito significativo da suplementação quando os peixes foram desafiados com a bactéria *Edwardsiella ictaluri*.

Andrews & Murai (1975) avaliaram o desempenho produtivo e os parâmetros hematológicos de bagre do canal arraçoado com diferentes níveis de vitamina C. Observaram que 50,0 mg da vitamina C/kg da dieta foi necessário para promover ótimo crescimento e que níveis de 0,0 a 400,0 mg de vitamina C/kg da dieta semi-purificada, não determinaram alterações nos níveis de hematócritos dos peixes avaliados. O uso da dieta prática determinou que níveis de 80,0 ou 130,0 mg de vitamina C/kg da dieta resultaram significativamente em melhores desempenhos produtivos e níveis de hematócrito, comparados com 30,0 mg de vitamina C/kg da dieta.

Sato et al. (1978) avaliaram os parâmetros hematológicos da carpa comum, comparando a suplementação de 2000,0 mg de vitamina C/kg da dieta com a ausência,

os mesmos não observaram diferenças significativas. Barros et al. (2002) observaram que existiu influência do nível de vitamina C no aumento na porcentagem de hematócrito, sendo o valor deste, incrementado com o aumento do nível dessa vitamina. Observaram porém que esse aumento ocorreu em virtude do maior volume globular médio das células, demonstrando que doses elevadas de vitamina C promoveram a liberação de células imaturas na circulação. Os autores entretanto não determinaram efeito significativo nos valores de eritrócitos, hemoglobina e proteína plasmática total, enfatizando a necessidade de novas pesquisas que possam esclarecer melhor a ação dessa vitamina sobre as características hematológicas da tilápia do Nilo.

A literatura apresenta pesquisas desenvolvidas com a vitamina C objetivando a avaliação de respostas ao estresse. Várias condições associadas à aquicultura resultam em mudanças fisiológicas nos peixes, determinando diferentes respostas ao estresse. Baixa qualidade da água, doenças, manejo, densidade e mudança extrema da temperatura da água, entre outras, são considerados indutores de estresse. Segundo Tomasso et al. (1981) e Davies & Parker (1990), essas respostas são caracterizadas pelo aumento da glicose plasmática, do cortisol e pela acentuada diminuição dos eletrólitos plasmáticos.

O aumento do metabolismo durante situações de estresse determina aumento das exigências vitamínicas (Lovell, 1989). Wedemeyer (1969) observou queda do nível de ácido ascórbico no fígado e aumento na produção de cortisol plasmático de salmão do Atlântico e truta arco-íris quando submetidos à condição de estresse.

Li & Robinson em Lim & Webster (2001) ressaltaram que o ácido ascórbico age na síntese dos hormônios corticóides. Embora Hardie et al. (1991) tenham determinado que altos níveis de vitamina C na dieta diminuem os efeitos fisiológicos do estresse, pesquisas desenvolvidas com a carpa comum, bagre do canal e salmão do Atlântico não demonstraram correlação entre o nível de ácido ascórbico e a concentração plasmática de cortisol ou de glicose (Dabroska et al., 1991; Davies et al., 1998; Li et al., 1998).

Li et al. (1998) avaliando o efeito da suplementação de vitamina C (0,0; 50,0; 150,0 e 250,0 mg de AA/kg da dieta) para ganho de peso, concentração de ácido ascórbico nos tecidos, resposta ao estresse e resistência a doenças, observaram baixo ganho de peso e pior conversão alimentar nos peixes que não receberam suplementação quando comparados com os peixes suplementados. Ishibashi et al. (1992) demonstraram

que a tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água de *Oplegnathus fasciatus* e *Oplegnathus punctatus* melhorou com o aumento da concentração da vitamina C na dieta.

Henrique et al. (2002) avaliando o efeito da suplementação de ácido ascórbico (0,0; 10,0; 25,0 e 50,0 mg de vitamina C/kg da dieta) em dourada, *Sparus aurata*, durante hipoxia (55,0% de saturação), não observaram correlação, apenas ressaltaram que a concentração de ácido ascórbico no fígado dos diferentes tratamentos é reflexo da dieta administrada. Segundo Li & Robinson em Lim & Webster (2001) existe grande interesse por parte dos pesquisadores em avaliar o efeito da vitamina C nas respostas imunológicas e na resistência dos peixes, entretanto, pesquisas demonstram resultados ainda contraditórios.

Navarre & Halver (1989) reportaram aumento na resistência a doenças e produção de anticorpos para trutas arco-íris arraçadas com dietas contendo níveis de 500,0 mg de vitamina C/kg da dieta ou acima, e infectadas com *Vibrio anguillarum*. Observaram, também, que a mortalidade foi de 75,0% nas trutas não suplementadas e de 5,0 a 20,0% nas que receberam dietas suplementadas, onde as menores taxas de mortalidade ocorreram em animais alimentados com 1000,0 e 2000,0 mg de AA/kg da dieta.

Waagbo et al. (1993) determinaram que o salmão do Atlântico arraçado com dietas contendo níveis de 4000,0 mg de AA/kg da dieta apresentou maior sobrevivência quando comparado ao que recebeu quantidade menor de suplementação, após exposição a *Aeromonas.salmonicida*. Roberts et al. (1995) demonstraram que o linguado, *Scophthalmus maximus*, alimentado com dietas contendo níveis de 300,0; 1000,0 ou 2000,0 mg de ascorbato-cálcio/kg da dieta tem a capacidade fagocitária das células dos rins e fígado positivamente correlacionadas com a concentração de vitamina C. Determinaram, também, que a proteína plasmática total e a contagem diferencial de leucócitos não foram influenciadas pelos diferentes níveis de suplementação.

2. Estresse

Em animais vertebrados, estresse é definido como estágio ou condição na qual a homeostase do animal é alterada, resultado de ação externa denominada agente estressor (Reddy & Leatherland, 1998). Todos os vertebrados possuem capacidade de se adaptar ao estresse, mediante a constante mudança nas condições ambientais, permitindo assim manter relativamente estável os parâmetros sanguíneos (Hoar, 1983).

Para cada parâmetro sanguíneo existe uma zona de tolerância onde se torna possível o animal manter certa resistência a mudanças ambientais. Fisiologicamente o organismo tenta manter os parâmetros sanguíneos na zona de homeostase. Se essas mudanças ambientais persistirem por muito tempo e excederem o limite de resistência, o animal pode morrer (Reddy & Leatherland, 1998).

Segundo Jobling (1994) os sistemas fisiológicos dos peixes podem ser desafiados ou estressados por vários fatores. O termo estressor pode ser utilizado para descrever esses fatores se o desafio for suficientemente severo para determinar a resposta fisiológica compensatória. Essa resposta é considerada reação adaptativa que melhora a chance de sobrevivência diante de situação nociva ou desafiadora.

Pickering (1981) e Wedemeyer et al. (1990) descreveram que em virtude do estresse o organismo promove cascata de eventos para tentar manter a homeostase. As respostas ao estresse podem ser classificadas em primária (aguda), secundária (crônica) e terciária (crônica prolongada). A resposta primária envolve a ativação do sistema neuroendócrino, com a liberação das catecolaminas e o aumento da liberação pelo eixo hipotálamo-hipofise-interrenal (HPI) do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e dos hormônios corticóides. A resposta secundária inclui mudanças fisiológicas em decorrência da liberação dos hormônios tais como: aumento da pressão sanguínea, maior oxigenação e mobilização das reservas de energia. Em decorrência desses fatores a resposta terciária envolve todo o organismo animal, onde o crescimento é inibido, a reprodução é paralisada e o sistema imunológico não responde (Figura 2).

Essa descrição foi também apresentada por outros autores. Donaldson (1981) relatou que a ativação do sistema neuroendócrino em peixes dispara o “gatilho” que libera as catecolaminas e os hormônios corticosteróides. Isso determina a mobilização de carboidratos e lipídeos de reserva, além de estimular a produção de energia via

gliconeogênese (Suarez & Mommsen, 1988). Segundo Barton & Iwama (1991) mudanças nos níveis de catecolaminas, hormônios corticosteróides e nutrientes no sangue podem ser utilizadas para monitorar respostas ao estresse. Apesar do alto custo e da dificuldade de determinação, o nível de cortisol é freqüentemente utilizado, principalmente por ser simples a diferenciação de níveis basais (animal não estressado) e níveis pós-estresse.

O elevado nível de cortisol plasmático em peixes submetidos a estresse ocasiona a gliconeogênese, que por sua vez, estimula a mobilização de aminoácidos e lipídeos para servirem de substrato para a produção de energia (Vijayan et al., 1994). Esta redistribuição de energia confirma indiretamente a influência sobre a taxa de crescimento dos peixes e o fator de condição (Pickering & Duston, 1983; Barton et al., 1987a; Foo & Lam, 1993).

Pickering (1981) relatou que glicocorticóides, em especial o cortisol plasmático, por ser comumente estudado, foi erroneamente denominado de hormônio do estresse. Segundo Fryer & Peter (1977), falhas na resposta do cortisol podem ocorrer devido ao “feedback” negativo do hormônio no hipotálamo, o qual suprime o hormônio adrenocorticotrófico. Laidley et al. (1988) ressaltaram que em situações onde os peixes são submetidos a estresse crônico, o nível de cortisol não sofre necessariamente alteração.

Wedemeyer et al. (1990) descreveram que níveis plasmáticos de cortisol aumentam após alguns minutos em situações de estresse agudo, retornando aos níveis basais em uma hora. O mesmo não ocorre quando o peixe sofre estresse crônico, onde o nível de cortisol permanece elevado por longo período. Outra forma de se avaliar a intensidade do estresse usualmente utilizada em peixes é por meio da determinação do nível de glicose no sangue. Este parâmetro é de simples determinação e de baixo custo, sendo bom indicador da resposta secundária do peixe ao estresse.

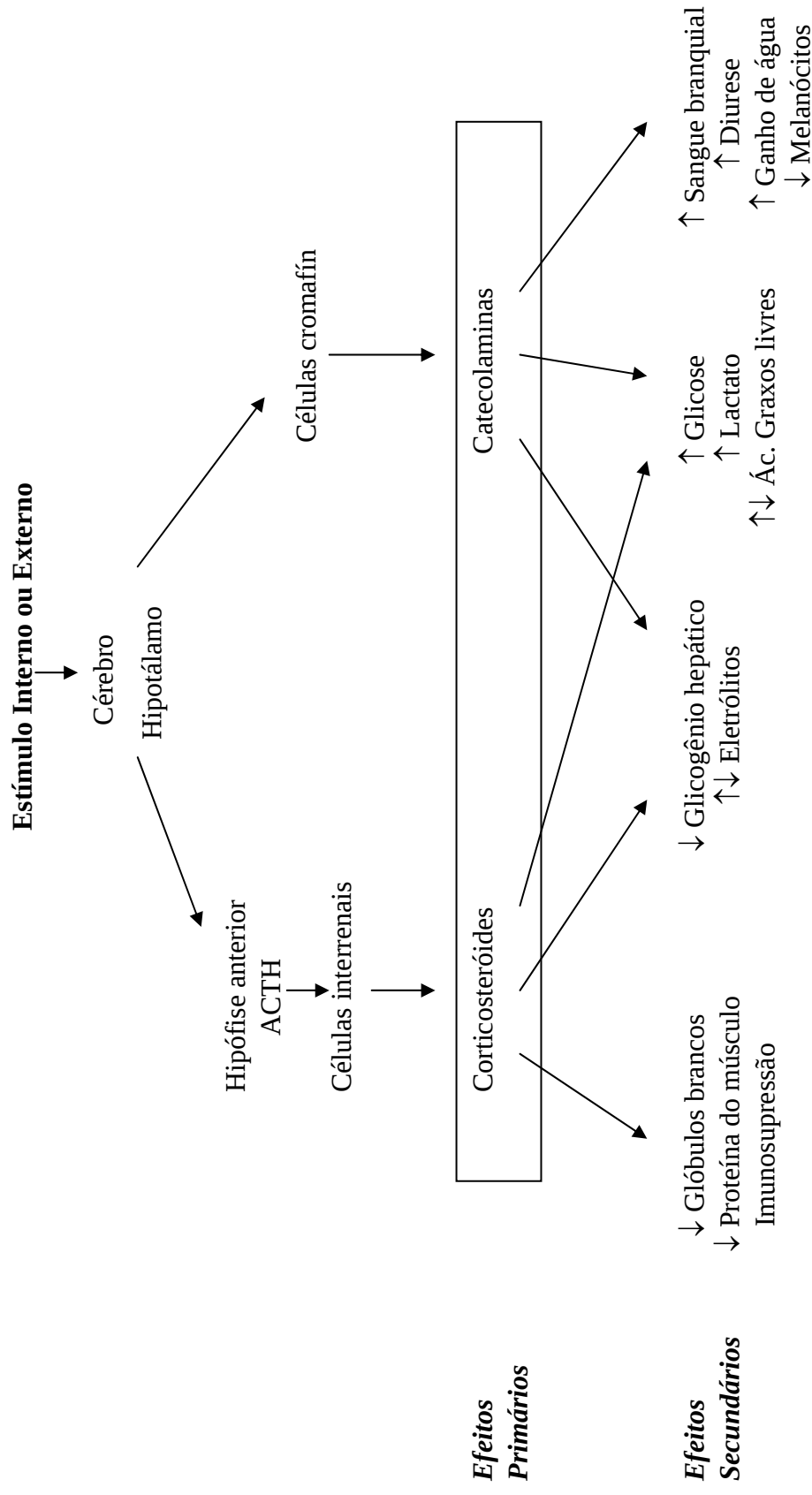


Figura 2: Efeitos primários e secundários do estresse em peixes (Mazeaud et al., 1977).

Vijayan & Leatherland (1989) demonstraram com salmão “coho”, que o cortisol diminui os níveis de reservas de carboidrato, particularmente os estoques de glicogênio hepático. Estas reservas são de extrema importância para suprir as necessidades de energia em situações de estresse. Desta maneira, é de fundamental importância que o peixe esteja com boas reservas para suportar curto período de estresse, como durante o inverno, quando a temperatura da água sofre mudanças bruscas. Talbot (1993) destacou a importância dos constituintes das dietas para peixes, uma vez que esses podem influenciar o nível plasmático desses hormônios e das enzimas do metabolismo intermediário.

Peixes submetidos a situações de estresse possuem menor resistência a doenças, em decorrência da imunossupressão exercida pelos agentes estressores (Pickering & Duston, 1983; Maule et al., 1989). Woo et al. (1987) demonstraram que trutas arco-íris implantadas com cortisol são mais suscetíveis ao parasita *Cryptobia salmositica*, possuindo menor número de anticorpos em relação ao tratamento controle. Pickering & Pottinger (1985) observaram linfocitopenia em trutas marrom, que possuíam altos níveis de cortisol. O mesmo foi observado em bagre do canal com elevação crônica de cortisol (Ellsaesser & Clem, 1987).

Chester-Jones et al. (1969) e Wedemeyer & Wood (1974) também ressaltaram que situações de estresse crônico em peixes ocasionam diminuição do crescimento, aumento da gliconeogênese e principalmente aumento da suscetibilidade a doenças em muitas espécies de peixes.

Larvas de linguado e de robalo, *Dicentrarchus labrax*, alimentadas com 2000,0 mg de AA/kg da dieta demonstram maior taxa de sobrevivência, menor índice cumulativo de estresse (mensurado de acordo com a mortalidade de larvas expostas a alta salinidade) e maior biomassa final (Merchie et al., 1996). Wahli et al. (1986) e Rasheed (1989) demonstraram que infecções por protozoários poderiam ser evitadas ou reduzidas por meio da suplementação com vitamina C na dieta.

Ortuno et al. (2002) avaliando o efeito da suplementação de vitamina C e da vitamina E em dourada submetida a múltiplo estresse, observaram queda de 33,0% no nível de cortisol do tratamento que recebeu suplementação de 300 mg de vitamina C/kg da dieta ou 120 mg de vitamina E/kg da dieta em relação ao controle (ausente de

suplementação) e 50,0% menor no tratamento que recebeu suplementação de ambas as vitaminas em relação ao controle.

Segundo Nagae et al. (1994) as imunoglobulinas (IgMs) participam de forma importante na resposta do sistema imunológico, neutralizando as bactérias e tornando-as mais suscetíveis a fagocitose. A concentração de IgM plasmática diminuiu significativamente em salmão “masu”, *Oncorhynchus masou*, quando da administração de cortisol, reforçando a hipótese de que o aumento da suscetibilidade à infecção em peixes submetidos a estresse, é consequência do efeito do cortisol sobre a produção de IgM.

Segundo MacArthur & Fletcher (1985) macrófagos em peixes possuem inúmeras funções, dentre elas se destaca a fagocitose, a liberação de citocinas e a apresentação do antígeno para o linfócito. A modulação da atividade destas funções pode afetar a imunocompetência e por conseguinte tornar o peixe suscetível a doenças. Narnaware et al. (1994) mostraram que estresse agudo pode levar a supressão da atividade do macrófago no rim e no baço de truta arco-íris, em virtude da liberação de altos níveis de catecolaminas e cortisol.

Outros hormônios não corticóides também sofrem alterações quando o animal é submetido a situações de estresse, tais como: hormônio do crescimento, prolactina, triiodotironina (T₃) e tetraiodotironina (T₄). Estas alterações ainda não estão claramente elucidadas. Pesquisas demonstraram inconsistência de resultados, não determinando o verdadeiro motivo para tal alteração, se ocorreu por causa do alto nível de cortisol ou em virtude da alteração do metabolismo intermediário (Reddy & Leatherland, 1998).

Peixes submetidos a estresses ambientais por longo período podem morrer ou se adaptarem, quando os níveis de cortisol e ACTH retornam próximos aos do período pré-estresse, podendo permanecer desta maneira durante dias e até meses (Schreck, 1981). Esta possibilidade de adaptação em relação à performance pode levar o peixe a duas situações distintas: a exaustão e consequentemente a morte ou, a menor performance em relação ao período pré-estresse, quando algumas habilidades tais como crescimento, reprodução e resistência, diminuem (Reddy & Leatherland, 1998).

Segundo Barton & Schreck (1987b), a exposição dos peixes a mais de um agente estressor pode prejudicar as atividades normais, tornando-os vulneráveis a doenças, quando comparados a peixes expostos apenas a um agente estressor. Olla et al. (1998) observaram alta mortalidade em peixes capturados e depois soltos, quando no momento

da captura a temperatura da água era elevada ao nível de desconforto, em relação aos peixes capturados que não sofreram esse estresse. Segundo Crawshaw (1980) a termoregulação dos peixes é ativada em segundos ou minutos após estresse térmico, mas a adaptação pode levar horas, dias ou semanas.

Sendo a mudança de temperatura da água de cultivo fator ambiental muito importante, Davis & Parker (1990) destacaram que essa condição pode levar a situação de estresse nos peixes determinando o aumento da glicose plasmática, do nível de cortisol e diminuição dos eletrólitos no plasma. Tsai & Wang (1997) estudando o efeito da temperatura sobre as concentrações de serotonina e noraepinefrina em machos e fêmeas de tilápia mossambica, sugeriram que os neurotransmissores estão envolvidos na adaptação térmica, onde a serotonina e a noraepinefrina participam das respostas fisiológicas e bioquímicas durante as mudanças de temperatura da água. Wedemeyer (1969) observou que o choque térmico em trutas arco-íris provocou redução dos teores de ácido ascórbico no rim anterior e aumento dos níveis de cortisol plasmático na ordem de 10 vezes.

Van Weerd & Komen (1998) afirmaram que em criações intensivas o estresse ambiental ocorre paralelamente durante a produção, tornando-se grande problema econômico. Normalmente, nesta situação, o estresse torna-se crônico e conseqüentemente deprime o crescimento. Em situações de estresse, as respostas fisiológicas como a liberação de catecolaminas e cortisol causam constrição do baço, aumento do fluxo sanguíneo e migração dos leucócitos. Esse quadro, segundo McDonald & Milligan (1992), resulta em eritrocitose, trombocitose, hiperproteinose e linfopenia.

Segundo Lochmiller et al. (1989) os parâmetros hematológicos sofrem variações de acordo com as estações do ano. Em experimento com *Morone saxatilis*, o número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e concentração de hemoglobina globular média foram elevadas no outono e inverno em relação ao verão. De maneira oposta, Joshi (1981) relatou que baixas temperaturas podem causar eritrocitopenia em peixes.

Martins (2000) observou valores de hematócrito e contagem global de eritrócitos significativamente maiores em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, durante época fria, independentemente da suplementação ou não com vitamina C. O mesmo autor destacou

que os peixes submetidos ao estresse apresentaram aumento da contagem total de eritrócitos, na época fria, e da taxa de hemoglobina, na época quente. Quando comparou os tratamentos, observou que peixes alimentados com dietas ausente de suplementação de vitamina C e estressados possuíam diminuição significativa da taxa de hemoglobina em relação ao tratamento que recebeu dieta suplementada com vitamina C. Hrubec et al. (2000) avaliando o efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos em híbridos de “striped bass”, *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*, observaram que a proteína plasmática total foi significativamente maior a 29,0°C em relação a temperaturas menores.

O aumento do metabolismo durante situações de estresse gera a redistribuição e maior demanda por vitaminas (Lovell, 1989). Segundo Wedemeyer (1969) este aumento na exigência é especialmente indicado para a vitamina C, a qual é utilizada na síntese do cortisol. Li et al. (1998) porém observaram que o nível de cortisol não sofreu influência de dietas com diferentes níveis de suplementação de vitamina C. O mesmo resultado foi observado em carpa comum submetida a estresse por Dabrowska et al. (1991).

Trabalhos têm sido desenvolvidos correlacionando o efeito do ácido ascórbico com outras características físico-químicas da água e com situações de estresse por manejo. Embora a literatura descreva a ação da vitamina C em situações de estresse, poucos são os trabalhos encontrados correlacionando essa vitamina com o estresse de temperatura durante o período de inverno ou com o preparo dos animais para essa situação, conforme o proposto nessa pesquisa.

3. Lipídeos

Devlin (1997) conceituou lipídeos como substâncias que apresentam características não polar e hidrofóbica. Lehninger et al. (1995) descreveu-os como substâncias orgânicas insolúveis em água, extraídas das células e dos tecidos por solventes não polares, que desempenham funções importantes como componentes estruturais de membranas e forma de depósito de combustível metabólico. Ressaltaram também que várias são as classes de lipídeos, todas contendo estruturas não polares do tipo hidrocarboneto que lhes conferem a natureza oleosa ou serosa e insolúvel em água.

Quimicamente, Lovell (1998) classificou o lipídeo como ésteres de ácidos graxos com glicerol. Uma molécula de glicerol ligada com três, similares ou diferentes, ácidos graxos, com a perda de três moléculas de água que resulta num triacilglicerol. Segundo NRC (1993) os lipídeos da dieta, principalmente na forma de triacilgliceróis, são hidrolisados pelas enzimas digestivas, possuindo mistura de ácidos graxos livres e de monoglicerídeos. Esses compostos são então absorvidos e utilizados para síntese de componentes celulares ou catabolizados para energia.

De acordo com Balfry & Higgs em Lim & Webster (2001) os lipídeos e seus constituintes, ácidos graxos, junto com seus derivados metabólicos exercem funções essenciais e dinâmicas na manutenção do crescimento, eficiência alimentar, higidez, funções renais e de brânquias, desenvolvimento neural e visual, reprodução e qualidade de filé em peixes. Além dos lipídeos serem fontes de energia e ácidos graxos essenciais, também participam do processo de absorção das vitaminas lipossolúveis (NRC, 1993).

Jobling (1994) enfatizou que os fosfolipídeos atuam na determinação da estrutura e fluidez da membrana celular e que também são precursores de outros compostos. Bell et al. (1986) destacaram que essa fluidez depende do balanço apropriado de ácidos graxos saturados e insaturados, como componentes dos fosfolipídios da membrana.

Os peixes não sintetizam os ácidos graxos poliinsaturados das séries ω -3 e ω -6 e seus derivados metabólicos, os quais são nutrientes essenciais e devem portanto ser supridos pela dieta, de acordo com a exigência da espécie (Henderson & Tocher, 1987). Os ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 são: ácido linolênico (18:3n-3) e seus derivados: ácido eicosapentanóico (20:5n-3;EPA) e ácido docohexanóico (22:6n-3;DHA), e o da família ω -6 são: ácido linoléico (18:2n-6) e seu derivado o ácido araquidônico (20:3n-6;AA), todos importantes na resposta imunológica e em situações adversas (Higgs & Dong, 2000).

O lipídeo da dieta pode conter tanto ácidos graxos saturados quanto insaturados. Segundo Pezzato et al. (1992) os lipídeos incorporados nos tecidos dependem do ingerido, espelhando portanto o conteúdo dos alimentos consumidos. Owen et al. (1975) relataram que é variável a capacidade dos peixes de alongar ácidos graxos insaturados com cadeia de 18 carbonos.

Pearson (1982) afirmou que os ácidos graxos poliinsaturados: linoléico, linolênico e araquidônico, são vitais para os peixes, uma vez que a deficiência de um desses, implica em sinais clínicos semelhantes aos de deficiências vitamínicas. Segundo Takeuchi et al. (1983) dietas suplementadas com óleos vegetais (óleo de soja ou óleo de milho) ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série ω -6, proporcionam melhor performance em relação aos demais óleos, como óleos de peixe marinho, ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série ω -3. Tilápias não toleram altos níveis de lipídeo como os salmonídeos. Níveis acima de 12,0% da dieta, podem suprimir o crescimento de híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Jauncey & Ross, 1982).

Igualmente a outras espécies, os peixes são suscetíveis a doenças causadas por parasitas, vírus, bactérias e fungos, sendo a sobrevivência ou a morte desses determinadas pela eficácia do sistema imunológico em prevenir a infecção inicial e ou prevenir o crescimento do agente patógeno após a infecção iniciada (Balfry & Higgs em Lim & Webster, 2001).

Segundo Iwana & Nakanishi (1996), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, específico e não específico, promovem aos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação para prover esse mecanismo de proteção.

A literatura apresenta três mecanismos pelos quais os ácidos graxos podem afetar o sistema imunológico dos animais e a resistência a doenças (Lim & Webster, 2001). Primeiramente seria pela influência na composição da membrana celular, uma vez que os ácidos graxos da dieta determinam fortemente a composição dos fosfolipídios, podendo haver significativo efeito sobre a resistência a doenças, uma vez que muitas respostas imunológicas se baseiam na interação dos leucócitos de membrana. O segundo envolve alterações no sistema de transdução, possivelmente em função dos efeitos sobre a proteína quinase C e o terceiro seria pelo efeito na produção de eicosanóides imunologicamente ativos (proporção de EPA, DHA e AA). Os autores ressaltaram a necessidade e a importância de novas pesquisas nessa área.

Blazer et al. (1989) encontraram diferenças em bagres do canal arraçados com rações comerciais e confeccionadas em laboratório. Destacaram, ainda, que as maiores diferenças entre as rações, as quais provavelmente contribuem para as diferentes

respostas imunológicas, são o conteúdo de lipídeos e a razão entre os ácidos graxos linolênico e linoléico. Sugerem portanto, que o nível e/ou a composição dos lipídeos da dieta possuem importante ação na resistência a doenças.

Bell et al. (1994) demonstraram que a composição lipídica do robalo, *Scophthalmus maximus*, pode ser modificada pelas mudanças na composição de lipídeos da dieta. Esses mesmos autores demonstraram que o aumento no nível do ácido graxo linoléico em dietas para o salmão do Atlântico determinou mudanças na composição dos ácidos graxos dos fosfolipídios das brânquias e leucócitos.

Weirich & Reigh em Lim & Webster (2001) relataram que a tolerância ao estresse de larvas de peixes pode ser melhorada arraçoando-se com níveis adequados de ácidos graxos altamente insaturados, principalmente decaesanoico (22:3n-3) e eicosapentanoico (20:5n-3) e fosfolipídeos, especialmente fosfatidil-colina e fosfatidil-inositol. Ressaltaram os autores que pesquisas são necessárias para melhor identificação dos mecanismos pelos quais os lipídeos são responsáveis pelo aumento da resistência ao estresse em peixes. Bell et al. (1991) observaram que dietas contendo altas concentrações de ω -3 e ω -6, podem aumentar a resistência em salmão do Atlântico para transpor períodos de estresse.

As respostas fisiológicas dos peixes são influenciadas por problemas de meio ambiente, como por exemplo mudanças bruscas de temperatura, alterações nas concentrações de oxigênio e presença de agentes tóxicos (Blazer, 1992). Destacou o autor que dietas que promovem o melhor crescimento podem não necessariamente determinar a melhor resistência a doenças. Esse mesmo autor relatou que nessa deficiência, denominada marginal, o peixe pode continuar crescendo, estar aparentemente saudável, sem sinais evidentes ou histológicos de doenças, porém com deficiência nos mecanismos de resistência a doenças. Essa condição pode ser agravada quando agentes estressores estiverem agindo.

Segundo Kim & Lovell (1995), peixes em temperaturas abaixo da faixa considerada de conforto para a espécie, apresentaram decréscimo nas taxas dos processos metabólicos, tais como ingestão de alimentos e respostas imunológicas. Sellner & Hazel (1982) afirmaram que a aclimação ao frio geralmente aumenta a insaturação dos lipídeos da membrana.

Segundo Hochachka & Somero (1984) existem três regras básicas para a adaptação bioquímica em relação a mudanças de temperatura: conservação de um apropriado parâmetro das estruturas macromoleculares, manutenção do fluxo metabólico contínuo e da rápida resposta do metabolismo.

Os lipídeos correspondem ao depósito primário de energia, onde se acumulam na forma de ácidos graxos ésteres de glicerol, podendo ser utilizados em situações adversas (Castagnoli & Cyrino, 1986). Stickney em Costa-Pierce & Rakocy (1997) também enfatizou o lipídeo como fonte de energia nas dietas dos peixes e sua necessidade para a manutenção da boa nutrição. A energia baseada em lipídeos encontrada na corrente sangüínea na forma de triacilgliceróis é proveniente da dieta, para serem utilizadas no metabolismo ou armazenadas (Devlin 1997).

Assim, ocorre concomitantemente a síntese e quebra de triacilgliceróis. Sendo que o primeiro passo no restabelecimento de ácidos graxos armazenados para produção de energia é a hidrólise de triacilgliceróis, a qual, libera ácidos graxos na corrente sangüínea, que por sua vez, ligam-se à albumina sérica, representando o transporte de energia liberada a partir do armazenamento (Lehninger et al., 1995).

Várias pesquisas têm sido conduzidas avaliando-se o desempenho produtivo de peixes com diferentes níveis de lipídeos presentes nas rações. Chou & Shiau (1996) sugeriram 5,0% como o nível mínimo de lipídeo exigido pela tilápia híbrida, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. Observaram também que o máximo crescimento ocorre com a inclusão de 12,0% de lipídeo na dieta. Takeuchi & Watanabe (1983) reportaram a essencialidade do ácido graxo poliinsaturado linoléico para a *Tilapia zillii*, e tilápia do Nilo, determinando ser de 0,5 e 1,0%, respectivamente.

De Silva (1991) avaliando o efeito economizador de proteína em híbrido de tilápia vermelha, *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*, proporcionado pelo lipídeo determinou que o melhor crescimento e o melhor efeito foram obtidos com níveis de 18,0% de gordura e níveis de 15,0, 20,0 e 30,0% de proteína. De forma oposta Hanley (1991) não encontrou efeito significativo quando o nível de lipídeo foi acrescido de 5,0 a 12,0%, porém a reserva de gordura visceral aumentou de forma significativa. Este mesmo autor inferiu que a tilápia do Nilo não foi capaz de utilizá-la para promover melhor crescimento. Viola & Amidan (1980) concluíram que a gordura depositada com

o aumento do nível de lipídeo nas dietas, ocorreu mais acentuadamente nas vísceras e não no filé, parte essa comercializada do peixe.

Kim & Lovell (1995) avaliaram para o bagre do canal, o efeito da alimentação durante o período de inverno no desempenho produtivo, composição corporal e resistência à infecção com o agente patógeno *Edwardsiella ictaluri* em animais com um e dois anos. Os autores concluíram que os bagres do canal alimentados e não alimentados durante o período do inverno apresentaram semelhante ganho de peso e composição corporal na primavera, embora a alimentação no período de inverno pareceu influenciar a resistência a doenças. Os animais com dois anos que não foram alimentados sobreviveram mais ao desafio que os de um ano alimentados, porém a produção de anticorpos nos animais de dois anos não foi estatisticamente significativa. Diante desses resultados, os autores inferiram que talvez a ausência de alimentação causou depleção de minerais, especialmente ferro ou zinco, necessários para o desenvolvimento das bactérias, permitindo dessa forma maior sobrevivência. Concluíram, ainda, que novas pesquisas necessitam ser desenvolvidas visando essa avaliação. Enfatizaram que a alimentação durante o outono, quando as temperaturas começam a baixar do ótimo e durante o final do inverno e começo da primavera, antes de atingir a temperatura ótima, torna-se necessária para prevenir perdas de peso e alterações na carcaça.

Segundo Fracalossi & Lovell (1994) bagres do canal alimentados próximos a temperatura ótima ($28,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) ingeriram maior quantidade da dieta e cresceram mais depressa, no entanto demonstraram menor resistência ao desafio com a bactéria *Edwardsiella ictaluri*, quando comparado aos peixes alimentados a $17,0^{\circ}\text{C}$.

Webster et al. (1994) relataram que em bagre do canal, submetidos ao jejum, a quantidade de gordura visceral reduziu em 30,0% e a porcentagem de lipídeo no fígado diminuiu depois de 20 dias. Igualmente, Lovell & Sirikul (1974) afirmaram que a perda de peso do bagre do canal não alimentado no período de inverno foi causada pela redução da gordura corporal, entretanto, nesse estudo foi indicado que há também diminuição no tamanho da fibra muscular devido ao jejum nesse período.

Thompson et al. (1991) ressaltaram que o salmão do Colorado, *Colorado squawfish*, durante o período de inverno apresentou decréscimo na condição corporal e baixa no nível nutricional. Lemly (1996) avaliando fatores estressores aos peixes

durante o inverno, observou que em baixas temperaturas onde a presença do agente estressor metabólico é contínua, as reservas lipídicas tiveram a queima acelerada e foram portanto esgotadas. Destacou ainda que se a demanda for elevada e essas reservas terminarem, as condições corporais serão deterioradas e o peixe poderá morrer.

Sheridan (1988) relatou que a mobilização de lipídeo é resultado da ativação de enzima lipolítica, a qual, resulta na hidrólise da reserva de triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol. Love (1980) destacou que a reserva de energia na forma de triacilglicerol no músculo da tilápia é comparativamente pequena em relação à quantidade total de lipídeo, sendo a grande maioria estrutural, como fosfolipídeo de membrana.

Segundo Jobling (1994) peixes que mantêm reserva lipídica no músculo, provavelmente começam a mobilizá-la imediatamente após diminuição da oferta de alimentos e conseqüente baixa ingestão, mas quando o lipídeo muscular é constituído em sua maioria da classe estrutural (fosfolipídeo), este se mantém inalterado, ocorrendo mobilização da proteína muscular e das outras classes de lipídeos.

Chervinski (1982) relatou diferenças consideráveis em espécies de tilápia quanto à tolerância a baixas temperaturas. Segundo Tave et al. (1990) a porcentagem de mortalidade de tilápia do Nilo atribuída a baixas temperaturas é normalmente dependente do histórico genético da espécie e da linhagem. Por outro lado, a aclimação a baixas temperaturas por parte da tilápia azul, é dependente da intensidade de redução térmica da água (Stauffer, 1986; Stauffer et al., 1988).

Estudos vêm sendo desenvolvidos visando avaliar a ação da L-carnitina no aproveitamento dos lipídeos. Torreele et al. (1993) e Chatzifotis et al. (1995) demonstraram que a L-carnitina aumenta a produção de energia na mitocôndria de peixes em virtude da β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa. Harpaz et al. (1999) demonstraram que o peixe ornamental kribensis, *Pelvicachromis pulcher*, suplementado com L-carnitina possuiu maior porcentagem de sobrevivência e adaptação mais rápida a baixas temperaturas em relação ao tratamento controle sem suplementação. Esses mesmos autores relataram que a L-carnitina produziu benefícios aos peixes submetidos a estresse térmico (baixas temperaturas), por estimular o metabolismo lipídico, melhorar a conversão alimentar e estar diretamente relacionada ao transporte de acetil CoA.

De maneira semelhante Becker et al. (1999), demonstraram que o aumento do nível de L-carnitina é necessário quando se pretende aproveitar a energia extra fornecida pela suplementação elevada de lipídeo, uma vez que o excesso deste inibe a ação da carnitina em transportar para dentro da mitocôndria os ácidos graxos, gerando conseqüentemente diminuição no processo de β -oxidação. Torreele et al. (1993) observaram em bagre Africano, alimentado com dieta suplementada com L-carnitina efeito significativo para conversão alimentar.

As pesquisas acima apresentadas demonstraram a importância e a participação dos lipídeos no preparo dos animais para enfrentar situações adversas, melhorando em vários aspectos a resistência dos peixes. Considerando as baixas temperaturas da água características do período de inverno como situação de estresse, os peixes necessitam estar nutricionalmente preparados utilizando-se nessa fase as reservas corpóreas para a manutenção das atividades metabólicas sem prejuízo fisiológico.

Com base nestas informações, o capítulo 2, intitulado “Lipídeo e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, preparatórias para o inverno”, teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de lipídeos, vitamina C e a interação desses no desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos para tilápia do Nilo, visando o preparo desses animais para transpor o período do inverno. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Journal of Applied Aquaculture*.

O capítulo 3, intitulado “Lipídeo e vitamina C na formação, mobilização e composição de ácidos graxos em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* submetidas à baixa temperatura”, teve por objetivo avaliar a mobilização de reservas lipídicas de energia e a variação na composição de ácidos graxos da tilápia do Nilo, submetidas à temperatura abaixo da considerada ideal para a espécie. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Aquaculture*.

O capítulo 4, intitulado, “Suplementação de lipídeo e vitamina C e as respostas fisiológicas da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* após estresse térmico”, teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de vitamina C, lipídeos e a interação desses nos parâmetros fisiológicos do estresse. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Fish Physiology and Biochemistry*.

4. Referências Bibliográficas

- ABDELGHANY, A. Growth response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to dietary L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate, and L-ascorbyl-2-polyphosphate. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 27, p.449-455, 1996.
- AGRAWAL, N.K., MAHAJAN, C.L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp *Cirrhina mrigala* H., due to avitaminosis C during early growth. *J. of Fish Dis.*, v.3, p.231-48, 1980.
- AL-AMOUDI, M.M., EL-NAKKADI, A.M.N., EL-NOUMAN, B.M. Evaluation of optimum dietary requirement of vitamin C for the growth of *Oreochromis spilurus* fingerlings in water from the Red Sea. *Aquaculture*, v.105, p.165-73, 1992.
- ALBREKTSSEN, S., LIE, O., SANDERS, K. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v.71, p.359-65, 1988.
- ANDERSEN, F., LYGREN, B., MAAGE, A., WAAGBO, R. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, v.161, p. 437-451, 1998.
- ANDREWS, J.W., MURAI, T. Studies of the vitamin c requirements of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, v.105, p.557-61, 1975.
- BALFRY, S.K., HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: Lim, C., Webster, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.213-25.
- BARROS, M.M., PEZZATO, L., KLEEMANN, G.K. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p.2149-59, 2002.
- BARTON, B.A., IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Fish Dis.*, p.3-26, 1991.
- BARTON, B.A., SCRECK, C.B. Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.116, p.257-63, 1987.

- BARTON, B.A., SCRECK, C.B., BARTON, L.D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.2b, p.173-85, 1987.
- BECKER, K., SCHREIBER, S., ANGONI, C., BLUM, R. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. *Aquaculture*, v.174, p.313-22, 1999.
- BELL, M.V., HENDERSON, R.J., SARGENT, J.R. The role of polyunsaturated fatty acid in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v.83, p.711-9, 1986.
- BELL, J.G., McVICAR, A.H., PARK, M.T., SARGENT, J.R. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.*, v.121, p.1163-72, 1991.
- BELL, J.G., TOCHER, D.R., MACDONALD, F.M., SARGENT, J.R. Effects of diets rich in linoleic (18:2n-6) and α -linolenic (18:3n-3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.105-18, 1994.
- BIANCHI, J., WILSON, F.A., ROSE, R.C. Dehydroascorbic acid and ascorbic acid transport systems in the guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.*, v.250, p.g461-8, 1986.
- BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. *Ann. Rev. Fish. Dis.*, p.309-23, 1992.
- BLAZER, V.S., ANKLEY, G.T., FINCO-KENT, D. Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.43-8, 1989.
- BLOM, J.H., DABROWSKI, K. Vitamin C requirement of the Angelfish, *Pterophylum scalare*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.31, p.115-8, 2000.
- BOURNE, G.H. The effect of vitamin C on the healing of wounds. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.1-4, p.204-16, 1946.
- BUDDINGTON, R.K., PUCHAL, A.A., HOUPPE, K.L. Hydrolysis and absorption of two monophosphate derivatives of ascorbic acid by channel catfish *Ictalurus punctatus* intestine. *Aquacult.*, v.114, p.317-26, 1993.

- CASTAGOLLI, N., CYRINO, J.E.P. *Piscicultura nos trópicos*. São Paulo: Manole, 1986. 149p.
- CHATZIFOTIS, S., TAKEUCHI, T., SEIKAI, T. The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea bream fingerlings. *Fish Sci.*, v.61, p.1004-8, 1995.
- CHERVINSKI, J. Enviromental physiology of tilapias. In: Pullin, R.S.V., Connell, E.H. *The Biology and Culture of Tilapia*. ICLARM Conf. Proc. 7. Manila, Philippines, 1982. p.119-28.
- CHESTER-JONES, I., CHAN, D.K.O., HENDERSON, I.W., BALL, J.N. The adrenocortical steroids, adrenocorticotropin and the corpuscles of Stannius. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. *Fish Physiol.* London: Academic Press, 1969. p.322-76.
- CHO, C.Y., COWEY, C.W. Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Kanshik, S.J., Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1993. p.149-56.
- CHOU, B.S., SHIAU, S.Y. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, v.143, p.185-95, 1996.
- CRAWSHAW, L.I. Temperature regulation in vertebrate. *Annu. Rev. Physiol.*, v.42, p.473-91, 1980.
- DABROWSKA, H., DABROWSKI, K., MEYER-BURGDORFF, K., HANKE, W., GUNTHER, K.D. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.89b, p.539-45, 1991.
- DABROWSKI, K., HINTERLEITNER, S., STURMBAUER, C., EL-FIKY, N., WIESER, W. Do carp larvae require vitamin C? *Aquaculture*, v.72, p.295-306, 1988.
- DABROWSKI, K., MOREAU, R. Do all fish need ascorbic acid? *Fish, Feed & Nutr.*, v.22, p.96-8, 1996.
- DAVIES, K.B., PARKER, N.C. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*, v.91, p.349-58, 1990.

- DAVIES, K.B., SIMCO, B.A., LI, M., ROBINSON, E. Effect of reduction of supplemental dietary vitamins on the stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.319-24, 1998.
- DE SILVA, S.S., GUNASEKERA, R.M., SHIM, K.F. Interactions of varying dietary protein and lipid levels in young red tilapia: evidence of protein sparing. *Aquaculture*, v.95, p.305-18, 1991.
- DEVLIN, T.M. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. São Paulo: Edgard Blucher, 1997. 1007p.
- DONALDSON, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.11-47.
- DURVE, V.S., LOVELL, R.T. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.39, p.948-51, 1982.
- EICHBAUM, F.W., GUEDES, A.O., NETO, J.P., CARVALHO, F.V. Protecting effect of ascorbic acid in strychnine poisoning and in tetanus (fish, mice, rats). *International J. Vitamin and Nutr. Res.*, v.16, p.31-9, 1977.
- ELLSAESSER, C.F., CLEM, L.W. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.87A, p.405-8, 1987.
- 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 for channel catfish. *J. Nutr.*, v.121, p.1622-6, 1991.
- ERDAL, J.I., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, v.98, p.363-79, 1991.
- EYA, J.C. "Broken-skull disease" in African catfish *Clarias gariepinus* is related to a dietary deficiency of ascorbic acid. *J. World Aquacult. Soc.*, v.27, p.493-8, 1996.
- FOO, J.T.W., LAM, T.J. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. *Aquaculture*, v.115, p.133-43, 1993.

- FRACALOSS, D.M., LOVELL, R.T. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, v.119, p.287-98, 1994.
- FRACALOSS, D.M., ALLEN, M.E., NICHOLS, D.K., OFTEDAL, O. Oscars, *Astronotus ocellatus*, Have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, v.128, p.1745-51, 1998.
- FRYER, J.N., PETER, R.E. Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic cortisol implant studies. *General and Comparative Endocrinology*, v.33, p.215-25, 1977.
- GOULD, B.S. Biosynthesis of collagen III. The direct action of ascorbic acid on hydroxyproline and collagen formation in subcutaneous polyvinyl sponge implants in guinea pigs. *J. Biol. Chem.*, v.232, p.637, 1958.
- GUERIN, M. Feeding elevated levels of ascorbic acid to channel catfish in ponds: Effects on tissue level of ascorbic acid and ascorbate-2-sulfate and on resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Auburn, 1986. Master's Thesis, Auburn University.
- HALVER, J.E., ASHLEY, L.M., SMITH, R.M., Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.98, p.762-71, 1969.
- HALVER, J.E. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Japanese Society of Scientific Fisheries*, v.38, n.1, p.79-81, 1972.
- HANLEY, F. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, v.93, p.323-34, 1991.
- 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.201-14, 1991.
- HARPAZ, S., BECKER, K., BLUM, R. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* – preliminary results. *J. Thermal Biol.*, v.24, p.57-62, 1999.
- HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. The lipid composition and biochemistry fish. *Prog. Lipid Res.*, v.26, p.281-347, 1987.

- HENRIQUE, M.M.F., GOUILLOU-COUSTANS, M.F., GOMES, E. Effect of dietary ascorbic acid supplementation and chronic hypoxia on sea bream growth and vitamin C status. *J. Fish Biol.*, v.60, p.442-52, 2002.
- HIGGS, D.A., DONG, F.M. Lipids and fatty acids. In: Stickney, R.R. *The Encyclopedia of Aquaculture*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2000. p.1-20.
- HILTON, J.W., CHO, C.Y., SLINGER, S.J. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets of rainbow trout. *J. Fish. Res. Board Can.*, v.35, p.431-6, 1978.
- HOAR, W.S. *General and Comparative Physiology*. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1983. 849p.
- HOCHACHKA, P.W., SOMERO, G.N. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton, N.J. 1984.
- HRUBEC, T.C., CARDINALE, J.L., SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, p.29, 2000.
- HWANG, D.F., LIN, T.K. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Bioch. Physiol.*, v.131b, p.1-7, 2002.
- ISHIBASHI, Y., KATO, K., IKEDA, S., MURATA, O., NASU, T., KUMAI, H. Effect of dietary ascorbic acid on the tolerance for low oxygen stress in fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, v.58, p.1555, 1992.
- IWANA, G., NAKANISHI, T. *Fish physiology*. San Diego: Academic Press, 1996. v.15.
- JAUNCEY, K., ROSS, B. A guide to tilapia feed and feeding. *Institute of Aquaculture*. University of Sterling, Scotland. 1982.
- JAUNCEY, K., SOLIMAN, A., ROBERTS, R.J. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Aquaculture and Fisheries Management*, v.16, p.139-49, 1985.
- JOBLING, M. *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall, 1994. 307p.
- JOHNSON, M.R., AINSWORTH, A.J. An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. of Aquatic Animal Health*, v.3, p.266-73, 1991.

- JOSHI, B.D. On some haematologic changes in *Heteropneustes fossilis*, following its sudden transfer to different temperatures. *Indian Journal Zootomy*, v.22, n.2, p.117-22, 1981.
- KIM, M.K., LOVELL, R.T. Effect of overwinter feeding regimen on body weight, body composition and resistance to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, v.134, p.237-46, 1995.
- LAIDLEY, C.W., WOO, P.T.K., LEATHERLAND, J.F. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Kartz, 1951. *J. of Fish Biol.*, v.32, p.253-61, 1988.
- LALL, S.P., OLIVIER, G., WEERAKOON, D.E.M., HINES, J.A. The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: Takeda, M., Watanabe, T. *Proceedings... International Symposium of Feeding and Nutrition in Fish*, 3, 1990, Tokyo: Japan Translation Center, p.427-41.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Savier, 1995. 463p.
- LEMLY, A.D. Wastewater discharges may be most hazardous to fish during winter. *Environ. Pollut.*, v.32, p.169-74, 1996.
- LI, M.H., LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, v.115, p.123-31, 1985.
- LI, M.H., 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.303-12, 1993.
- LI, M.H., ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Applied Aquacult.*, v.4, p.59-71, 1994.
- 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*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.29, p.1-8, 1998.

- LI, M.H., ROBINSON, E.H. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. In: Lim, C., Webster, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.163-75.
- LIM, C., LOVELL, R.T. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, v.108, p.1137-46, 1978.
- LIM, C., KLESZIUS, P.H., LI, M.H., ROBINSON, E.H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, v.185, p.313-27, 2000.
- LIM, C., WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. 365p.
- 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.191-4, 1989.
- LOCHMILLER, R.L., WEICHMAN, J.D., ZALE, A.V. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.93A, n.3, p.535-41, 1989.
- LOVE, R.M. *The chemical biology of fish*. Academic Press, London, 1980. 942p.
- LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. 2.ed. Massachusetts: Academic Press, 1998. 267p.
- LOVELL, R.T., SIRIKUL, B. Winter feeding of channel catfish. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Game Fish Comm.*, v.28, p.208-16, 1974.
- LOVELL, R.T., LIM, C. Vitamin C in pond diets for channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.2, p.321-25, 1978.
- MAAGE, A., WAAGBO, R., OLSSON, P.R., JULSHAMN, K., SANDNES, K. Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*Salmo salar*): 2. Effects of dietary of dietary level and immunization on the metabolism of trace elements. *Fish Physiol. Biochem.*, v.8, n.6, p.429-36, 1990.
- MacARTHUR, J.I., FLETCHER, T.C. Phagocytosis in fish. In: Manning, M.J., Tatner, M.F. *Fish Immunology*, London: Academic Press, 1985. p.29-46.

- MARTINS, M.L. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) estressados*. Jaboticabal, 2000. 125p. Doutorado (Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.
- MARTINEZ, M.C.C. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, v.86, p.409-19, 1990.
- MAULE, A.G., TRIPP, R.A., KAATTARI, S.L., SCHRECK, C.B. Stress alters immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, v.120, p.135-42, 1989.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F., DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.106, p.201-12, 1977.
- MAZIK, P.M., BRANDT, T.M., TOMASSO, J.R. Effect of dietary vitamin C on growth, caudal fin development, and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Progr. Fish-Cult.*, v.49, p.13-6, 1987.
- McDONALD, D.G., MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. *Fish Physiol.* London: Academic Press, 1992. v.12A, p.55-133.
- MERCHIE, G., LAVENS, P., STORCH, V., UBEL, U., NELIS, H., LEENHEER, A.D., SORGELOOS, P. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.114A, n.2, p.123-33, 1996.
- MIYASAKI, T., PLUMB, J.A., LI, Y.P., LOVELL, R.T. Histopathology of broken-back syndrome in channel catfish. *J. Fish Biol.*, v.26, p.647-55, 1995.
- NAGAE, M., FUDA, H., URA, K., KAWAMURA, H., ADACHI, S., HARA, A., YAMAUCHI, K. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.41-8, 1994.
- NARNAWARE, Y., BAKER, B.I., TOMLINSON, M.G. The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.13, p.31-40, 1994.

- NAVARRE, O., HALVER, J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, v.79, p.207-21, 1989.
- NITZAN, S., ANGEONI, H., GUR, N. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. *The Israeli J. Aquacult.*, v.48, p.133-41, 1996.
- NRC (National Research Council). *Nutrient requirements of fish*. Washington: Academy Press, 1993. 125p.
- OLLA, B.L., DAVIS, M.W., SCHRECK, C.B. Temperature magnified post-capture mortality in adult sablefish after simulated trawling. *J. Fish Biol.*, v.53, p.743-51, 1998.
- ORTUNO, J., ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, v.12, p.1-12, 2002.
- OWEN, J.M., ADRON, J.W., MIDLETON, C., COWEY, C.B. 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acid in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Salmo gairdineri*). *Lipids*, v.10, p.528-31, 1975.
- PANUSHI, R.S., DELAFUENTE, J.C. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet*, v.45, p.97-123, 1985.
- PEARSON, W.E. *The nutrition of fish* (Information Service ROCHE), Unilever Research Laboratory, Sharnbrood, Bedford, England, 47p. 1982.
- PEZZATO, L.E., CASTAGNOLLI, N., BARROS, M.M., DEL CARRATORE, C.R., PEZZATO, A.C. 1992. Efeito de diferentes níveis de gordura animal e vegetal sobre o desempenho e deposição de ácidos graxos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Congresso Brasileiro de Aquicultura, 7, 1992, Peruíbe. Anais... Peruíbe: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1995. 104-111.
- PICKERING, A.D. Introduction: The concept of biological stress. In: Pickering, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.1-9.
- PICKERING, A.D., DUSTON, J. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L. and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. *J. of Fish Biol.*, v.21, p.163-75, 1983.

- PICKERING, A.D., POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. of Fish Biol.*, v.27, p.611-19, 1985.
- RASHEED, V.M. Diseases of cultured brown spotted grouper *Epinephelus tauvina* and silvery black porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait. *J. Aquatic Animal Health*, v.1, p.101-7, 1989.
- REDDY, P.K., LEATHERLAND, J.F. Stress physiology. *Fish Diseases and Disorders*, v.2, p.279-301, 1998.
- ROBERTS, M.L., DAVIS, S.J., PULSFORD, A.L. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on the non-specific immunity in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.5, p.27-38, 1995.
- ROBINSON, E. H. Vitamin C studies with catfish: requirements, biological activity and stability. Mississippi: Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, 1992. (*Technical Bulletin*, 182).
- SATO, M.R., YOSHINAKA, R., YAMAMOTO, S. Necessity of ascorbic acid in the diet of carp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, v.44, p.1151-6, 1978.
- SATO, M., KONDO, T., YOSHINAKA, R., IKEDA, S. Effect of water temperature in skeletal deformity in ascorbic acid deficient rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher.*, v.49, n.3, p.443-6, 1983.
- SANDNES, K., ULGENS, Y., BRAEKKAN, O.R., UTNE, F. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v.43, p.167-77, 1984.
- SCHRECK, C.B. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. In: Pickering, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.295-321.
- SELLNER, P.A., HAZEL, J.R. Desaturation and elongation of unsaturated fatty acids in hepatocytes from thermally acclimated rainbow trout. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.213, p.58-66, 1982.
- SHANKS, C.A., WIRKKULA, J.R., ROHOVEC, J.S. Effects of vitamin C on coho salmon infected with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). In: Proc. 2nd Int. Symp. Viruses Lower Vertebrates, Oregon, 1991.

- SHIAU, S.Y., JAN, F.L. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fish. Sci.*, v.58, p.671-5, 1992.
- SHIAU, S.Y., HSU, T.S. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*, v.175, p.317-26, 1999.
- SHIMENO, S. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. In: Wilson, R.P. *Handbook of nutrient requirements of finfish*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.181-91.
- 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, 1986.
- 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.). *Aquacult. Fish. Manage.*, v.25, p.269-78, 1994.
- STAUFFER, J.R. Effects of salinity on preferred and lethal temperatures of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Water Res. Bull.*, v.22, p.205-8, 1986.
- STAUFFER, J.R., BOLTZ, S.E., BOLTZ, J.M. Cold shock susceptibility of blue tilapia from Susquehanna River, Pennsylvania. *North American J. Fisheries Management*, v.8, p.329-32, 1988.
- STICKNEY, R.R. Tilapia nutrition, feeds and feeding. In: Costa-Pierce, B.A., Rakocy, J.E. *Tilapia aquaculture in the Americas*. Louisiana: World Aquaculture Society, 1997. p.34-54.
- STICKNEY, R.R., MCGEACHIN, R.B., LEWIS, D.H., MARKS, J., RIGGS, A., SIS, R.F., ROBINSON, E.H., WURTS, W. Response of tilapia aurea to dietary vitamin C. *J. World Maricult. Soc.*, v.15, p.179-85, 1984.
- SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Canadian J. Zool.*, v.65, p.1869-82, 1988.
- TAKEUCHI, T., WATANABE, T. Requirement of *tilapia nilotica* for essential fatty acids. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, v.49, p.1127-34, 1983.
- TAKEUCHI, T., SATOH, S., WATANABE, T. Dietary lipids suitable for practical feed of *Tilapia nilotica*. *Bull. Jpn. Sci. Fish.*, v.49, n.9, p.1361-5, 1983.

- TALBOT, C. Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. *Proc. Nutr. Soc.*, v.52, p.403-16, 1993.
- TAVE, D., JAYAPRAKAS, V., SMITHERMAN, O. Effects on intraspecific hybridization in tilapia nilotica on survival under ambient winter temperature in Alabama. *J. World Aquacult.*, v.21, p.201-4, 1990.
- THOMPSON, J.M., BERGERSEN, E.P., CARLSON, C.A., KAEDING, L.R. Role of size, condition, and lipid content in the overwinter survival of age-0 Colorado squawfish. *Trans. Am. Fish Soc.*, v.120, p.346-53, 1991.
- TOLBERT, B.M., DOWNING, M., CARLSON, R.W., KNIGHT, M.K., BAKER, E.M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.258, p.48-69, 1975.
- TOMASSO, J.R., DAVIS, K.B., SIMCO, B.A. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. *Canadian J. Fisher. Aquat. Sci.*, v.38, p.1106-12, 1981.
- TORREELE, E., VAN DER SLUIZEN, A., VERRETH, J. The effect of dietary L-carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid. *J. Nutr.*, v.69, p.289-99, 1993.
- TSAI, C.L., WANG, L.H. Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters, serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neuroscience Letters*, v.233, p.77-80, 1997.
- VAN-WEERD, J.H., KOMEN, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.120, p.107-12, 1998.
- VIJAYAN, M.M., LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, v.67, p.2746-50, 1989.
- VIJAYAN, M.M., REDDY, P.K., LEATHERLAND, J.F., MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486. *General and Comparative Endocrinology*, v.96, p.75-84, 1994.

- VIOLA, S., AMIDAN, G. Observations on the accumulation of fat in carp and Sarotherodon (Tilapia) fed oil-coated pellets. *Bamidgeh*, v.32, p.33-40, 1980.
- WAAGBO, R., GLETTE, J., RAA-NILSEN, E., SANDNES, K. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, v.12, p.61-73, 1993.
- WAHLI, T., MEIER, W., PFISTER, K. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Trop.*, v.43, p.287-9, 1986.
- WEBSTER, C.D., TIDWELL, J.T., GOODGAME, L.S., YANCEY, D.H. Effects of fasting on fatty acid composition of muscle, liver, and abdominal fat in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *World Aquaculture Society*, v.25, p.126-33, 1994.
- WEIRICH, C.R., REIGH, R.C. Dietary, lipids and stress tolerance of larval fish. In: Lim, C., Webster, C. D. *Nutrition and fish health*. New York: Haworth Press, 2001. p.301-08.
- WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.29, p.1247-51, 1969.
- WEDEMEYER, G., WOOD, J. Stress as a predisposing factor in fish diseases. *U.S. Fish and Wildlife Service, Fish Disease Leaflet*, n.38, 1974.
- WEDEMEYER, G.A., BARTON, B.A., MCLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 1990. p.451-89.
- WILSON, R.P., POE, W.E. Impaired collagen formation in the scorbutic catfish. *J. Nutr.*, v.103, p.1359-64, 1973.
- WOO, P.T.K., LEATHERLAND, J.F., LEE, M.S. *Cryptobia salmositica*: cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *J. of Fish Diseases*, v.10, p.75-83, 1987.
- ZANNONI, V.G., HOLSZTYNSKA, E.J., LAU, S.S. Biochemical functions of ascorbic acid: chemistry, metabolism, and uses. *American Chemical Society*, Washington, D.C., USA. 1982.

**Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno
para a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***

RESUMO: Visando o preparo da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, para o período de inverno, foram avaliados durante 112 dias diferentes níveis de suplementação de lipídeo e vitamina C, no desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos. Foi utilizado um lote de 192 alevinos, com peso médio de $5,57 \pm 0,50$ g distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 200 L cada, dispostos em oito aquários de 1000 L, dotados de sistema de aquecimento e de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. O experimento foi conduzido num esquema fatorial 2 x 3, com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com quatro repetições, mais dois tratamentos, um ausente de suplementação dos nutrientes testes e outro acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Foram confeccionadas oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível. O suplemento vitamínico e mineral utilizado foi isento de vitamina C, sendo considerada como fonte somente o adicionado à dieta. A vitamina C utilizada foi a polifosfatada com 35,0% de atividade e a fonte de lipídeo o óleo de soja. Os resultados permitiram concluir que a energia adicional proveniente do lipídeo é depositada na cavidade abdominal na forma de gordura visceral; que a deposição desta gordura como reserva de energia para transpor o período de inverno foi obtida em todos os níveis de suplementação de lipídeo, sendo a suplementação com 8,0% a mais adequada; que a concentração hepática de vitamina C é proporcional a concentração desta na dieta porém, em função da capacidade

de reserva do fígado a quantidade de 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta mostra-se mais apropriada economicamente e que a ausência de vitamina C prejudica a eritropoiese e a síntese de colágeno.

PALAVRAS CHAVE: ácido ascórbico, lipídeo, tilápia do Nilo, exigência, estresse térmico

**Lipid and vitamin C in practical diets preparatory for winter
for Nile tilapia *Oreochromis niloticus***

ABSTRACT: It were evaluated during 112 days different lipid and vitamin C supplementation in practical diets, on growth performance and physiologic parameters of Nile tilapia, aiming the animals preparation for winter time. It was utilized 192 fingerlings, selected from the same spawn, with average weight of 5.57 ± 0.50 g. These were randomly stocked into 32 200-l aquaria, supplied with heat system and recycled water with mechanic and biological filter. The experiment was conducted in factorial design 2×3 , two levels of lipid (8.0 and 12.0%) and three levels of vitamin C (300.0; 600.0 and 1,200.0 mg of vitamin C/kg diet), with four replicates each treatment, plus two treatments, absence of test nutrients supplementation and supplemented with 6.0% of lipid and 125.0 mg of vitamin C/kg diet. Eight experimental practical diets were formulated to contain 32.0% of digestible

protein. Vitamin and mineral mix was absent of vitamin C, considering as a source only the supplemented in diets. The vitamin C utilized was polyphosphate 35.0% activity. Based on the results it was concluded that the additional energy coming from lipid is accumulated in abdominal cavity as visceral fat; fat deposition as a energy reserve for winter time was obtained in all lipid supplementation, however 8.0% supplementation seems to be more appropriate; vitamin C liver concentration is proportional to diet concentration, but because of liver reserve capacity the amount of 600.0 mg of vitamin C/kg diet appears to be more economic appropriate and that vitamin C absence impairment erythropoiesis and collagen syntheses.

KEYWORDS: ascorbic acid, lipid, Nile tilapia, requirement, temperature stress

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os sistemas intensivo e super intensivo de criação de peixes têm sido as técnicas mais difundidas e adotadas pelos criadores. Nesses sistemas, os peixes são expostos a diversos agentes estressores que podem determinar alterações da condição fisiológica desses. Dentre esses fatores muitos são estreitamente relacionados com as características físico-químicas da água, como por exemplo, a temperatura, a qual pode sofrer alterações abruptas, principalmente durante épocas de inverno.

Vários são os aspectos a serem avaliados numa ração os quais, em função da participação metabólica, podem determinar o preparo do peixe para transpor situações adversas. A vitamina C bem como os lipídeos e seus constituintes, ácidos graxos, exercem

funções essenciais e dinâmicas na manutenção do crescimento, eficiência alimentar, higidez, funções renais e de brânquias, desenvolvimento neural e visual, reprodução e qualidade de filé em peixes (Balfry e Higgs em Lim e Webster, 2001). Segundo Takeuchi et al. (1983) dietas suplementadas com óleos vegetais (óleo de soja) ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série n-6, proporcionaram melhor performance em relação aos demais óleos. Bell et al. (1991) observaram que dietas contendo altas concentrações de n-3 e n-6 podem aumentar a resistência em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, para transpor períodos de estresse.

Os lipídeos correspondem ao depósito primário de energia, onde se acumulam na forma de triacilglicerol, podendo ser utilizados em situações desfavoráveis (Castagnolli e Cyrino, 1986; Stickney em Costa-Pierce e Rakocy, 1997). Lovell e Sirikul (1974) relataram perda de peso do bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, no período de inverno decorrente da redução da gordura corporal. De maneira semelhante Lemly (1996) observou, durante o inverno, que as reservas lipídicas tiveram a queima acelerada e foram, portanto esgotadas, demonstrando a necessidade de reserva adequada para não deteriorar as condições corporais.

Segundo Albrektsen et al. (1988) e Dabrowski e Moreau (1996), algumas espécies animais, dentre essas a maioria dos peixes, não sintetizam a vitamina C em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase para sua síntese a partir da glicose. Tal deficiência faz com seja suplementada na dieta em quantidades adequadas para suprir as necessidades metabólicas da espécie (Wilson e Poe, 1973; Lovell, 1998). El Naggar e Lovell (1991) e Guerin (1986), observaram que a concentração de ácido ascórbico no

figado de bagre do canal é representativa, alterando-se de acordo com o fornecido pela dieta.

A vitamina C participa também da síntese do colágeno, conferindo assim maior resistência à fibra; do metabolismo do ferro transformando, o ferro do estado férrico para ferroso; da síntese da carnitina a partir da lisina e metionina; atua na conversão do ácido fólico para folínico e pode ainda minimizar a ação de espécies reativas do oxigênio evitando a desestabilização da membrana lipídica (Gould, 1958; Zanoni et al., 1982; Panushi e Delafuente, 1985; Lehninger et al., 1995; Miyazaki et al., 1995).

Alterações metabólicas durante situações desfavoráveis gera a redistribuição e maior demanda por vitaminas, especialmente a vitamina C (Wedemeyer, 1969). Doses maiores do que as necessárias para proporcionar desempenho normal em bagre do canal, vêm sendo recomendadas para determinar maior resistência (Durve e Lovell, 1982; Li e Lovell, 1985). Segundo Eichbaum et al. (1977), Navarre e Halver (1989) e Li e Lovell (1985), peixes com alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos apresentaram melhor tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções por bactérias.

Blazer (1992) destacou que nem sempre a ração que promove o melhor crescimento aos peixes é aquela que determina a melhor resistência a doenças. Desta forma, ressalta-se que o estudo da nutrição correlacionada com a higidez dos peixes se apresenta como linha bastante importante de investigação. Deste modo, essa pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de lipídeos, vitamina C e a interação desses no desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos da tilápia do Nilo, visando o preparo desses animais para transpor o período de inverno.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, AquaNutri – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP, laboratório associado ao Centro de Aqüicultura da UNESP, pelo período de 16 semanas.

Foi utilizado um lote de 192 alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes da mesma desova e revertidos sexualmente, com peso médio de $5,57 \pm 0,50$ g distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 200 L cada, numa densidade de seis peixes por tanque-rede. Esses foram dispostos em oito aquários de 1000 L, quatro tanques-rede por aquário. O conjunto de aquários foi dotado de sistema de aquecimento controlado por termostato, o qual manteve a temperatura dentro da faixa de conforto ($26,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) e sistema de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. Semanalmente foram verificadas as características físico-químicas da água dos aquários e realizada sifonagem para retirada de eventuais resíduos orgânicos.

O experimento foi conduzido num esquema fatorial 2×3 , com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0% da dieta) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com quatro repetições para cada tratamento. Esses tratamentos foram confrontados com dois tratamentos adicionais, sendo o primeiro, ausente de suplementação dos nutrientes testes e o segundo acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta, valores esses comumente utilizados pelas indústrias de rações para peixes. A vitamina C utilizada foi a polifosfatada com 35,0% de atividade (Stay-C[®] Roche) e a fonte de lipídeo foi o óleo de soja comercial.

Desta forma foram confeccionadas oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível. O suplemento vitamínico e mineral utilizado foi isento de vitamina C, sendo considerada como fonte somente o adicionado à dieta (Tabelas 1 e 2).

As dietas foram peletizadas e posteriormente fracionadas em diferentes diâmetros, adequados ao tamanho dos peixes. As mesmas foram armazenadas em congelador (-20,0°C) objetivando evitar perdas da vitamina C pelo processo de oxidação. A dieta contida em potes individuais para alimentação diária foi mantida em refrigerador (3,0°C), numa quantidade equivalente a uma semana de alimentação. Essas foram oferecidas diariamente nos horários de 8:30, 11:30, 14:30 e 17:30 horas. Durante o arraçoamento as dietas foram ofertadas de duas a três vezes na tentativa de se alcançar à saciedade dos peixes.

Ao final de 112 dias, 16 semanas, foram determinados os parâmetros de desempenho produtivo, ou seja, ganho de peso, conversão alimentar aparente e consumo aparente de ração. Para tal, os peixes foram pesados e o consumo aparente da dieta quantificado. Durante o procedimento de pesagem foi efetuada análise macroscópica dos peixes para determinação de possíveis sinais clínicos de deficiência de vitamina C.

Para a determinação da gordura visceral foram avaliados cinco peixes por tratamento. Os peixes foram sacrificados utilizando-se superdosagem do anestésico benzocaína. Para melhor exposição dos órgãos cavitais, efetuou-se três incisões dorso-ventrais, uma próxima ao opérculo, outra na abertura do poro urogenital e uma terceira paralela ao dorso, na região abdominal ventral.

Após a quantificação da gordura, foi calculado o índice de gordura visceral $IGV = [(peso\ gordura\ (g)/peso\ corporal\ (g)) \times 100]$.

Desses mesmos peixes, foram retirados os filés e congelados para posterior determinação da porcentagem de lipídeo (AOAC, 2000). Foram ainda extraídos os fígados para a quantificação da vitamina C. Após a retirada, os mesmos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em congelador a $-80,0^{\circ}\text{C}$. A análise de vitamina C foi efetuada em cromatógrafo líquido (HPLC - fase reversa), de acordo com metodologia adaptada de Wang et al. (1988). Destas mesmas amostras foi também determinada a porcentagem de extrato etéreo (AOAC, 2000) e calculado o índice hepatossomático $IHS = [(peso\ fígado\ (g)/peso\ corporal\ (g)) \times 100]$.

Para quantificação da porcentagem de colágeno as carcaças foram fervidas em água por 10 minutos e com auxílio de pinça e escova, foram retiradas as possíveis sobras de tecido muscular e separada as vértebras. Essas foram imersas em solução de hidróxido de sódio 0,1N por 24 horas e posteriormente secas por 12 horas a $55,0^{\circ}\text{C}$ em estufa de circulação de ar forçada, de acordo com metodologia adaptada de Mustin e Lovell (1992). Foram também efetuadas radiografias de dois peixes por tratamento, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu para verificar possíveis deformidades.

Para determinação dos parâmetros hematológicos foram retirados aleatoriamente cinco peixes por tratamento. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e realizada coleta de sangue com auxílio de seringa de 1,0 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%) através do vaso caudal, para determinação do número de eritrócitos

utilizando-se solução de azul de toluidina a 0,01% em câmara de Neubauer. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina utilizando-se kit comercial Analisa Diagnostica[®] para determinação colorimétrica. Posteriormente, a essas análises foram calculados os índices hematimétricos, volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM). As variáveis acima apresentadas foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). A porcentagem de hematócrito foi determinada utilizando-se o método do microhematócrito.

Ao final do período experimental foram avaliadas as dietas experimentais, bem como as carcaças dos peixes as porcentagens de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas segundo AOAC (2000). Foi ainda determinada a quantidade de vitamina C em cromatógrafo líquido (HPLC) das diferentes dietas experimentais.

Para a determinação do coeficiente de digestibilidade aparente das dietas foi acrescido às mesmas 0,1% de óxido crômio III (Cr_2O_3) segundo metodologia descrita por Granner (1972) e o protocolo seguido foi descrito por Pezzato et al. (2002) com duração de 15 dias.

A análise estatística foi realizada por meio da técnica da ANOVA para o esquema fatorial 2 x 3, com dois tratamentos adicionais no delineamento inteiramente casualizado, complementado com os testes de Scheffé e Tukey (estrutura fatorial) (Yassin, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer do período experimental a temperatura da água dos aquários apresentou-se a $26,0 \pm 1,0$ °C. Os níveis médios de oxigênio dissolvido oscilaram entre $7,5 \pm 0,5$ mg/L e o pH de $7,0 \pm 0,5$. Esses valores se encontram dentro da faixa ótima para o desenvolvimento da espécie, segundo Boyd (1990), e portanto não exerceram influência sobre os parâmetros avaliados.

Os valores médios de ganho de peso por peixe, consumo aparente de ração, conversão alimentar aparente, gordura visceral e índice de gordura visceral de alevinos de tilápia do Nilo, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas, estão apresentados na Tabela 3.

Observou-se nesta tabela efeito significativo ($P < 0,05$) no ganho de peso quando se confrontou o tratamento ausente de suplementação com a média dos demais tratamentos (fatorial). Aplicando-se o índice relativo de comparação (IRC) e considerando-se o tratamento ausente de suplementação como 100%, observou-se que houve ganho médio de peso dos demais tratamentos em 17,8%.

Embora não tenha sido significativo o efeito dos níveis de lipídeo (Tabela 3), a suplementação de 12,0% determinou aumento do ganho de peso de 3,2% em relação à suplementação de 8,0% de lipídeo. Esses resultados confirmam os obtidos em pesquisa com a tilápia do Nilo por Hanley (1991), o qual também não determinou efeito significativo em relação ao ganho de peso quando o nível de lipídeo foi acrescido de 5,0 para 12,0%.

De maneira semelhante Chou e Shiau (1996) conduzindo experimento com híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de lipídeo em relação ao tratamento ausente de suplementação, não encontraram diferença significativa entre 5,0 e 15,0% para o ganho de peso, mas concluíram que o máximo crescimento ocorreu com a suplementação de 12,0%. Entretanto, os resultados de ganho de peso, na presente pesquisa (Tabela 3) contrariam as respostas obtidas por Jauncey e Ross (1982), os quais relataram que tilápias não toleram altos níveis de lipídeos como os salmonídeos, podendo apresentar supressão dos parâmetros produtivos quando essas foram alimentadas com dietas suplementadas com níveis acima de 12,0%.

Analisando-se os resultados do consumo aparente de dieta (Tabela 3) observou-se que não houve efeito significativo dos tratamentos. No entanto, houve tendência de queda no consumo com o aumento da porcentagem de lipídeo na dieta de 8,0 para 12,0%, demonstrando coerência com a quantidade de energia digestível das dietas (Tabela 2). Embora a presença de lipídeo melhore a palatabilidade, a quantidade de energia digestível pode ter influenciado a ingestão da dieta. Resultado esse, também sugerido por De Silva et al. (1991).

Em relação à conversão alimentar aparente (Tabela 3) pode-se observar efeito significativo ($P < 0,01$) do tratamento ausente de suplementação e do tratamento suplementado com 6,0% de lipídeo e 125,0 mg vitamina C/kg da dieta ($P < 0,05$) em relação à média do fatorial. Observou-se, ainda, que houve efeito do lipídeo, onde a suplementação de 12,0%, determinou maior nível de energia digestível e resultou em melhor conversão

alimentar aparente, fato este também evidenciado em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, por Beamish e Medland (1986).

A análise de extrato etéreo da carcaça dos peixes dos diferentes tratamentos (Tabela 2) revelou que houve aumento de 48,1% com a suplementação de 12,0% de lipídeo na dieta em relação à média do tratamento suplementado com 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Houve, ainda, aumento de 12,4% do extrato etéreo na carcaça dos peixes cujas dietas foram suplementadas com 8,0% de lipídeo em relação à média dos controles. A magnitude do aumento não é uma surpresa, Pandian e Raghuraman (1972) observaram níveis de 32,0 a 44,0% em tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, arraçoada com dieta contendo 32,0% de lipídeo, enquanto Hanley (1991) encontrou níveis de 1,2% de extrato etéreo na carcaça dos peixes do tratamento ausente de suplementação e de 4,5 a 6,9% para os demais tratamentos onde ocorreu suplementação da dieta com 5,0 e 12,0% de lipídeo, respectivamente.

Para analisar a suplementação de lipídeo com intuito de fornecer reserva de energia para transpor momentos onde a demanda energética requerida é aumentada deve-se considerar o peso do peixe em relação à gordura depositada na cavidade visceral. Desta maneira, observando-se o índice de gordura visceral (Tabela 3) notou-se efeito significativo tanto nos peixes do tratamento ausente de suplementação ($P < 0,01$) quanto nos alimentados com a dieta suplementada com 6,0% de lipídeo ($P < 0,05$) em relação à média do fatorial. Tal resultado evidencia que a suplementação de lipídeo acima do utilizado pelas indústrias de rações promoveu maior depósito de gordura.

Ressalta-se, porém, que a suplementação de 6,0% de lipídeo (Tabela 3) não diferiu significativamente em relação à suplementação de 8,0 e 12,0% para ganho de peso, tendo

diferido para conversão alimentar aparente, gordura visceral e índice de gordura visceral em virtude da deposição de gordura na cavidade abdominal. Confrontado-se os resultados da suplementação de 8,0 e 12,0% de lipídeo observou-se que a maior suplementação determinou aumento de 48,7% na quantidade de gordura visceral e 44,0% no índice de gordura visceral. Destaca-se que esses valores, determinados pela suplementação de 12,0% de lipídeo, podem ser considerados expressivos e que, podem se tornar prejudiciais num período prolongado de utilização desta dieta.

Os resultados da presente pesquisa (Tabela 3), bem como os apresentados pela literatura demonstraram, que o peixe não consegue aproveitar toda a energia adicional proveniente do lipídeo para o crescimento e que, desloca a parcela do lipídeo que não é aproveitada para o funcionamento do metabolismo, para ser depositado na cavidade abdominal.

Resultados semelhantes foram obtidos por Viola et al. (1980), os quais destacaram que a gordura depositada com o aumento do nível de lipídeo nas dietas ocorreu mais nas vísceras e não no filé, parte essa comercializada do peixe. Fitzsimmons et al. (1997) estudando o efeito da redução nos níveis de lipídeo da dieta na composição final da carcaça de híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, demonstraram que no final da produção não ocorreu redução significativa dos níveis de lipídeo no filé, mesmo com o fornecimento de dieta com menor suplementação, dificultando desta forma a comercialização desse produto em virtude da possível diminuição da vida útil.

Os resultados apresentados nesta pesquisa (Tabela 3) demonstraram que a deposição de gordura visceral para o enfrentamento do período de inverno foi obtida em todos os níveis de suplementação. Todavia, em virtude das prováveis complicações fisiológicas,

principalmente em função da quantidade de lipídeo no fígado e ainda da dificuldade da tilápia do Nilo em mobilizar elevado conteúdo de reserva lipídica, conforme apresentado na literatura, pode-se inferir que a suplementação de 8,0% proporcionou a mais adequada reserva de energia. Esta hipótese pode ser reforçada pela avaliação macroscópica efetuada e pelos índices de gordura apresentados pelos peixes arraçados com a dieta suplementada com 12,0% de lipídeo, os quais possuíam excessiva reserva de gordura visceral. Ressalta-se que não houve mortalidade em nenhum dos tratamentos testados.

Na Tabela 4 estão apresentadas as porcentagens de lipídeo do filé, do fígado, a concentração de vitamina C no fígado e o índice hepatossomático de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.

Notou-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos ausente de suplementação e suplementado com 6,0% de lipídeo e 125,0 mg vitamina C/kg da dieta em relação à média do fatorial para porcentagem de extrato etéreo no filé e no fígado. Este efeito ocorreu em virtude da suplementação de lipídeo e da energia digestível nos tratamentos que receberam suplementação (fatorial). De maneira semelhante, o efeito significativo ($P < 0,05$) do índice hepatossomático da média dos tratamentos suplementados (fatorial) em relação ao controle ausente de suplementação foi reflexo da alta porcentagem de extrato etéreo encontrada no fígado dos peixes. A análise macroscópica revelou alterações características de acúmulo de gordura no fígado dos peixes que receberam dietas

suplementadas com 12,0% de lipídeo tais como, coloração parda e pontos esbranquiçados (Vicentini, C.A., 2004)*.

Observou-se ainda nesta tabela que houve interação significativa ($P < 0,05$) entre a vitamina C e o lipídeo para as porcentagens de extrato etéreo do filé e do fígado. Ressalta-se que houve aumento linear da porcentagem de extrato etéreo nos níveis de vitamina C, tanto para a suplementação com 8,0 como 12,0%. O mesmo efeito ocorreu para lipídeos nos diferentes níveis de suplementação de vitamina C, demonstrando efeito sinérgico desses nutrientes. Esta interação sugere que a atuação conjunta da vitamina C e lipídeo pode ter ocorrido por meio de sua ação antioxidante, o que teria favorecido a manutenção da integridade do lipídeo permitindo portanto que ocorresse maior depósito (Tabela 4).

Lovell (1998) descreveu esta ação antioxidante da vitamina C pela capacidade desta em economizar a vitamina E, reduzindo a peroxidação do lipídeo. Esta interação entre a vitaminas C e E foi descrita por Packer et al. (1979) os quais demonstraram que a vitamina C economiza a vitamina E pela regeneração desta por meio dos radicais de tocoferoxil. Por ser considerado potente agente redutor, o efeito antioxidante da vitamina C também foi descrito por Cadenas (1989) e Bielski e Richter (1975).

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas.

* Vicentini, C.A. Informação verbal. Bauru: Departamento Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Unesp, 2004.

Avaliando-se os parâmetros hematológicos apresentados, notou-se que os valores de eritrócitos e a porcentagem de hematócrito apresentaram diferença significativa quando da comparação do tratamento ausente de suplementação com a média do fatorial, não havendo diferença significativa para a taxa de hemoglobina, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média. A redução do hematócrito com a ausência de suplementação de vitamina C e/ou deficiência foi observado em bagre do canal (Andrews e Murai, 1975; Lim e Lovell, 1978), truta arco-íris (Albrektsen et al., 1988) e híbrido de tilápia (Shiau e Jan, 1992). De forma distinta, Sato et al. (1978) comparando a suplementação de 2000,0 mg de vitamina C/kg da dieta, com a ausência, não determinaram diferença significativa para esses parâmetros.

Não foi observada (Tabela 5) influência dos níveis de suplementação de vitamina C para os valores hematológicos, corroborando com os resultados obtidos por Lim et al. (2000) os quais não encontraram efeito significativo dos níveis de vitamina C na porcentagem de hematócrito. Contrariando o observado nesta pesquisa, Barros et al. (2002) observaram que existe influência do nível de vitamina C na porcentagem de hematócrito, sendo o valor deste, incrementado com o aumento do nível de vitamina C. Porém observaram que esse aumento ocorreu em virtude do maior volume globular médio das células, demonstrando que a vitamina C determinou a liberação de células imaturas na circulação. De forma semelhante, Shanks et al. (1991) demonstraram que em salmão “Coho”, *Oncorhynchus kisutch*, alimentados com dietas suplementadas com níveis de vitamina C acima do recomendado houve aumento do valor percentual do hematócrito.

A deficiência de vitamina C pode causar anemia nos peixes, pela redução e redistribuição do íon ferro, com conseqüente diminuição da síntese de hemoglobina, e pela

ocorrência de hemorragias (Albrektsen et al., 1988). A absorção do íon ferro no intestino e sua redistribuição para os diferentes tecidos, incluindo a síntese de hemoglobina, é facilitada pela vitamina C.

No tratamento ausente de suplementação de vitamina C (Tabela 5), apesar de não significativa, a taxa de hemoglobina está reduzida em relação aos demais tratamentos, podendo-se inferir que os peixes deste tratamento estavam progressivamente desenvolvendo quadro anêmico. Esta hipótese pode ser ainda reforçada pelos sinais de hemorragia apresentados pelos peixes ao redor da boca e nadadeiras. A não ocorrência de significância para a taxa de hemoglobina pode ser em virtude da duração do período experimental ter sido insuficiente, do balanço do íon ferro na composição da dieta e a concentração da vitamina C encontrada no fígado desses peixes estarem adequados até esse momento (Tabela 4) além das condições experimentais adequadas minimizando o consumo vitamina C.

Observando-se a concentração de vitamina C no fígado dos peixes (Tabela 4), notou-se que ocorreu efeito significativo ($P < 0,05$) da média do fatorial quando confrontado com o tratamento ausente de suplementação e ainda que houve efeito significativo da suplementação de vitamina C, demonstrando que a deficiência dessa vitamina não apenas influencia os parâmetros produtivos, mas também a reserva necessária para promover sua utilização normal pelo organismo e seu aporte para outros tecidos quando em situações adversas. Assim como observado no presente estudo, Hilton et al. (1978) afirmam que a concentração dessa vitamina no fígado dos peixes é influenciada diretamente pela concentração da dieta.

De maneira semelhante, El Naggar e Lovell (1991) e Guerin (1986), observaram que a concentração de ácido ascórbico no fígado de bagre do canal é representativa, alterando-se de acordo com o fornecido pela dieta. Igualmente, Nitzan et al. (1996) estudando o efeito da suplementação de ácido ascórbico polifosfatado (AAPP) em híbridos de tilápia encontraram concentração no fígado significativamente maior nos peixes que receberam suplementação de vitamina C em relação aos peixes que foram arraçoados com as dietas não suplementadas.

Em concordância com o afirmado acima, podemos observar que ocorreu efeito significativo dos níveis de suplementação de vitamina C na dieta sobre a quantidade de reserva da mesma no fígado (tabela 4), sendo que o acréscimo na suplementação determinou aumento da concentração desta neste órgão. Observou-se, ainda, que a suplementação de 600,0 mg de vitamina C não diferiu da suplementação de 1200,0 mg vitamina C/kg da dieta em relação à reserva, desta forma, pode-se inferir que existiu saturação do fígado quanto sua capacidade de reserva, e afirmar em termos econômicos, que a melhor reserva ocorreu com 600,0 mg/kg da dieta.

A importância da suplementação dessa vitamina em níveis maiores do que o recomendado para evitar sinais de deficiência e conseqüentemente determinar maior reserva foi afirmado por Eichbaum et al. (1977) e Navarre e Halver (1989), os quais enfatizaram que peixes com alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos apresentam melhor tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções por bactérias. No mesmo sentido, Li e Robinson (1994) estudando o efeito da suplementação de vitamina C em relação à concentração dessa vitamina nos tecidos de bagre do canal submetidos a temperaturas de 31,0 e 10,0°C, concluíram que a concentração desta vitamina no fígado cai

drasticamente (44,0%) quando os peixes estão sob situação de estresse, tal como a passagem do verão para o inverno. Ressaltaram, portanto, a importância de manter alta a reserva dessa vitamina em períodos que antecedem a queda de temperatura.

Halver et al. (1969) sugeriram para trutas arco-íris e para salmão “coho”, que a inclusão de níveis superiores aos recomendados como exigência devem ser acrescidos às dietas para determinar alta reserva nos tecidos e rápida cicatrização. Blom e Dabrowski (2000) determinaram a suplementação de 360,0 mg de vitamina C/kg da dieta para acará bandeira, *Pterophylum scalare*, para manter máximo estoque desta vitamina nos tecidos, proporcionando, assim, maior sobrevivência dos peixes nos aquários. Corroborando com este estudo Matusiewicz et al. (1995) afirmaram que a saturação da concentração dessa vitamina nos tecidos para enfrentar situações adversas é maior que o recomendado para proporcionar crescimento normal e prevenir sinais de deficiência.

Comprovando os resultados inferiores obtidos no desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e concentração de vitamina C no fígado dos peixes do tratamento ausente de suplementação em relação à média do fatorial, observou-se porcentagem inferior de colágeno nas vértebras dos peixes desse tratamento em relação aos peixes dos tratamentos que receberam suplementação (Figura 1). Da mesma forma notou-se formação irregular das vértebras dos peixes deste tratamento em relação aos demais, ocasionada pela baixa porcentagem de colágeno (Figuras 2 e 3), sugerindo início de lordose e escoliose.

A quantidade de colágeno contida nas vértebras de muitas espécies de peixes tem sido utilizada como indicador sub-clínico da deficiência de vitamina C (Wilson e Poe, 1973; Mustin e Lovell, 1992). Li e Robinsom (2001) sugeriram que porcentagem igual ou

inferior a 25,0% de colágeno na vértebra de bagre do canal é sinal de deficiência de vitamina C, enfatizando que a diminuição da porcentagem deste nas vértebras aparece anteriormente à ocorrência de sinais clínicos de deficiência como lordose, escoliose e/ou escorbuto. Jauncey et al. (1985) testaram três níveis de suplementação de ácido ascórbico (0,0; 125,0 e 400,0 mg de vitamina C/100g da dieta), em relação á cicatrização de ferimento na musculatura da tilápia do Nilo. Observaram processo de cicatrização acelerado nos peixes que receberam suplementação recomendada e acima em relação aos peixes que receberam suplementação abaixo da exigência. Segundo os autores, este fato confirmou a participação do ácido ascórbico na síntese de colágeno.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a energia adicional proveniente do lipídeo é depositada na cavidade abdominal na forma de gordura visceral; que a deposição desta gordura como reserva de energia para transpor o período de inverno foi obtida em todos os níveis de suplementação de lipídeo, sendo a suplementação com 8,0% a mais adequada; que a concentração de vitamina C no fígado é proporcional a concentração desta na dieta, porém, em função da capacidade de reserva do fígado a quantidade de 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta mostra-se a mais apropriada economicamente e que a ausência de vitamina C prejudicou a eritropoiese e a síntese de colágeno.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudo concedida e a SOCIL GUYOMARC'H INDÚSTRIA E COMÉRCIO Ltda pelo apoio científico.

REFERÊNCIAS

- Albrektsen, S., Lie, O., and Sanders, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 359-365.
- Andrews, J.W., and Murai, T. 1975. Studies of the vitamin C requirements of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 105: 557-561.
- A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17.ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Balfry, S.K., and Higgs, D.A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: Lim, C. and Webster, C. D. *Nutrition and fish health*. Haworth Press, New York, pp.213-225.
- Barros, M.M., Pezzato, L., and Kleemann, G.K. 2002. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, 31: 2149-2159.
- Beamish, F.H., and Medland, T.E. 1986. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 55: 35-42.

- Becker, K., Schreiber, S., Angoni, C., and Blum, R. 1999. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. *Aquaculture*, 174: 313-322.
- Bell, J.G., McVicar, A.H., Park, M.T., and Sargent, J.R. 1991. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.*, 121: 1163-1172.
- Bilinski, E., and Jonas, R.E.E. 1970. Effects of coenzyme A and L-carnitine on fatty acid oxidation in rainbow trout mitochondria. *J. Fish. Res.*, 27: 857-864.
- Blazer, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Ann. Rev. Fish. Dis.*, 309-323.
- Blom, J.H., and Dabrowski, K. 2000. Vitamin C requirement of the Angelfish, *Pterophylum scalare*. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 115-118.
- Boyd, C.E. 1990. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1990, 490pp.
- Castagolli, N., and Cyrino, J.E.P. 1986. Piscicultura nos trópicos. Manole, São Paulo, 149pp.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T., and Seikai, T. 1995. The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea bream fingerlings. *Fish Sci.*, 61: 1004-1008.

- Chou, B.S., and Shiau, S.Y. 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 143: 185-195.
- Dabrowski, K., and Moreau, R. 1996. Do all fish need ascorbic acid? *Fish, Feed & Nutr.*, 22: 96-98.
- Durve, V.S., and Lovell, R.T. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948-951.
- Eichbaum, F.W., Guedes, A.O., Neto, J.P., and Carvalho, F.V. 1977. Protecting effect of ascorbic acid in strychnine poisoning and in tetanus (fish, mice, rats). *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, 16: 31-39.
- El Naggar, G.O., and Lovell, R.T. 1991. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic for channel catfish. *J. Nutr.*, 121: 1622-1626.
- Fitzsimmons, K., Dickenson, G., Brand, C., and Davis, J. 1997. Effects of reducing dietary lipid levels on growth and body composition of hybrid tilapia in an intensive recirculating-water system. *Progr. Fish Cult.*, 59: 293-296.
- Gould, B.S. 1958. Biosynthesis of collagen III. The direct action of ascorbic acid on hydroxyproline and collagen formation in subcutaneous polyvinyl sponge implants in guinea pigs. *J. Biol. Chem.*, 232: 637pp.
- Graner, C.A.F. 1972. Determinação do cromo pelo método colorimétrico da s-difenilcarbazida. 112p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

- Guerin, M. 1986. Feeding elevated levels of ascorbic acid to channel catfish in ponds: Effects on tissue level of ascorbic acid and ascorbate-2-sulfate and on resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Auburn, Master's Thesis, Auburn University.
- Halver, J.E., Ashley, L.M., and Smith, R.M. 1969. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc., 98: 762-771.
- Hanley, F. 1991. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture, 93: 323-334.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y., and Slinger, S.J. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets of rainbow trout. J. Fish. Res. Board Can., 35: 431-436.
- Jain, N.C. 1986. Schalm's veterinary hematology. 4.ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1221pp.
- Jauncey, K., and Ross, B. 1982. A guide to tilapia feed and feeding. Institute of Aquaculture, University of Sterling, Scotland.
- Jauncey, K., Soliman, A., and Roberts, R.J. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). Aquacult. Fish. Manag., 16: 139-149.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. 1995. Princípios de bioquímica. Savier, São Paulo, 463pp.
- Lemly, A.D. 1996. Wastewater discharges may be most hazardous to fish during winter. Environ. Pollut., 32: 169-174.

- Li, M.H., and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123-131.
- Li, M.H., and Robinson, E.H. 1994. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Appl. Aquacult.*, 4: 59-71.
- Li, M.H., and Robinson, E.H. 2001. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. In: Lim, C., Webster, C. D., Nutrition and fish health. Haworth Press, New York, pp.163-175.
- Lim, C., and Lovell, R.T. 1978. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 108: 1137-1146.
- Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., and Robinson, E.H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313-327.
- Lovell, R.T. 1998. Nutrition and feeding of fish. 2.ed. Academic Press, Massachusetts, 267pp.
- Lovell, R.T., and Sirikul, B. 1974. Winter feeding of channel catfish. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Game Fish Comm.*, 28: 208-216.
- Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., and Matusiewicz, K. 1995. Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: Tissue saturation and compartmentalization model. *J. Nutr.*, 125: 3055-3061.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R., and Sakaguchi, M. 1995. Effect of vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Aquaculture*, 61: 501-506.

- Mustin, W.G., and Lovell, R.T. 1992. Na-L-Ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture*, 105: 95-100.
- Navarre, O., and Halver, J.E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- Nitzan, S., Angeoni, H., and Gur, N. 1996. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. *Israeli J. Aquacult.*, 48: 133-141.
- Packer, J.E., Slater, T.F., and Wilson, R.L. 1979. Direct observation of free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-738.
- Pandian, T.J., and Raghuraman, R. 1972. Effects of feeding rate on conversion efficiency and chemical composition of the fish *Tilapia mossambica*. *Mar. Biol.*, 1: 16-32.
- Panushi, R.S., and Delafuente, J.C. 1985. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet*, 45: 97-123.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M., and Pezzato, A.C. 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Brás. Zootec.*, 31: 1595-1604.
- Sato, M.R., Yoshinaka, R., and Yamamoto, S. 1978. Nonessentiality of ascorbic acid in the diet of carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1151-1156.
- Shanks, C.A., Wirkkula, J.R., and Rohovec, J.S. 1991. Effects of vitamin C on coho salmon infected with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). In: *Proceedings of the Second International Symposium. Viruses Lower Vertebrates*, 1991, Oregon.
- Shiau, S.Y., and Jan, F.L. 1992. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fish. Sci.*, 58: 671-675.

- Stickney, R.R. 1997. Tilapia nutrition, feeds and feeding. In: Costa-Pierce, B.A. and Rakocy, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. World Aquaculture Society, Luisiana, pp34-54.
- Takeuchi, T., Satoh, S, and Watanabe, T. 1983. Dietary lipids suitable for practical feed of *Tilapia nilotica*. Bull. Jpn. Sci. Fish., 49: 1361-1365.
- Torreele, E., Van Der Sluizen, A., and Verreth, J. 1993. The effect of dietary L- carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid. J. Nutr., 69: 289-299.
- Viola, S., and Amidan, G. 1980. Observations on the accumulation of fat in carp and Sarotherodon (Tilapia) fed oil-coated pellets. Bamidgeh, 32: 33-40.
- Wang, X.Y., Ming-Long, L., Hung, T.H., and Seib, P.A. 1988. Liquid chromatographic determination of L-ascorbate 2-polyphosphate in fish feeds by enzymatic release of L-ascorbate. J. Assoc. Off. Anal. Chem, 71: 1158-1161.
- Wilson, R.P., and Poe, W.E. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic catfish. J. Nutr., 103: 1359-1364.
- Wedemeyer, G. 1969. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. Comp. Biochem. Physiol., 29: 1247-1251.
- Yassin, N. 2001. Análise de experimentos fatoriais de dois fatores com tratamentos adicionais. 161 pp. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

Zannoni, V.G., Holsztynska, E.J., and Lau, S.S. 1982. Biochemical functions of ascorbic acid: chemistry, metabolism, and uses. American Chemical Society, Washington, D.C., USA.

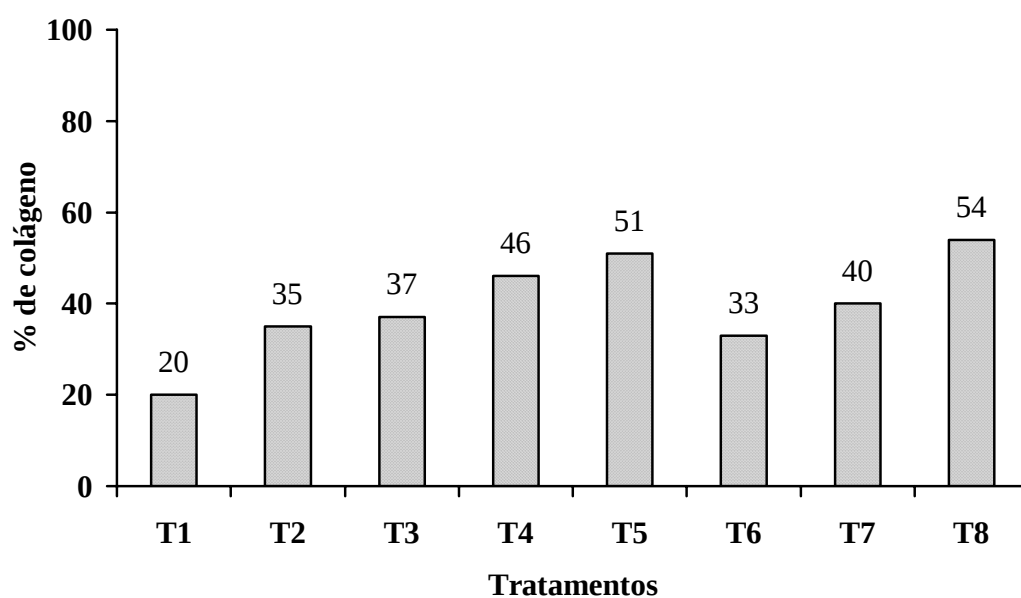


Figura 1. Histograma da porcentagem média de colágeno nas vértebras de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas contendo diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas. T1 = 0mg vit C/0% lip; T2 = 125mg vit C/6% lip; T3 = 300mg vit C/8% lip; T4 = 600mg vit C/8% lip; T5 = 1200mg vit C/8% lip; T6 = 300mg vit C/12% lip; T7 = 600mg vit C/12% lip; T8 = 1200mg vit C/12% lip.

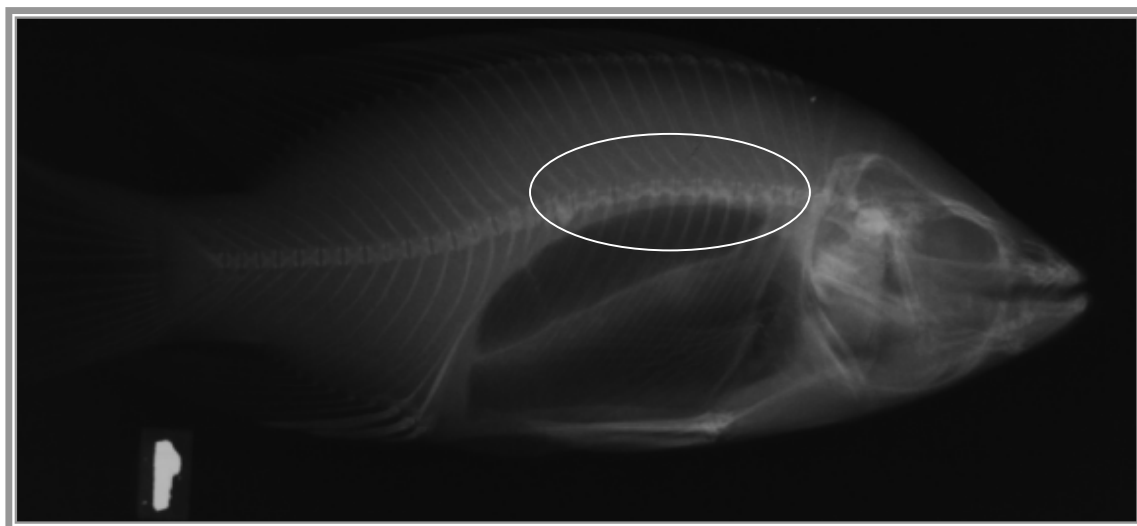


Figura 2. Rx do peixe arraçoado com a dieta ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo.

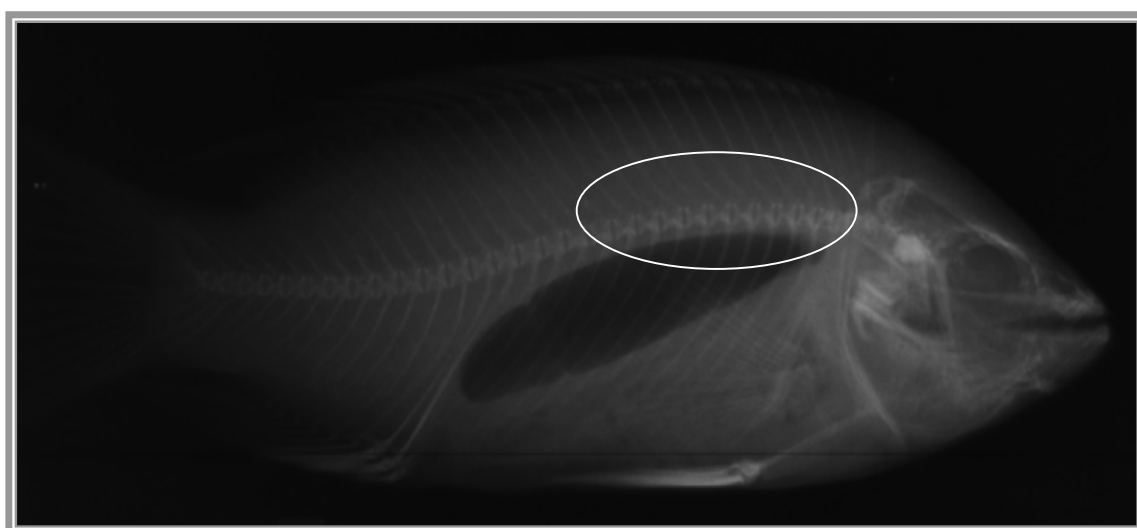


Figura 3. Rx do peixe arraçoado com a dieta suplementada com vitamina C e lipídeo.

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais

Ingrediente	Tratamentos							
	0mg	125mg	300mg	600mg	1200mg	300mg	600mg	1200mg
	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C
	0% lip	6% lip	8% lip	8% lip	8% lip	12% lip	12% lip	12% lip
Farelo soja	54,88	56,27	56,74	56,74	56,80	57,65	57,08	57,70
Glúten milho	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha peixe	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Fubá milho	24,10	16,67	14,15	14,07	13,84	9,24	9,13	8,94
Farelo trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo soja	---	6,00	8,00	8,00	8,00	12,00	12,00	12,00
Fosfato bicálcico	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Suplem vit e min ¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
VIT C ³	---	0,04	0,09	0,17	0,34	0,09	0,17	0,34
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100

¹ Suplemento vitamínico e mineral (Socil Guyomarc'H Indústria e Comércio Ltda): Vitamina A, 1.200.000

UI; Vitamina D₃, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K₃, 2.400 mg; Vitamina B₁, 4.800 mg;

Vitamina B₂, 4.800 mg; Vitamina B₁₂, 4.800 mcg; Vitamina B₆, 4.800 mg; **Vitamina C, zero⁴**; Pantotenato de

cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g;

Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês,

20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; ² Antioxidante; ³ Vitamina

C 35,0% ativa; ⁴ Adequado à pesquisa.

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas e da carcaça dos peixes

Composição	Tratamentos							
	0mg	125mg	300mg	600mg	1200mg	300mg	600mg	1200mg
	vit C 0% lip	vit C 6% lip	vit C 8% lip	vit C 8% lip	vit C 8% lip	vit C 12% lip	vit C 12% lip	vit C 12% lip
PB (%) ¹ **	36,05	36,12	35,70	34,97	35,69	36,20	36,50	36,03
PD (%) ² **	32,39	32,50	31,42	31,38	31,53	31,89	32,14	31,90
EB (kcal/kg) ³ **	4640,10	4702,04	4809,71	4858,14	4853,41	5192,06	5184,51	5157,60
ED (kcal/kg) ⁴ **	3781,22	3908,81	4047,85	4074,04	3986,70	4094,76	4204,11	4153,93
EE (%) ⁵ **	2,79	8,88	10,89	10,81	10,68	14,59	14,44	14,68
FB (%) ⁶ *	4,28	4,19	4,16	4,16	4,16	4,12	4,12	4,12
Ca total (%) ⁷ *	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17	1,18	1,18	1,18
FD (%) ⁸ *	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Metionina (%) *	0,62	0,62	0,60	0,62	0,62	0,61	0,61	0,61
AA (%) ⁹ *	1,14	1,13	1,13	1,13	1,13	1,12	1,12	1,12
VIT C (mg/kg) ¹⁰ **	ND ¹¹	189,00	360,00	527,00	1247,00	331,00	493,00	1108,00
Cinza (%) **	9,22	9,55	9,93	9,14	8,90	9,67	10,05	9,94
Composição ¹²	Carcaça							
Umidade (%) **	75,69	75,85	75,19	75,66	75,16	75,18	74,87	74,80
PB (%) **	17,52	17,58	16,30	16,91	16,33	15,88	14,49	15,28
EE (%) **	3,52	3,74	3,85	4,08	4,31	5,02	5,47	6,13
Cinza (%) **	2,34	2,32	2,29	2,19	2,33	2,09	2,21	2,04

¹ Proteína bruta; ² Proteína digestível; ³ Energia bruta; ⁴ Energia digestível; ⁵ Extrato etéreo; ⁶ Fibra bruta;

⁷ Cálcio total; ⁸ Fósforo disponível; ⁹ Aminoácidos sulfurados; ¹⁰ Vitamina C (35,0% ativa); ¹¹ Não determinado; ¹² Matéria úmida; * Calculado; ** Determinado.

Tabela 3. Valores médios de ganho de peso por peixe (GPP), consumo aparente da dieta, conversão alimentar aparente (CAA), gordura visceral (GV) e índice de gordura visceral (IGV) de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	GPP (g)	Consumo (g)	CAA	GV (g)	IGV
0	0	86,06 (± 10,05)	117,37 (± 4,28)	1,37 (± 0,05)	0,43 (± 0,36)	0,42 (± 0,22)
125	6	96,29 (± 33,19)	120,80 (± 4,60)	1,27 (± 0,03)	1,71 (± 0,54)	1,29 (± 0,22)
300	8	92,63 (± 31,43)	112,86 (± 7,25)	1,22 B (± 0,07)	1,73 (± 0,26)	1,23 B (± 0,23)
600		104,99 (± 37,99)	119,70 (± 4,33)	1,14 B (± 0,03)	1,86 (± 0,68)	1,55 B (± 0,21)
1200		101,70 (± 49,40)	118,47 (± 5,06)	1,17 B (± 0,02)	2,02 (± 1,49)	1,46 B (± 0,35)
300		103,09 (± 47,73)	113,94 (± 8,16)	1,06 A (± 0,03)	2,75 (± 1,90)	2,01 A (± 0,37)
600	12	104,65 (± 34,13)	113,53 (± 4,54)	1,09 A (± 0,04)	2,70 (± 1,71)	1,97 A (± 0,35)
1200		101,04 (± 33,35)	112,10 (± 4,34)	1,11 A (± 0,05)	2,89 (± 1,10)	2,10 A (± 0,37)
² Cont. 1 vs Fatorial		0,05	ns	0,01	0,01	0,01
³ Cont. 2 vs Fatorial		ns	ns	0,05	0,05	0,05
Vit C ⁴		ns	ns	ns	ns	ns
300		97,86	113,40	1,14	2,24	1,62
600		104,82	116,62	1,12	2,28	1,76
1200		101,55	115,29	1,14	2,46	1,78
	Lip ⁵	ns	ns	0,01	ns	0,05
	8	99,77	117,01	1,18	1,87	1,41
	12	102,93	113,19	1,09	2,78	2,03
Vit C x Lip ⁶		ns	ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatorial, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatorial, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 4. Valores médios da porcentagem de extrato etéreo (EE) no filé, no fígado, concentração de vitamina C no fígado e índice hepatossomático (IHS) de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	EE Filé (%)	EE Fígado (%)	Vit C Fígado (µg/g)	IHS
0	0	1,01 (± 0,02)	11,23 (± 0,13)	120,85 (± 13,60)	1,19 (± 0,04)
125	6	1,12 (± 0,02)	11,57 (± 0,07)	313,18 (± 19,60)	1,39 (± 0,12)
300	8	1,28 Bb (± 0,05)	12,11 Bc (± 0,07)	280,19 b (± 24,30)	1,42 (± 0,13)
600		1,42 Ba (± 0,05)	12,40 Bb (± 0,18)	480,39 a (± 46,90)	1,47 (± 0,16)
1200		1,45 Ba (± 0,03)	12,68 Ba (± 0,22)	510,00 a (± 32,90)	1,38 (± 0,14)
300		1,73 Ab (± 0,12)	15,60 Ac (± 0,03)	340,43 b (± 63,70)	1,46 (± 0,11)
600	12	1,94 Aa (± 0,04)	17,90 Ab (± 0,10)	450,52 a (± 71,80)	1,33 (± 0,11)
1200		2,02 Aa (± 0,09)	18,89 Aa (± 0,01)	490,47 a (± 61,80)	1,37 (± 0,14)
² Cont. 1 vs Fatorial		0,05	0,05	0,05	0,05
³ Cont. 2 vs Fatorial		0,05	0,05	0,05	ns
Vit C ⁴		0,05	0,05	0,05	ns
300	Lip ⁵	1,51	13,86	310,31	1,44
600		1,68	15,15	465,46	1,40
1200		1,74	15,79	500,24	1,38
		0,05	0,05	ns	ns
	8	1,38	12,40	423,53	1,42
	12	1,90	17,46	427,14	1,39
Vit C x Lip ⁶		0,05	0,05	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatorial, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatorial, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 5. Valores médios de eritrócitos (Erit), hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de alevinos de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C durante 16 semanas¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Erit (10 ⁶ /μL)	Htc (%)	Hb (g/dL)	VGM ² (fL)	CHGM ³ (%)
0	0	1,67 (± 0,17)	27,10 (± 1,20)	7,75 (± 0,75)	163,25 (± 15,06)	28,30 (± 2,69)
125	6	1,92 (± 0,11)	29,40 (± 0,92)	8,33 (± 0,58)	153,93 (± 7,30)	29,09 (± 1,26)
300	8	1,94 (± 0,14)	28,26 (± 0,17)	8,17 (± 0,56)	145,67 (± 9,15)	28,91 (± 2,02)
600		2,09 (± 0,20)	29,20 (± 1,29)	7,65 (± 0,33)	139,71 (± 13,16)	26,20 (± 1,62)
1200		1,99 (± 0,10)	30,27 (± 2,01)	7,96 (± 0,34)	152,11 (± 13,78)	26,30 (± 2,27)
300		1,98 (± 0,19)	29,50 (± 1,82)	8,22 (± 0,80)	148,99 (± 10,71)	27,86 (± 1,16)
600	12	1,98 (± 0,17)	29,00 (± 1,07)	8,00 (± 0,49)	146,46 (± 7,28)	27,59 (± 2,81)
1200		1,97 (± 0,17)	29,17 (± 1,83)	8,01 (± 0,41)	162,82 (± 15,75)	27,18 (± 1,55)
⁴ Cont. 1 vs Fatorial		0,01	0,05	ns	ns	ns
⁵ Cont. 2 vs Fatorial		ns	ns	ns	ns	ns
Vit C ⁶		ns	ns	ns	ns	ns
300		1,96	28,88	8,20	147,33	28,39
600		2,04	29,10	7,83	141,47	26,90
1200		1,98	29,72	7,99	157,47	26,74
	Lip ⁷	ns	ns	ns	ns	ns
	8	2,01	29,24	7,92	145,83	27,14
	12	1,98	29,22	8,08	152,76	27,54
Vit C x Lip ⁸		ns	ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ²VGM=[(Htc/Erit)*10]; ³CHGM=[(Hb/Htc)*100]; ⁴ Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatorial, nível P; ⁵ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatorial, nível P; ⁶ Efeito da vitamina C, nível P; ⁷ Efeito do lipídeo, nível P; ⁸ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Lipídeo e vitamina C na formação e mobilização de ácidos graxos em tilápia do Nilo

***Oreochromis niloticus* submetidas à baixa temperatura**

Resumo: Foram avaliados, ao início e final do período experimental, o efeito da suplementação de diferentes níveis de lipídeo e vitamina C no peso corporal, gordura visceral, índice de gordura visceral, extrato etéreo do fígado, concentração plasmática de triacilglicerol, ácidos graxos da gordura visceral, além do consumo da dieta e ácidos graxos da dieta e filé. O experimento foi conduzido num esquema fatorial 2 x 3, com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com três repetições para cada tratamento, mais dois tratamentos, ausente de suplementação dos nutrientes testes e acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Foram confeccionadas oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível. Os peixes foram distribuídos em 24 aquários, quatro peixes/aquário, com peso médio de $112,18 \pm 9,16$ g. A água dos aquários permaneceu a 18,0°C durante 32 dias. Conclui-se que o excesso de lipídeo deposita-se principalmente na forma de gordura visceral; que a tilápia do Nilo é capaz de mobilizar a reserva lipídica para atender a demanda energética requerida em temperatura baixa até 8,0% de suplementação de lipídeo; que a vitamina C interfere no metabolismo lipídico, onde a suplementação de 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta permite maior mobilização das reservas lipídicas, além de possível prevenção da peroxidação de lipídeos no fígado e que a tilápia do Nilo é capazes de alongar e dessaturar as cadeias carbônicas dos ácidos graxos poliinsaturados da dieta, além de redistribuí-los e utilizá-los de acordo com as necessidades metabólicas.

Palavras-chave: ácidos graxos, lipídeo, vitamina C, temperatura, mobilização

Lipid and vitamin C on formation and mobilization of fatty acids in Nile tilapia

***Oreochromis niloticus* under low temperature**

Abstract: It were evaluated, at the beginning and at the end of experimental period, the effect of different levels of lipid and vitamin C on the body weight, visceral fat, visceral fat index, liver ether extract, plasmatic triacilglycerol concentration, fatty acids of visceral fat, as well feed consumption and fatty acids of diet and filet. The experiment was conducted in factorial design 2 x 3, two levels of lipid (8.0 and 12.0%) and three levels of vitamin C (300.0; 600.0 and 1,200.0 mg of vitamin C/kg diet), with three replicates each treatment, plus two treatments, absence of test nutrients supplementation and supplemented with 6.0% of lipid and 125.0 mg of vitamin C/kg diet. Eight experimental practical diets were formulated to contain 32.0% of digestible protein. Fish were stocked in 24 40-l aquaria at a density of four fish/aquarium, with average weight of 112.18 ± 9.16 g. Water temperature was kept at 18.0°C during 32 days. It was concluded that the lipid excess it is mainly deposited as a visceral fat; that occurs lipid mobilization at temperature below comfort until 8.0% of lipid; that vitamin C interferes on lipid metabolism, so that the highest levels of supplementation 600.0 and 1200.0 mg de vitamin C/kg allowed a bigger lipid reserve mobilization besides the possible lipid peroxidation prevention in the liver and that Nile tilapia is capable in elongate and desaturate, besides redistribute and use according the necessity.

Keywords: fatty acid, lipid, vitamin C, temperature, mobilization

1. Introdução

A utilização de dieta corretamente balanceada para as diferentes fases de crescimento dos peixes tem por objetivo atender as suas reais necessidades nutricionais, possibilitando desta forma, melhores respostas de desempenho produtivo e de saúde, além de resultar num produto compatível com as necessidades de mercado, seja pelo preço final do produto ou por suas qualidades organolépticas. Entretanto, tal formulação deve ser suficiente para suprir a demanda de nutrientes durante as diversas fases de crescimento e atender as diferentes necessidades metabólicas, sem prejudicar os processos fisiológicos.

Os lipídeos e carboidratos da dieta devem propiciar aporte de energia para atendam as necessidades fisiológicas imediatas e de períodos de maior demanda energética. Assim, durante o período de inverno, tais reservas poderiam ser utilizadas como fonte de energia sem que ocorra prejuízo dos demais nutrientes.

Os lipídeos correspondem ao depósito primário de energia, onde se acumulam na forma de ácidos graxos ésteres de glicerol, podendo ser utilizados em situações desfavoráveis (Castagnolli e Cyrino, 1986; Stickney em Costa-Pierce e Rakocy, 1997). Lemly (1996) observou, durante o inverno, que as reservas lipídicas tiveram a mobilização acelerada e foram, portanto esgotadas, demonstrando a necessidade de reserva adequada para não deteriorar as condições corporais. Lovell e Sirikul (1974) relataram perda de peso do bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, no período de inverno decorrente da redução da gordura corporal.

El-Sayed e Garling (1988) destacaram que a tilápia possui habilidade de utilizar carboidrato e lipídeo como fonte de energia. Porém Jauncey e Ross (1982), relataram que tilápias não toleram altos níveis de lipídeos como salmonídeos, podendo apresentar supressão

dos parâmetros produtivos quando alimentadas com dietas suplementadas com níveis acima de 12,0%.

Durante situações adversas os peixes utilizam energia proveniente das reservas para manter os processos metabólicos. Assim, durante períodos de jejum, a reserva lipídica nos tecidos oferece excelente aporte energético, sendo a maior fonte frente a outros nutrientes (Chang e Idler, 1960).

Segundo Miyasaki et al. (1995) a vitamina C atua na síntese da carnitina a partir da lisina e metionina, ocasionando, dessa maneira, maior catabolismo lipídico no fígado e músculo. Chien e Hwang (2001) afirmaram que dietas suplementadas com vitamina C reduziram significativamente a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados e aumentaram a porcentagem de ácidos graxos saturados no fígado de “thornfish”, *Terapon jarbua*.

Segundo Takeuchi et al. (1983) dietas suplementadas com óleos vegetais (óleo de soja) ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série n-6, proporcionaram melhor performance em relação aos demais óleos nos peixes de água doce. Bell et al. (1991) observaram que dietas contendo altas concentrações de n-3 e n-6 podem aumentar a resistência em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, para transpor períodos de estresse.

A temperatura da água pode influenciar na mudança da homeostase dos peixes, com conseqüente alteração da composição dos ácidos graxos dos tecidos, buscando manter o funcionamento dos processos metabólicos. De maneira semelhante, Hwang e Lin (2002) afirmaram que a temperatura da água e a suplementação de vitamina C influenciam na composição e peroxidação dos ácidos graxos do hepatopâncreas e músculo da carpa comum, *Cyprinus carpio*.

Os peixes são capazes de manter e/ou alterar a composição de ácidos graxos do fígado e músculo, com a finalidade de manter os processos fisiológicos e metabólicos durante períodos de jejum ou nos meses de inverno, onde períodos de jejum fazem parte do ciclo de

vida de diversas espécies de peixes. Paralelamente, a porcentagem de determinados ácidos graxos na gordura visceral tende a oscilar. (Webster et al., 1994; Jezierska et al., 1982; Skuladottir et al., 1990).

A importância da produção comercial de tilápia e o entendimento da nutrição sob condições abaixo da ideal e ou desfavoráveis vem se tornando linha de pesquisa bastante interessante, juntamente com a utilização de dietas práticas, as quais, são próximas ao utilizado pelas indústrias de rações e conseqüentemente pelos produtores. Assim, estudos que atendam estas condições são necessários e de extrema importância. Dessa maneira, a pesquisa teve por objetivo avaliar a formação, a mobilização de reservas de energia e a variação na composição de ácidos graxos da tilápia do Nilo, submetidas à temperatura abaixo da considerada ideal para a espécie.

2. Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, AquaNutri – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP, Câmpus de Botucatu, laboratório associado ao Centro de Aquicultura da UNESP, consistindo de período pré-experimental de 112 dias e período experimental de 32 dias.

No período pré-experimental, com objetivo de formar reservas corpóreas de vitamina C e lipídeo possíveis de serem utilizadas em situações adversas, foi utilizado um lote de 192 alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes da mesma desova e revertidos sexualmente, com peso médio de $5,57 \pm 0,50$ g distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 200 L cada, numa densidade de seis peixes por tanque-rede. Esses foram dispostos em oito aquários de 1000 L, quatro tanques-rede por aquário. O conjunto de aquários foi dotado de sistema de aquecimento controlado por termostato, mantendo-se a

temperatura dentro da faixa de conforto ($26,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) (Boyd, 1990) e sistema de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. As análises físico-químicas da água dos aquários e a sifonagem para retirada de eventuais resíduos de rações e excretas foram realizadas semanalmente.

O experimento foi conduzido num esquema fatorial 2×3 , com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com quatro repetições para cada tratamento. Além de dois tratamentos adicionais, sendo o primeiro ausente de suplementação dos nutrientes testes e o segundo acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. A vitamina C utilizada foi a polifosfatada com 35,0% de atividade (Stay-C[®] Roche) e a fonte de lipídeo utilizada foi o óleo de soja comercial.

Foram confeccionadas oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível (Tabela 1). O suplemento vitamínico e mineral utilizado foi isento de vitamina C, sendo considerada como fonte somente o adicionado à dieta. As dietas foram peletizadas e armazenadas em congelador ($-20,0^{\circ}\text{C}$) objetivando evitar perdas da vitamina C pelo processo de oxidação. A essas dietas foram efetuadas análises químico-bromatológicas para determinação da proteína bruta, energia bruta e extrato etéreo de acordo com o protocolo da AOAC (2000). Foram realizadas análises da concentração de vitamina C em cromatógrafo líquido (HPLC) e composição de ácidos graxos de cadeia longa por meio do cromatógrafo a gás – 14B – Shimadzu, coluna capilar, sílica fundida, OMEGAWAX 250.

No final do período pré-experimental e conseqüentemente início do período experimental, foram coletados aleatoriamente seis peixes por tratamento pesados em balança de precisão (0,01 g) e posteriormente sacrificados utilizando-se superdosagem do anestésico benzocaína. Após esse procedimento foi retirada a gordura visceral de cada peixe, pesada e

congelada a $-20,0^{\circ}\text{C}$ para posterior análise da composição de ácidos graxos. Foi também calculado o índice de gordura visceral IGV = $[(\text{peso gordura (g)}/\text{peso corporal (g)}) \times 100]$.

Dos mesmos peixes ainda foram retirados o filé para determinação da composição dos ácidos graxos. As análises da composição dos ácidos graxos tanto da gordura visceral quanto do filé foram efetuadas utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente para as dietas.

Para a quantificação do triacilglicerol plasmático foram retirados seis peixes por tratamento, anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e realizada coleta de sangue com auxílio de seringa de 1,0 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%) através do vaso caudal. Posteriormente a coleta, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada para separação do plasma e determinação do triacilglicerol pelo método colorimétrico (Kit Triglicérides GPO-ANA ENZ. 4x50 – Labtest-Met).

Para transição da fase pré-experimental para a fase experimental, 96 peixes foram aleatoriamente redistribuídos em três aquários por tratamento com quatro peixes cada, totalizando 12 peixes por tratamento, com peso médio de $112,18 \pm 9,16$ g. Na mesma estrutura da fase pré-experimental, os peixes permaneceram por mais sete dias, onde a temperatura da água dos aquários foi reduzida gradativamente de $26,0$ para $18,0^{\circ}\text{C}$, com a finalidade de igualar a temperatura da água desses aquários com a água dos aquários da sala refrigerada.

Após este procedimento, os peixes foram transferidos para sala refrigerada com 24 aquários de 40 L cada, numa densidade de quatro peixes/aquário, mantendo-se o mesmo delineamento experimental anteriormente descrito. Com a temperatura dos aquários mantida a $18,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, cada aquário foi provido de biofiltro e aeração, permanecendo os peixes nessas condições por 25 dias. Os peixes foram alimentados com as mesmas dietas do período pré-experimental duas vezes ao dia.

Encerrado o período experimental os peixes foram pesados e quantificado o consumo aparente da dieta. Posteriormente foram efetuadas as mesmas análises do início do período experimental, excetuando-se a composição de ácidos graxos do filé.

A análise estatística foi realizada por meio da técnica da ANOVA para o esquema fatorial 2 x 3, com dois tratamentos adicionais no delineamento inteiramente casualizado, complementado com os testes de Scheffé e Tukey (estrutura fatorial) (Yassin, 2001). Os parâmetros determinados no início e final do período experimental foram avaliados por meio da análise de medidas repetidas dos perfis médios dos tratamentos, complementada com a construção dos intervalos simultâneos (Johmson e Wichern, 1992).

3. Resultados e discussão

No decorrer do período experimental a temperatura da água dos aquários foi mantida a $18,0 \pm 0,5$ °C, valor médio característico do período de inverno da região sudeste do Brasil. Os níveis médios de oxigênio dissolvido mantiveram-se entre $7,5 \pm 0,5$ mg/L e o pH de $7,0 \pm 0,5$, valores esses considerados adequados para a espécie (Boyd, 1990).

Os valores médios (inicial e final) do peso corporal, da gordura visceral (GV) e do índice de gordura visceral (IGV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C e submetidos à temperatura inferior a faixa de conforto térmico, estão apresentados na Tabela 2.

Analisando-se os parâmetros no período que antecede a queda de temperatura (valor inicial), notou-se efeito significativo ($P < 0,01$) na quantidade de gordura visceral dos peixes do tratamento ausente de suplementação em relação à média dos demais tratamentos (fatorial). Apesar de não significativo o efeito do lipídeo sobre os diferentes níveis

suplementados, pode-se inferir aplicando-se o índice relativo de comparação (IRC) e considerando o tratamento suplementado com 8% de lipídeo como 100%, que houve deposição de gordura visceral 25,0% maior nos peixes suplementados com 12% de lipídeo. Esses resultados confirmaram os observados por Hanley (1991) o qual, afirmou que a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é hábil em armazenar quantidades significativas de gordura na cavidade abdominal e na carcaça.

Corroborando com estes resultados, uma vez que pretendesse avaliar a suplementação de lipídeo com intuito de fornecer reserva de energia para transpor situações onde se necessita de aporte energético maior e/ou a disponibilidade de alimento é reduzida (inverno e estresse), analisou-se o índice de gordura visceral, o qual, considera o peso do peixe em relação à gordura depositada na cavidade visceral. Desta maneira verificou-se efeito significativo tanto dos peixes do tratamento ausente de suplementação ($P < 0,01$) quanto do suplementado com 6% de lipídeo ($P < 0,05$) em relação à média do fatorial, demonstrando que a suplementação de lipídeo acima do utilizado pelas indústrias de rações, promoveu aumento do índice de gordura visceral como consequência do maior depósito de gordura e da quantidade de energia digestível apresentada ser elevada nesses tratamentos (Tabela 1).

Observou-se ainda efeito significativo do lipídeo quando da comparação entre a inclusão de 8,0 e 12,0%, onde a maior suplementação determinou aumento no índice de gordura visceral. Entretanto, a suplementação de 12,0% de lipídeo depositou gordura visceral considerada excessiva macroscopicamente, quando comparada aos demais tratamentos, podendo ser prejudicial na utilização prolongada desta dieta.

Hanley (1991) em experimento conduzido com tilápia do Nilo não encontrou efeito significativo em relação ao ganho de peso quando o nível de lipídeo foi acrescido de 5,0 para 12,0%, porém determinou aumento significativo na quantidade de gordura da carcaça e das vísceras, semelhante ao encontrado nesse estudo. Pesquisas com outras espécies como truta

arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (Lee e Putnam, 1973), híbrido de bagre africano, *Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*, (Jantrarotai et al., 1994) e tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, (El-Dahhar e Lovell, 1995), também apresentaram respostas semelhantes.

Chou e Shiau (1996) conduziram experimento com híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de lipídeo em relação ao tratamento ausente de suplementação. Estes autores não encontraram diferença significativa entre 5,0 e 15,0% para o ganho de peso, mas observaram significativo acúmulo de gordura visceral à medida que se elevou os níveis de lipídeo na dieta.

De acordo com a literatura, a maioria dos peixes utiliza eficientemente o lipídeo como fonte de energia, mas a suplementação com altos níveis segundo El-Sayed e Garling (1988) e Ellis e Reigh (1991) pode suprimir o crescimento dos mesmos. Nesse sentido, segundo Jauncey e Ross (1982), as tilápias não toleram altos níveis de lipídeos como os salmonídeos, podendo apresentar supressão dos parâmetros produtivos quando alimentadas com dietas suplementadas com níveis acima de 12,0%.

Os resultados da presente pesquisa corroboram com os apresentados pela literatura, demonstrando que a tilápia do Nilo direciona a parcela do lipídeo que não é aproveitada durante o metabolismo, para ser depositado na cavidade abdominal, uma vez que não aproveita toda a energia adicional proveniente do lipídeo para o crescimento.

Analisando-se os parâmetros posteriores ao período onde os peixes permaneceram em temperatura inferior a de conforto para a espécie (valor final) (Tabela 2), observou-se igualmente para a quantidade de gordura visceral efeito significativo ($P < 0,01$) dos peixes do tratamento ausente de suplementação em relação à média dos demais tratamentos (fatorial). Diferentemente ao ocorrido antes da redução da temperatura, houve efeito significativo

($P < 0,05$) do tratamento suplementado com 6,0% de lipídeo em relação à média do fatorial. Apesar da não significância dos diferentes níveis de suplementação de lipídeo, pode-se observar aumento de 54,6% na quantidade de gordura visceral depositada nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com 12,0% de lipídeo em relação a 8,0%, demonstrando aparente dificuldade em mobilizar esta reserva energética.

No entanto, apesar de não significativo, houve diminuição na quantidade de gordura apenas nos tratamentos suplementados com 8,0%, quando se comparou o momento inicial e final. Destaca-se desta maneira, que a tilápia do Nilo, se alimentada com dietas contendo altos níveis de lipídeo, pode apresentar características indesejáveis, como excesso de gordura visceral, a exemplo do encontrado na presente pesquisa, quando da suplementação com 12,0%.

Analisando-se o índice de gordura visceral após o período de queda da temperatura da água, observou-se efeito significativo tanto do tratamento ausente de suplementação ($P < 0,01$) como do suplementado com 6,0% de lipídeo ($P < 0,05$) quando comparados com a média do fatorial. Observou-se também a existência de efeito significativo de momento (antes e após a diminuição da temperatura), com tendência de diminuição do índice de gordura visceral na suplementação de 8,0% de lipídeo, mas apenas efeito significativo para os tratamentos suplementados com 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Esse efeito pode ser evidenciado pela diminuição da gordura visceral dos tratamentos suplementados com 8,0% de lipídeo.

Desta maneira, os resultados apresentados demonstraram que ocorreu mobilização de parte da reserva de gordura visceral proveniente do período anterior a queda de temperatura, permitindo-se afirmar que a reserva de gordura supriu parte da necessidade energética do peixe neste período. Os resultados desta pesquisa confirmam os de Webster et al. (1994), os quais relataram que em bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, submetidos ao jejum, a

quantidade de gordura visceral reduziu em 30,0% e a porcentagem de lipídeo no fígado diminuiu depois de 20 dias. Igualmente, Lemly (1996) avaliando fatores estressores aos peixes durante o inverno, afirmou que as reservas lipídicas tiveram mobilização acelerada sendo, portanto esgotadas. Destacando ainda que se a demanda for elevada e essas reservas terminarem, as condições corporais serão deterioradas e o peixe poderá morrer.

Contrariamente ao relatado para 8,0%, a suplementação de 12,0% de lipídeo mostrou ser excessiva neste estudo, uma vez que proporcionou após o período de diminuição da temperatura índice de gordura visceral semelhante ao período inicial, em virtude da não alteração da reserva depositada na cavidade abdominal (Tabela 2). Esses resultados confirmam os de Hanley (1991), o qual destacou a capacidade da tilápia do Nilo em armazenar gordura na cavidade abdominal, porém afirmou que a espécie não é capaz de utilizar essa reserva eficientemente para crescimento.

Segundo Viola et al. (1980) o aumento do nível de lipídeo nas dietas de híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, resultou em maior depósito de gordura nas vísceras e não no filé. Fitzsimmons et al. (1997) estudando o efeito da redução nos níveis de lipídeo da dieta na composição final da carcaça de híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, demonstraram que no final da produção não ocorreu redução significativa dos níveis de lipídeo no filé, mesmo com o fornecimento de dieta com menor suplementação, dificultando desta forma a comercialização desse produto em virtude da possível diminuição da vida útil. Essa observação também foi relatada por Cowey e Sargent (1972), os quais destacaram que o excesso de lipídeo na carcaça diminui a vida útil do produto comercializado e conseqüentemente gera prejuízo econômico.

Segundo Jobling (1994) peixes que mantêm reserva lipídica no músculo, provavelmente começam a mobilizá-la imediatamente após diminuição da oferta de alimentos e conseqüente baixa ingestão, mas quando o lipídeo muscular é constituído em sua maioria da

classe estrutural (fosfolípido), este se mantém inalterado, ocorrendo mobilização da proteína muscular e das outras classes de lipídeos.

A quebra inicial do lipídeo com intuito de fornecer energia para o peixe ocorre invariavelmente na classe dos lipídeos de reserva (triacilglicerol). Dessa maneira, a variação total do lipídeo ocorre essencialmente no triacilglicerol, podendo determinar aumento na proporção das demais classes de lipídeo (Leger, 1985). No mesmo sentido, Sheridan (1988) relatou que a mobilização de lipídeo é resultado da ativação de enzima lipolítica, a qual, resulta na hidrólise da reserva de triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol. Love (1980) destacou que a reserva de energia na forma de triacilglicerol no músculo da tilápia é comparativamente pequena em relação à quantidade total de lipídeo, sendo a grande maioria estrutural, como fosfolípido de membrana. Demonstrando assim, que ocorre pequena alteração na quantidade deste nutriente do file, em função da classe de lipídeo presente.

Os valores médios (inicial e final) de extrato etéreo do fígado (EE), concentração plasmática de triacilglicerol e consumo aparente da dieta de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos à temperatura inferior à faixa de conforto térmico, estão apresentados na Tabela 3.

Observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) dos tratamentos ausente de suplementação e suplementado com 6,0% de lipídeo e 125,0 mg vitamina C/kg da dieta em relação à média do fatorial para porcentagem de extrato etéreo no fígado antes da diminuição da temperatura (valor inicial). Essa diferença ocorreu em razão da suplementação em níveis elevados de lipídeo na dieta, o que disponibilizou maior energia digestível dos tratamentos que receberam suplementação (fatorial) (Tabela 1). Verificou-se, também, (Tabela 3) interação significativa ($P < 0,05$) entre a vitamina C e o lipídeo para a porcentagem de extrato etéreo do fígado, com aumento linear da porcentagem de extrato etéreo nos níveis de

vitamina C, tanto para a suplementação com 8,0 como 12,0% de lipídeo. O mesmo efeito ocorreu para lipídeos nos diferentes níveis de suplementação de vitamina C, demonstrando o efeito sinérgico desses nutrientes.

Inferese-se que a ação conjunta da vitamina C e do lipídeo, pode ter ocorrido por meio de sua ação antioxidante, favorecendo a manutenção da integridade do lipídeo, facilitando sua maior deposição. Essa ação antioxidante da vitamina C permite economizar a vitamina E, reduzindo-se assim, a peroxidação do lipídeo (Lovell, 1998). O efeito antioxidante da vitamina C também foi descrito por Cadenas (1989) e Bielski e Richter (1975).

Analisando-se, porém, a porcentagem de extrato etéreo no fígado posteriormente ao período de diminuição da temperatura da água (Tabela 3), observou-se interação significativa ($P < 0,05$) entre a vitamina C e o lipídeo, ocorrendo aumento linear tanto da porcentagem de extrato etéreo entre os níveis de vitamina C como nos diferentes níveis de suplementação de lipídeo. Ressalta-se que a porcentagem de extrato etéreo foi equivalente quando da suplementação com 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta nos dois níveis de inclusão de lipídeo no fatorial.

Segundo Miyasaki et al. (1995) a vitamina C atua na síntese da carnitina a partir da lisina e metionina, ocasionando, dessa maneira, maior catabolismo lipídico no fígado e músculo. Essa afirmação corrobora com o estudo realizado por Bilinski e Jonas (1970), os quais relataram que a administração da L-carnitina de maneira exógena aumentou o transporte para dentro da mitocôndria e conseqüente oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa em trutas arco-íris. Esse aumento da produção de energia pode resultar na melhora da performance do peixe através do aumento na eficiência da β -oxidação (Torreele et al., 1993; Chatzifotis et al., 1995). Jayaprakas et al. (1996) demonstraram que a tilápia mossambica alimentada com dieta suplementada com L-carnitina teve aumento do catabolismo lipídico, determinando redução significativa da gordura visceral depositada no peixe. Segundo Devlin

(1997) a carnitina transporta os ácidos graxos de cadeia longa para serem oxidados no interior da mitocôndria.

Com base no apresentado pela literatura e o observado nesse estudo (Tabela 3), pode-se inferir que a vitamina C favoreceu a mobilização de gordura, inferindo-se que houve aumento do metabolismo lipídico com o incremento da concentração de vitamina C na dieta, quando se comparou os níveis suplementados dessa vitamina com a suplementação de 8,0 e 12,0% de lipídeo. Fato evidenciado com o aumento da porcentagem de lipídeo no fígado dos peixes após o período de diminuição da temperatura da água.

Esta hipótese pode ser embasada em Becker et al. (1999), os quais demonstraram que o aumento do nível de L-carnitina é necessário quando se pretende aproveitar a energia extra fornecida pela suplementação elevada de lipídeo, uma vez que o excesso deste inibe a ação da carnitina em transportar o ácido graxo para dentro da mitocôndria e conseqüentemente diminui o processo de β -oxidação. Hwang e Lin (2002) afirmaram que a temperatura da água e a suplementação de vitamina C influenciaram na composição e peroxidação do lipídeo do hepatopâncreas e músculo da carpa comum, *Cyprinus carpio*. Saddler e Cardwell (1971) observaram específica mobilização de ácido graxo muscular para o fígado de salmão, *Oncorhynchus gorbuscha*, submetidos a estresse, proporcionando conseqüentemente, aumento da porcentagem de lipídeo do fígado. Segundo estes autores, a mobilização de lipídeo é usual entre as espécies de salmão, onde a transferência para o fígado antecede a utilização desse aporte energético. De forma oposta, a porcentagem de lipídeo no fígado da carpa comum e do bagre do canal quando submetidos ao jejum diminuíram significativamente (Takeuchi e Watanabe, 1982; Webster et al., 1994). Ressalta-se, porém, que os peixes do presente estudo não foram submetidos a nenhuma forma de restrição alimentar.

Analisando-se a quantidade de triacilglicerol plasmático anteriormente a diminuição da temperatura (valor inicial) (Tabela 3) observou-se efeito significativo ($P < 0,05$) do tratamento ausente de suplementação em relação à média dos demais tratamentos. Isso mostra que a suplementação de lipídeo proporcionou maior síntese de triacilglicerol e conseqüentemente maior metabolismo lipídico, demonstrado através da elevação da porcentagem de extrato etéreo, gordura visceral e índice de gordura visceral apresentados anteriormente.

Devlin (1997) descreveu que a energia baseada em lipídeos encontrada na corrente sanguínea na forma de triacilgliceróis é proveniente da dieta, sendo transportada na forma de gotículas de lipídeos recobertas por proteínas transportadoras para serem utilizadas no metabolismo ou armazenadas. Assim, ocorre concomitantemente a síntese e quebra de triacilgliceróis. O primeiro passo no restabelecimento de ácidos graxos armazenados para produção de energia é a hidrólise de triacilgliceróis, a qual, libera ácidos graxos na corrente sanguínea, que por sua vez, ligam-se à albumina sérica, representando o transporte de energia liberada a partir do armazenamento (Lehninger et al., 1995).

Verificou-se efeito significativo ($P < 0,05$) dos níveis de suplementação de lipídeo do fatorial, onde a suplementação com 12,0% apresentou concentração plasmática de triacilglicerol 36,4% maior que a suplementação de 8,0% de lipídeo na dieta (Tabela 3). Esse resultado corrobora os encontrados nos parâmetros analisados anteriormente.

Observando-se, porém, a concentração plasmática de triacilglicerol após o período de diminuição da temperatura, notou-se que ocorreu efeito significativo ($P < 0,05$) tanto dos peixes do tratamento ausente de suplementação como do suplementado com 6,0% de lipídeo em relação à média dos demais tratamentos (fatorial), além de interação significativa ($P < 0,05$) da vitamina C e do lipídeo.

Esta interação pode ser reflexo indireto da mobilização de gordura inferida anteriormente para a suplementação de 8,0% de lipídeo, onde a suplementação de 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta influenciaram significativamente quando comparado os momentos inicial e final da diminuição da temperatura da água, para o índice de gordura visceral. Os peixes do tratamento suplementado com 8,0% de lipídeo e 300,0 mg de vitamina C/kg da dieta apresentaram maior concentração plasmática de triacilglicerol em função do maior consumo aparente da dieta e menor mobilização (Tabelas 2 e 3) em relação aos peixes dos tratamentos suplementados com níveis maiores de vitamina C. Quando se analisou este parâmetro nos tratamentos suplementados com 12,0% de lipídeo observou-se concentrações significativamente maiores em relação à suplementação de 8,0 % de lipídeo em decorrência do maior consumo aparente da dieta (Tabela 3) e do elevado índice de gordura visceral (Tabela 2). Analisando-se a suplementação de 12,0% de lipídeo, podendo-se observar ainda que a suplementação de 300,0 mg de vitamina C/kg da dieta foi significativamente maior frente aos outros níveis de suplementação desta vitamina devido ao maior consumo aparente da dieta e ao maior índice de gordura visceral. Ressaltando, observou-se de modo significativo maior consumo aparente da dieta durante o período de diminuição da temperatura pelos peixes dos tratamentos que foram suplementados com 12,0% de lipídeo em relação a 8,0%, assim pode-se inferir que o consumo da dieta influenciou na concentração plasmática de triacilglicerol.

Lovell (1998) destaca que muito da gordura oxidada é proveniente das reservas corporais e que a liberação de triacilglicerol do tecido adiposo é regulado via hormonal. Analisando-se o consumo (Tabela 3) entre os peixes que receberam dieta suplementada com 8,0 e 12,0% de lipídeo observou-se maior ingestão das dietas suplementadas com 12,0%. Este resultado permite inferir que o alto nível de energia desta dieta pode ter determinado prejuízo na regulação hormonal do consumo ou ainda o bloqueio de enzimas lipogênicas (Shimeno et

al., 1993), fazendo com que os peixes ingerissem maior quantidade de dieta e portanto, não fizessem uso da reserva corporal.

Os valores médios da composição percentual de ácidos graxos das dietas experimentais suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C para juvenis de tilápia do Nilo, estão apresentados na Tabela 4.

Analizando-se a composição de ácidos graxos encontrados nas dietas experimentais, verificou-se que estão de acordo com a composição do óleo de soja utilizado como fonte de lipídeo confirmando as observações feitas por Huang et al. (1998) e Webster e Lim (2002). Observou-se redução da porcentagem de ácidos graxos saturados nas dietas quando da suplementação de lipídeo em relação à dieta ausente de suplementação, mantendo-se constante para os níveis de 8,0 e 12,0% de suplementação. De maneira semelhante, ocorreu aumento nas porcentagens de ácidos graxos da família ω -3, ácido linolênico (18:3n3) e ω -6, ácido linoléico (18:2n6), com predominância do ácido graxo linoléico. Observou-se também redução acentuada dos ácidos graxos poliinsaturados eicosapentanoico (EPA; 20:5n3) e docohexanoico (DHA; 22:6n3), além do ácido monoinsaturado oléico (18:1n9), naquelas suplementadas com lipídeo.

Os valores médios da composição percentual de ácidos graxos do filé de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C, estão apresentados na Tabela 5.

Em relação à composição de ácidos graxos do filé, observou-se que a mesma refletiu a composição apresentada pela dieta (Tabelas 4 e 5). Resultado esse, demonstrado também para outras espécies de peixes, como para o híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, e para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Huang et al., 1998; Pezzato et al., 1992). Porém essa composição possui algumas particularidades, como dentro da família ω -3, onde o filé apresentou maior porcentagem dos ácidos com maior cadeia carbônica e

duplas ligações (22:6n3 e 20:3n3), além da quantidade relativamente menor do ácido linolênico (18:3n3) e eicosapentanóico (20:5n3), quando comparado com a composição da dieta. Estes resultados podem ser explicados pela maior proporção de lipídeos estruturais (fosfolipídeos), os quais possuem afinidade por ácidos graxos poliinsaturados, particularmente pelos derivados do ácido linolênico, como explicado por Love (1980).

A dessaturação e alongamento da cadeia de 18 carbonos dos ácidos graxos poliinsaturados em seus derivados mostraram-se evidentes (Tabela 5), visto a ausência dos mesmos na composição da dieta (Tabela 4), demonstrando assim, a importância desses ácidos graxos no metabolismo e composição dos tecidos dos peixes, confirmando as observações feitas por Watanabe et al. (1989) e Monteiro et al. (2001). Igualmente, Huang et al. (1998) conduzindo experimento com híbridos de tilápia, observaram alongamento da cadeia do ácido linoléico em ácido araquidônico (20:4n6) no filé. No mesmo sentido, Greene e Selivonchick (1990) em experimento com truta arco-íris suplementada com óleos de origem vegetal e animal, observaram redução da porcentagem do ácido eicosapentanóico (20:5n3) comparado com o ácido docohexanóico (22:6n3) no filé.

Dietas suplementadas com óleo de soja possuem alta porcentagem do ácido linoléico, o qual inibe o metabolismo do ácido linolênico, impedindo a formação de seus derivados essenciais, EPA e DHA (Storebakken et al., in press). Por outro lado, Caballero et al. (2002) não observaram inibição total do ácido linoléico sobre a formação dos derivados do ácido linolênico em trutas arco-íris suplementadas com dietas contendo óleo de soja. Demonstraram ainda, a habilidade da truta em converter o ácido linolênico em um dos seus derivados, o ácido docohexanóico no filé.

Pelo observado neste estudo, pode-se inferir que a tilápia do Nilo possuiu habilidade de alongar a cadeia carbônica do ácido linolênico em ácido docohexanóico no filé (Tabela 5), demonstrando sua importância para os peixes, conforme destacado por Watanabe (1982).

Observou-se também menor porcentagem do ácido linoléico no filé em relação à composição da dieta, o que demonstra que ocorreu dessaturação, ocasionando aumento dos ácidos monoinsaturados e saturados, os quais, são constituintes dos lipídeos de reserva (triacilgliceróis).

Os valores médios (inicial e final) da composição percentual de ácidos graxos da gordura visceral de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos à temperatura inferior à faixa de conforto térmico, estão apresentados na Tabela 6.

A composição de ácidos graxos observados na gordura visceral no período que antecede a diminuição da temperatura (valor inicial), acompanhou as alterações destacadas anteriormente tanto para as dietas experimentais como para o filé, no que se refere à suplementação com os diferentes níveis de lipídeo. Entretanto, pode-se observar diminuição da porcentagem do ácido graxo linolênico e seus derivados, ao mesmo tempo em que ocorreu aumento dos ácidos graxos oléico e linoléico em relação à composição apresentada no filé para os diferentes tratamentos. Isto demonstrou que essa reserva lipídica é constituída em parte de triacilglicerol, o qual, possui em sua constituição afinidade por ácidos graxos com menor quantidade de duplas ligações, como é o caso do ácido oléico (18:1n9) (Jobling, 1994).

Comparando-se a composição dos ácidos graxos da gordura visceral antes e após a diminuição da temperatura da água (Tabela 6), observou-se tendência de diminuição na porcentagem dos ácidos graxos saturados quando da suplementação com 6,0 e 8,0% de lipídeo. Observou-se ainda, que esses valores permaneceram constantes quando da suplementação com o maior nível de lipídeo. Igualmente Van-Raaij (1994) observou mobilização de lipídeo após três dias de jejum em tilápia mossambica, com aumento da concentração plasmática de ácidos graxos saturados predominantemente.

Neste estudo, os peixes do tratamento ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo, ao contrário dos demais, mostraram aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados em relação aos demais ácidos, possivelmente em virtude do consumo da dieta ter sido significativamente elevado neste período em relação aos demais tratamentos (Tabela 3). Destaca-se que esta dieta possui maior quantidade desta classe de lipídeos (Tabela 4) que, somada a mobilização de gordura contribuiu para maior deposição ácidos graxos saturados. De forma semelhante, Chien e Hwang (2001) afirmaram que dietas suplementadas com vitamina C reduziram significativamente a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados e aumentaram a porcentagem de ácidos graxos saturados no fígado de “thornfish” , *Terapon jarbua*.

Observa-se ainda (Tabela 6) que, pela mobilização da gordura visceral e conseqüente dessaturação dos ácidos graxos houve tendência de diminuição dos poliinsaturados de cadeia longa docohexanóico (22:6n3), eicosatrienóico (20:3n3), eicosatrienóico (20:3n6) e ácido araquidônico (20:4n6), nos peixes de todos os tratamentos. Entretanto, os peixes alimentados com dietas suplementadas com 12,0% de lipídeo permaneceram com os valores constantes nos dois momentos, inferindo-se que esse efeito foi decorrente da manutenção da quantidade de gordura visceral e do índice de gordura visceral após a diminuição da temperatura da água (Tabela 2).

Isto corrobora com o observado por Webster et al. (1994), os quais relataram que peixes submetidos ao jejum por mais de 20 dias mantêm a porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados da família w-3, particularmente o ácido docohexanóico (DHA) no músculo e no fígado, com a finalidade de manter os processos fisiológicos e metabólicos. Paralelamente, a porcentagem desse ácido graxo na gordura visceral tende a oscilar. Da mesma forma Jezierska et al. (1982) e Skuladottir et al. (1990) observaram que, durante os meses de inverno, onde períodos de jejum fazem parte do ciclo de vida de diversas espécies de peixes,

que a porcentagem do ácido docohexanóico foi mantida constante apenas no fígado e músculo.

O aumento na porcentagem do ácido linoléico após o período de diminuição da temperatura (valor final) (Tabela 6) nos peixes dos tratamentos suplementados com 6,0 e 8,0% de lipídeo e do tratamento ausente de suplementação foi reflexo da mobilização de lipídeo, a qual, mudou as proporções dos ácidos graxos da gordura visceral, além da contribuição dos ácidos oriundos da dieta. Não foi observado o mesmo efeito no tratamento suplementado com 12,0% de lipídeo, provavelmente em virtude da dificuldade de mobilizar a reserva energética, causada preponderantemente, pelo excesso de gordura depositado como reserva pelo peixe.

A suplementação de lipídeo em níveis elevados nas dietas para peixes pode induzir a supressão da atividade de enzimas lipogênicas no fígado de salmão “Coho”, *Oncorhynchus kisutch*, (Lin et al., 1977) e da tilápia do Nilo (Shimeno et al., 1993). De maneira semelhante Chou e Shiau (1996) relataram diminuição significativa das enzimas quando se aumentou a suplementação acima de 10,0%, porém não observaram redução significativa da atividade de enzimas lipogênicas quando da suplementação de 5,0 a 10,0% de lipídeo na dieta.

A diminuição da temperatura da água aumenta a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados na membrana fosfolipídica dos peixes, de modo a manter a fluidez da membrana celular e o metabolismo normal (Hazel, 1984; Jobling, 1994). Embora a literatura relate a ação da temperatura na dessaturação e alongamento das cadeias carbônicas dos ácidos graxos poliinsaturados, não foi observado tal efeito nesse estudo (Tabela 6). Isso ocorreu provavelmente porque a temperatura da água de 18,0°C não foi crítica o suficiente para determinar essas alterações, além de que a análise da composição dos ácidos graxos foi realizada na gordura visceral, uma vez que o alongamento ocorre principalmente nos lipídeos estruturais.

Os resultados apresentados nesta pesquisa demonstraram que o excesso de lipídeo deposita-se principalmente na forma de gordura visceral; que a tilápia do Nilo é capaz de mobilizar a reserva lipídica para atender a demanda energética requerida em temperatura abaixo do conforto térmico até 8,0% de suplementação de lipídeo; que a vitamina C interfere no metabolismo lipídico, onde a suplementação de 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta permite maior mobilização das reservas lipídicas, além de possível prevenção da peroxidação de lipídeos no fígado e que a tilápia do Nilo é capaz de alongar e dessaturar as cadeias carbônicas dos ácidos graxos poliinsaturados da dieta, além de redistribuí-los e utilizá-los de acordo com as necessidades metabólicas.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de estudo concedida e a SOCIL GUYOMARC'H INDÚSTRIA E COMÉRCIO Ltda pelo apoio científico.

Referências

- A.O.A.C., 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17.ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Becker, K., Schreiber, S., Angoni, C., Blum, R., 1999. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. Aquaculture 174: 313-322.

- Bell, J.G., McVicar, A.H., Park, M.T., Sargent, J.R., 1991. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.* 121: 1163-1172.
- Bielski, B.G.J., Richter, H.W., 1975. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann. NY. Acad. Sci.* 258: 231-237.
- Bilinski, E., Jonas, R.E.E., 1970. Effects of coenzyme A and L-carnitine on fatty acid oxidation in rainbow trout mitochondria. *J. Fish. Res.* 27: 857-864.
- Boyd, C.E., 1990. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1990, 490pp.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214: 253-271.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Castagolli, N., Cyrino, J.E.P., 1986. Piscicultura nos trópicos. Manole, São Paulo, 149pp.
- Chang, V.M., Idler, D.R., 1960. Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration. XII. Liver glycogen. *Canadian J. Biochem. Physiol.* 38:553-558.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T., Seikai, T., 1995. The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea bream fingerlings. *Fish Sci.* 61: 1004-1008.
- Chien, L.T., Hwang, D.F., 2001. Effects of thermal stress and vitamin C in lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 91-97.

- Chou, B.S., Shiau, S.Y., 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 143: 185-195.
- Cowey, C.B., Sargent, J.R., 1972. Fish nutrition. *Adv. Mar. Biol.* 10: 383-492.
- Devlin, T.M., 1997. *Manual de Bioquímica com Correlações Químicas*. Edgard Blucher, São Paulo, 1007pp.
- Ellis, S.C., Reigh, R.C., 1991. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth body composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 97: 383-394.
- El-Dahhar, A.A., Lovell, R.T., 1995. Effects of protein to energy ratio in purified diets on growth performance, feed utilization and body composition of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquacult. Res.* 26:451-457.
- El-Sayed, A.M., Garling, D.L., Jr., 1988. Carbohydrate-to-lipid ratio in diets for *Tilapia zillii* fingerlings. *Aquaculture* 73: 157-163.
- Fitzsimmons, K., Dickenson, G., Brand, C., Davis, J., 1997. Effects of reducing dietary lipid levels on growth and body composition of hybrid tilapia in an intensive recirculating water system. *Progr. Fish Cult.* 59: 293-296.
- Greene, D.H.S., Selivonchick, D.P., 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89: 162-165.
- Hanley, F., 1991. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 93: 323-334.
- Hazel, J.R., 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 246: 460-470.

- Huang, C.H., Huang, M.C., Hou, P.C., 1998. Effects of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B: 331-336.
- Hwang, D.F., Lin, T.K., 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 131: 1-7.
- Jantrarotai, W., Sitasit, P., Rajchapakdee, S., 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid *Clarias* catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) diets containing raw broken rice. *Aquaculture* 127: 61-68.
- Jauncey, K., Ross, B., 1982. A guide to tilapia feed and feeding. Institute of Aquaculture, University of Sterling, Scotland.
- Jayaprakas, V., Sambhu, C., Kumar, S.S., 1996. Effect of dietary L-carnitine on growth and reproductive performance of male *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish. Technol. Soc.* 33: 84-90.
- Jezierska, B., Hazel, J.B., Gerking, S.D., 1982. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout *Salmo gairdneri* with attention to fatty acids. *J. Fish. Biol.* 21: 681-692.
- Jobling, M., 1994. Fish bioenergetics. Chapman e Hall, London, 307p.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W., 1992. Applied multivariate statistical methods. 3.ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Lee, D.J., Putnam, G.B., 1973. The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *J. Nutr.* 103: 916-922.
- Leger, C., 1985. Digestion, absorption and transport of lipids. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G., Nutrition and feeding in fish. Academic Press, New York, 299-331.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1995. Princípios de bioquímica. Savier, São Paulo, 463pp.

- Lemly, A.D., 1996. Wastewater discharges may be most hazardous to fish during winter. *Environ. Pollut.* 32: 169-174.
- Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., Leveille, G.A., 1977. Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Nutr.* 107: 846-854.
- Love, R.M., 1980. The chemical biology of fish. Academic Press, London, 942pp.
- Lovell, R.T., 1998. Nutrition and feeding of fish. 2.ed. Academic Press, Massachusetts, 267pp.
- Lovell, R.T., Sirikul, B., 1974. Winter feeding of channel catfish. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Game Fish Comm.* 28: 208-216.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R., Sakaguchi, M., 1995. Effect of vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Aquaculture* 61: 501-506.
- Montero, D., Robaina, L.E., Socorro, J., Vergara, J.M., Tort, L., Izquierdo, M.S., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 63-72.
- Pezzato, L.E., Castagnolli, N., Barros, M.M., Del Carratore, C.R., Pezzato, A.C., 1992. Efeito de diferentes níveis de gordura animal e vegetal sobre o desempenho e deposição de ácidos graxos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Congresso Brasileiro de Aqüicultura, 7, 1992, Peruíbe. Anais... Peruíbe: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1995. 104-111.
- Saddler, J.B., Cardwell, R., 1971. The effects of tagging upon the fatty acid metabolism of juvenile pink salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 709-721.
- Sheridan, M.A., 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition, and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 679-690.

- Shimeno, S., Ming, D.C., Takeda, M., 1993. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. Nippon Suisan Gakkaishi 59: 827-833.
- Skuladottir, G.V., Schioth, H.B., Gudmundsdottir, E., Richards, B., Gardarsson, F., Jonsson, L., 1990. Fatty acid composition of *Coregonus muksun*: changes during incubation, hatching, feeding, and starvation. Aquaculture 79: 163-168.
- Stickney, R.R., 1997. Tilapia nutrition, feeds and feeding. In: Costa-Pierce, B.A. and Rakocy, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. World Aquaculture Society, Louisiana, pp34-54.
- Storebakken, T., Refstie, S., Ruyter, B., 1999. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Dracheley, J.K., Soy in animal nutrition, proceedings of the Sixth World Soybean Research Conference, Global Soy Forum 1999. Chicago, August 4-7, 413pp.
- Takeuchi, T., Watanabe, T., 1982. The effects of starvation and environmental temperature on proximate and fatty acid composition of carp and rainbow trout. Bull. Jpn. Sci. Fish 48:1307-1316.
- Takeuchi, T., Satoh, S., Watanabe, T., 1983. Dietary lipids suitable for the practical feed of *Tilapia nilotica*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49: 1361-1365.
- Torreale, E., Van Der Sluizen, A., Verreth, J., 1993. The effect of dietary L- carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid. J. Nutr. 69: 289-299.
- Van-Raaij, M.T.M., 1994. The level and composition of free fatty acids in the plasma of freshwater fish in a post absorptive condition. Comp. Biochem. Physiol. 109A: 1067-1074.
- Viola, S., Amidan, G., 1980. Observations on the accumulation of fat in carp and Sarotherodon (Tilapia) fed oil-coated pellets. Bamidgeh 32: 33-40.

- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 1-15.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Takeuchi, T., Satoh, S., 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in term of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1989-1995.
- Webster, C.D., Tidwell, J.T., Goodgame, L.S., Yancey, D.H., 1994. Effects of fasting on fatty acid composition of muscle, liver, and abdominal fat in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *World Aquaculture Society* 25:126-133.
- Webster, C.D., Lim, C., 2002. Introduction to fish nutrition. In: Webster, C.D., Lim, C., Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CAB International, pp.1-27.
- Yassin, N., 2001. Análise de experimentos fatoriais de dois fatores com tratamentos adicionais. 161pp. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingrediente	Tratamentos							
	0mg	125mg	300mg	600mg	1200mg	300mg	600mg	1200mg
	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C
	0% lip	6% lip	8% lip	8% lip	8% lip	12% lip	12% lip	12% lip
Farelo soja	54,88	56,27	56,74	56,74	56,80	57,65	57,08	57,70
Glúten milho	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha peixe	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Fubá milho	24,10	16,67	14,15	14,07	13,84	9,24	9,13	8,94
Farelo trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo soja	---	6,00	8,00	8,00	8,00	12,00	12,00	12,00
Fosfato bicálcico	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Suplem vit e min ¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
VIT C ³	---	0,04	0,09	0,17	0,34	0,09	0,17	0,34
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100
PB (%) ^{5**}	36,05	36,12	35,70	34,97	35,69	36,20	36,50	36,03
EB (kcal/kg) ^{6**}	4640,10	4702,04	4809,71	4858,14	4853,41	5192,06	5184,51	5157,60
EE (%) ^{7**}	2,79	8,88	10,89	10,81	10,68	14,59	14,44	14,68
FB (%) ^{8*}	4,28	4,19	4,16	4,16	4,16	4,12	4,12	4,12
VIT C (mg/kg) ^{9**}	ND ¹⁰	189,00	360,00	527,00	1247,00	331,00	493,00	1108,00

¹ Suplemento vitamínico e mineral (Socil Guyomarc'H Indústria e Comércio Ltda): Vitamina A, 1.200.000 UI;

Vitamina D₃, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K₃, 2.400 mg; Vitamina B₁, 4.800 mg; Vitamina B₂, 4.800 mg; Vitamina B₁₂, 4.800 mcg; Vitamina B₆, 4.800 mg; **Vitamina C, zero**⁴; Pantotenato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; ² Antioxidante; ³ vitamina C; 35,0% ativa; ⁴ Adequado à pesquisa; ⁵ Proteína bruta; ⁶ Energia bruta; ⁷ Extrato etéreo; ⁸ Fibra bruta; ⁹ Vitamina C; ¹⁰ Não determinado;

** Valor calculado; * Valor determinado.

Tabela 2. Valores médios inicial e final do peso, gordura visceral (GV) e índice de gordura visceral (IGV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C e submetidos à diminuição da temperatura da água¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	GV Inicial (g)	GV Final (g)	IGV Inicial	IGV Final
0	0	128,02 (±22,88)	114,38 (± 20,65)	0,68 (± 0,21)	0,32 (± 0,39)	0,53 (± 0,24)	0,28 (± 0,08)
125	6	107,39 (± 8,92)	100,83 (± 16,05)	1,12 (± 0,46)	0,51 (± 0,14)	1,05 α (± 0,07)	0,51 β (± 0,15)
300		120,75 (± 12,01)	110,60 (± 12,34)	1,28 (± 0,57)	1,13 (± 0,36)	1,06 B (± 0,29)	1,04 B (± 0,21)
600	8	103,60 (± 34,45)	100,99 (± 26,29)	1,38 (± 0,32)	1,02 (± 0,26)	1,34 Bα (± 0,10)	1,01 Bβ (± 0,19)
1200		116,10 (± 9,35)	117,39 (± 27,55)	1,43 (± 0,69)	1,08 (± 0,58)	1,23 Bα (± 0,11)	0,92 Bβ (± 0,18)
300		112,30 (± 30,95)	104,10 (± 35,50)	1,85 (± 0,68)	1,74 (± 0,61)	1,65 A (± 0,07)	1,73 A (± 0,25)
600	12	108,97 (± 22,64)	107,01 (± 26,44)	1,71 (± 0,46)	1,71 (± 0,46)	1,57 A (± 0,15)	1,64 A (± 0,34)
1200		100,30 (± 24,94)	101,07 (± 22,89)	1,53 (± 0,39)	1,56 (± 0,41)	1,53 A (± 0,17)	1,54 A (± 0,19)
² Cont. 1 vs Fat.		ns	ns	0,01	0,01	0,01	0,01
³ Cont. 2 vs Fat.		ns	ns	ns	0,05	0,05	0,05
Vit C ⁴		ns	ns	ns	ns	ns	ns
300		116,53	107,35	1,57	1,44	1,36	1,39
600		106,29	104,00	1,55	1,37	1,46	1,33
1200		108,20	109,23	1,48	1,32	1,38	1,23
	Lip ⁵	ns	ns	ns	ns	0,05	0,05
	8	113,48	109,66	1,36	1,08	1,21	0,99
	12	107,19	104,06	1,70	1,67	1,58	1,64
Vit C x Lip ⁶		ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 3. Valores médios inicial e final de extrato etéreo do fígado (EE), concentração plasmática de triacilglicerol (TG) e consumo aparente da dieta de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C e submetidos à diminuição da temperatura da água¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	EE Inicial (%)	EE Final (%)	TG Inicial (mg/dL)	TG Final (mg/dL)	Consumo (g)
0	0	11,23 (± 0,08)	10,49 (± 0,19)	0,05 (± 0,01)	0,05 (± 0,01)	16,51 (± 1,36)
125	6	12,65 (± 0,12)	13,00 (± 0,07)	0,10 (± 0,03)	0,10 (± 0,03)	15,13 (± 0,73)
300	8	11,56 Bcβ (± 0,07)	13,61 Bbα (± 0,98)	0,10 Bβ (± 0,01)	0,15 Baα (± 0,01)	11,88 B (± 0,76)
600		12,11 Bbβ (± 0,07)	20,96 aα (± 0,34)	0,12 B (± 0,02)	0,12 Bb (± 0,01)	10,45 B (± 1,53)
1200		12,40 Baβ (± 0,09)	21,41 aα (± 0,04)	0,12 B (± 0,01)	0,11 Bb (± 0,02)	10,68 B (± 0,56)
300		15,61 Acβ (± 0,10)	18,41 Abα (± 0,06)	0,14 Aβ (± 0,02)	0,19 Aaα (± 0,03)	14,56 A (± 0,91)
600	12	17,90 Abβ (± 0,03)	21,80 aα (± 0,14)	0,15 A (± 0,01)	0,15 Ab (± 0,02)	14,17 A (± 0,98)
1200		18,87 Aaβ (± 0,04)	22,00 aα (± 0,19)	0,18 A (± 0,04)	0,15 Ab (± 0,02)	13,60 A (± 1,20)
² Cont. 1 vs Fat.		0,01	0,01	0,05	0,05	0,05
³ Cont. 2 vs Fat.		0,01	0,01	ns	0,05	0,05
Vit C ⁴		0,05	0,05	ns	0,05	ns
300	Lip ⁵	13,59	16,01	0,12	0,18	13,22
600		15,01	21,38	0,14	0,13	12,31
1200		15,64	21,71	0,15	0,13	12,14
		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	8	12,02	18,66	0,11	0,13	11,00
	12	17,46	20,74	0,16	0,16	14,11
Vit C x Lip ⁶		0,05	0,05	ns	0,05	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 6. Composição percentual dos ácidos graxos da gordura visceral antes e após a diminuição da temperatura da água

[illegible]

Suplementação de lipídeo e vitamina C e as respostas fisiológicas da tilápia do Nilo
***Oreochromis niloticus* após estresse térmico**

Resumo

Esta pesquisa foi realizada em dois períodos, um pré-experimental de 112 dias e outro experimental de 43 dias. Foram avaliados, ao início e final, o efeito da suplementação de lipídeo e vitamina C no eritrograma, cortisol e glicose plasmáticos e na concentração de vitamina C no fígado da tilápia do Nilo submetida a estresse térmico. O experimento foi conduzido num esquema fatorial 2 x 3, com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com três repetições cada, mais dois tratamentos, ausente de suplementação dos nutrientes testes e acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta, constituindo oito rações práticas isoprotéicas (32,0% de proteína digestível). Os peixes foram distribuídos em 24 aquários, com peso médio de $105,13 \pm 19,71$ g. A água dos aquários permaneceu a 18,0°C durante 25 dias e posteriormente por 11 dias a 15,0°C. Conclui-se que a ausência de vitamina C prejudica a eritropoiese e em condição de estresse determina a liberação de células imaturas e ainda não prepara adequadamente os peixes para o estresse; que a suplementação de vitamina C acima dos níveis recomendados mostra-se eficaz no preparo dos peixes para o estresse e a suplementação da dieta com 600,0 mg de vitamina C/kg mostra-se econômica e fisiologicamente adequada no preparo dos peixes para transpor condições adversas e que a suplementação de lipídeo não determina alterações nos parâmetros bioquímicos do estresse.

Palavras Chave: ácido ascórbico, lipídeo, estresse, cortisol, glicose

Physiologic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed diets supplemented with lipid and vitamin C and submitted to temperature stress

Abstract

This research was realized in two periods, one pre experimental in 112 days and other experimental in 43 days. The effect of different lipid and vitamin C supplementation it were analyzed at the beginning and the end of the experimental period in the hematology, plasmatic cortisol and glucose and liver vitamin C concentration of Nile tilapia submitted a temperature stress during 43 days. The experiment was conducted in factorial design 2 x 3, two levels of lipid (8.0 and 12.0%) and three levels of vitamin C (300.0; 600.0 and 1,200.0 mg of vitamin C/kg diet), with four replicates each treatment, plus two treatments, absence of test nutrients supplementation and supplemented with 6.0% of lipid and 125.0 mg of vitamin C/kg diet. Eight experimental practical diets were formulated to contain 32.0% of digestible protein. Fish were stocked in 24 40-l aquaria at a density of two fish/aquarium, with average weight of 105.13 ± 19.71 g. Water temperature was kept at 18.0°C during 25 days and after that 15.0°C during 11 days. It was concluded that absence vitamin C impairment erythropoiesis and under stress condition determine immature cells liberation less capable to delivery oxygen and do not adequately prepare fish to cope stress; vitamin C supplementation above to requirement shows to be efficient in the fish preparing for stress and the 600.0 mg of vitamin C/kg diet supplementation shows to be economic and physiologically appropriate in the fish preparing to handle adverse conditions and that lipid supplementation do not determine alterations in the biochemistry parameters of stress.

Key Words: ascorbic acid, lipid, stress, cortisol, glucose

Introdução

Nos sistemas de cultivo intensivo os peixes são continuamente expostos a situações de estresse, as quais por muitas vezes determinam modificações temporárias na homeostase, induzindo o peixe a responder de maneira endócrina com intuito de mobilizar energia, caracterizado pela estimulação do sistema adrenérgico, com liberação das catecolaminas, e por meio do aumento dos níveis de ACTH e cortisol plasmáticos (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Gamperl et al., 1994). Essas mudanças podem ser prolongadas e vem acompanhadas de estresse crônico, intensificando o desequilíbrio.

Embora não se contabilize a perda de peixes durante períodos de estresse, como por exemplo o inverno, esta pode determinar grandes prejuízos aos produtores, em função da queda de resistência e maior susceptibilidade a doenças. Segundo Sealey et al. (1997), a indústria americana do bagre do canal investe em pesquisa grande montante de recursos que visem aumentar a resistência dos peixes a doenças uma vez que se contabiliza perda anual de 20 a 30 milhões de dólares com problemas causados por doenças, especificamente pela bactéria *Edwardsiella ictaluri*.

Lovell & Sirikul (1974) relataram perda de peso do bagre do canal no período de inverno decorrente da redução da gordura corporal. De maneira semelhante Lemly (1996) observou, durante o inverno, que as reservas lipídicas têm significativa mobilização e podem ser totalmente consumidas como fonte energética, demonstrando a necessidade de reserva adequada para não deteriorar as condições corporais.

Segundo Takeuchi et al. (1983) dietas suplementadas com óleos vegetais ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série n-6, proporcionaram melhor performance em relação aos demais óleos. Bell et al. (1991) observaram que dietas contendo altas

concentrações de n-3 e n-6, podem aumentar a resistência em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, para transpor períodos de estresse. Segundo Stickney em Costa-Pierce & Rakocy (1997) os lipídeos correspondem ao depósito primário de energia, onde se acumulam na forma de ácidos graxos ésteres de glicerol, podendo ser utilizados em situações adversas.

O aumento do metabolismo durante situações desfavoráveis gera também a redistribuição e maior demanda por vitaminas, especialmente a vitamina C (Wedemeyer, 1969). Doses de vitamina C maiores do que as necessárias para proporcionar desempenho normal em bagre do canal, vêm sendo recomendadas para determinar maior resistência (Durve & Lovell, 1982; Li & Lovell, 1985).

El Naggar & Lovell (1991) e Guerin (1986) observaram que a concentração de ácido ascórbico no fígado de bagre do canal é representativa, alterando-se de acordo com o fornecido pela dieta. Segundo Eichbaum et al. (1977), Navarre & Halver (1989) e Li & Lovell (1985), peixes que apresentam alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos demonstraram maior tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções por bactérias. Segundo Jaffa (1989) e Hardie et al. (1991), altos níveis de suplementação de vitamina C vêm sendo propostos para minimizar os efeitos fisiológicos do estresse em peixes. Kitabchi (1967) relatou que altos níveis de vitamina C inibem a síntese de esteróides pela prevenção da conversão de ácidos graxos insaturados em éster de colesterol, os quais são incorporados nos esteróides. O autor sugere que o aumento da reserva de vitamina C no peixe pode mitigar a severidade da resposta ao estresse.

Desta forma, realizou-se essa pesquisa com a tilápia do Nilo tendo por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de vitamina C, lipídeos e a interação desses nos parâmetros fisiológicos do estresse.

Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP – Câmpus de Botucatu, laboratório associado ao Centro de Aqüicultura da UNESP, com período pré-experimental de 112 dias e período experimental de 43 dias.

No período pré-experimental foi utilizado um lote de 192 alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes da mesma desova e revertidos sexualmente, com peso médio de $5,57 \pm 0,50$ g distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 200 L cada, numa densidade de seis peixes por tanque-rede. Esses foram dispostos em oito aquários de 1000 L, quatro tanques-rede por aquário. O conjunto de aquários foi dotado de sistema de aquecimento controlado por termostato, mantendo-se a temperatura dentro da faixa de conforto ($26,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) e sistema de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. Semanalmente monitorou-se as características físico-químicas da água dos aquários e realizou-se sifonagem para retirada de eventuais sobras de rações e excretas.

A pesquisa foi conduzida num esquema fatorial 2 x 3, com dois níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e três níveis de vitamina C (300,0; 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta), com quatro repetições para cada tratamento. Além de dois tratamentos adicionais, sendo o primeiro, ausente de suplementação dos nutrientes testes e o

segundo acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. A vitamina C utilizada foi a polifosfatada com 35,0% de atividade (Stay-C[®] Roche) e a fonte de lipídeo, o óleo de soja comercial. Desta forma foram confeccionadas oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível (Tabela 1).

O suplemento vitamínico e mineral utilizado foi isento de vitamina C, sendo considerada como fonte somente o adicionado à dieta. As dietas foram peletizadas e armazenadas em congelador (-20,0°C) objetivando evitar perdas da vitamina C pelo processo de oxidação. Foram efetuadas ainda análise químico-bromatológica das dietas de acordo com o protocolo da AOAC (2000) e a análise de vitamina C foi efetuada em cromatógrafo líquido (HPLC).

No final do período pré-experimental e conseqüentemente, início do período experimental, foram coletados aleatoriamente e sacrificados seis peixes por tratamento utilizando-se superdosagem do anestésico benzocaína, com finalidade de realizar a extração do fígado para a quantificação da concentração de vitamina C. Após a retirada, os mesmos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em congelador a -80,0°C. A análise de vitamina C foi efetuada em cromatógrafo líquido (HPLC - fase reversa), de acordo com metodologia adaptada de Wang et al. (1988).

Para determinação dos parâmetros hematológicos iniciais (após 112 dias pré-experimentais) foram retirados aleatoriamente seis peixes por tratamento. Esses foram anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e realizada coleta de sangue com auxílio de seringa de 1,0 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%) através do vaso caudal, para determinação do número de eritrócitos utilizando-se solução de azul de toluidina a 0,01% em câmara de Neubauer. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo

método da cianometahemoglobina utilizando-se kit comercial Analisa Diagnostica[®] para determinação colorimétrica. Posteriormente a essas análises foram calculados o volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM). As variáveis acima apresentadas foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). A porcentagem de hematócrito foi determinada utilizando-se o método do microhematócrito.

Os mesmos peixes foram novamente sangrados utilizando-se heparina como anticoagulante. Do sangue foi feita a análise de glicose, segundo metodologia de King & Garner (1947). Posteriormente a essa análise, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada para separação do plasma e determinação do cortisol pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se Kit DPC – Diagnostic Products Corporation[®] (coat-a-count, fase sólida).

Posteriormente a essas análises os 48 peixes remanescentes foram selecionados e redistribuídos em três aquários por tratamento com dois peixes cada, totalizando seis peixes por tratamento, com peso médio de $105,13 \pm 19,71$ g, quando iniciou-se o período experimental de 43 dias. Para a realização do estresse crônico foi efetuada redução gradativa da temperatura da água dos aquários, de 26,0 para 18,0°C num período de sete dias.

Após este procedimento, os peixes foram transferidos para 24 aquários de 40 L cada, providos de biofiltro e aeração individual, numa densidade de dois peixes/aquário. Esses aquários foram instalados numa sala refrigerada a 18,0°C, mantendo-se o mesmo delineamento experimental anteriormente descrito para o período pré-experimental.

Os peixes foram submetidos à temperatura de 18,0°C por 25 dias e após este período a temperatura da água dos aquários foi reduzida de 18,0 para 15,0°C,

permanecendo os peixes nessas condições por 11 dias. Encerrado o período experimental foram efetuadas as mesmas análises do início do período experimental.

A análise estatística foi realizada por meio da técnica da ANOVA para o esquema fatorial 2 x 3, com dois tratamentos adicionais no delineamento inteiramente casualizado, complementado com os testes de Scheffé e Tukey (estrutura fatorial) (Yassin, 2001). Os parâmetros determinados no início e final do período experimental foram analisados por meio da análise de medidas repetidas dos perfis médios dos tratamentos, complementada com a construção dos intervalos simultâneos (Johmson & Wichern, 1992).

Resultados e discussão

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios inicial e final de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.

Avaliando-se os parâmetros hematológicos apresentados no período inicial, notou-se que os valores médios de eritrócitos e hematócritos apresentaram diferença significativa quando comparados o tratamento ausente de suplementação com a média dos demais tratamentos (fatorial), não havendo diferença significativa para a taxa de hemoglobina.

Segundo Feldman et al. (2000) a síntese dos eritrócitos envolve vários fatores tais como, lipídeos, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. Resultados anormais de eritropoiese podem advir da insuficiência desses fatores que são críticos para a

produção de células vermelhas. Estes autores enfatizaram, ainda, que num primeiro momento do estresse as glândulas hipófise, adrenal e tireóide participam da regulação da eritropoiese por meio de efeitos metabólicos e que os hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), crescimento (GH), epinefrina, noroepinefrina levam ao aumento da eritropoetina, estimulando a síntese de eritrócitos.

A redução do valor de hematócrito tanto na ausência de suplementação de vitamina C quanto na deficiência foi observado em diversas espécies de peixes: bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, (Lim & Lovell, 1978), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (Albrektsen et al., 1988) e híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, (Shiau & Jan, 1992). Entretanto, Lim et al. (2000) não encontraram efeito significativo dos níveis de vitamina C na porcentagem de hematócrito.

A ausência ou deficiência dessa vitamina, podem reduzir a utilização do íon ferro pelo metabolismo, afetando sua redistribuição pelo organismo, com conseqüente diminuição da síntese de células vermelhas (Albrektsen et al., 1988). A vitamina C facilita a absorção do íon ferro no intestino e sua redistribuição para os diferentes tecidos, incluindo a síntese de hemoglobina (Devlin, 1997).

Mesmo não sendo significativo o efeito do tratamento ausente de suplementação de vitamina C em relação aos demais tratamentos (fatorial), para a taxa de hemoglobina (Tabela 2), verificou-se valor reduzido de hemoglobina em relação aos demais tratamentos, permitindo inferir que os peixes deste tratamento possivelmente estariam esgotando as reservas orgânicas, o que poderia culminar em anemia. A não ocorrência de significância para a taxa de hemoglobina pode ser decorrente do período pré-experimental ter sido insuficiente, do balanço do íon ferro na composição da dieta e

ou da concentração hepática de vitamina C estarem adequados até esse momento (Tabela 4).

Martins (2000) observou que o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, alimentado com dieta ausente de suplementadas de vitamina C e submetido a estresse por captura, possuiu diminuição significativa da taxa de hemoglobina em relação ao tratamento que recebeu suplementação de vitamina C. Soliman et al. (1994) observaram que a ausência de vitamina C em dietas para híbrido de tilápia resultou em baixo nível de hematócrito, baixa concentração de vitamina C no fígado, além de queda no crescimento, pior conversão alimentar e baixa taxa de eficiência protéica.

Analisando-se, porém, os parâmetros hematológicos após a realização do estresse térmico (valor final) (Tabela 2), notou-se que os peixes do tratamento ausente de suplementação de vitamina C, os quais, possuíam índices aquém dos demais tratamentos (fatorial), apresentaram dificuldade de manter a eritropoiese, com decréscimo de 18,7% no número de eritrócito e 11,7% na taxa de hemoglobina. Segundo Reddy & Leatherland (1998) fisiologicamente o organismo tenta manter os parâmetros sanguíneos na zona de homeostase do animal.

Neste mesmo sentido, Pickering (1981) e Wedemeyer et al. (1990) descreveram mudanças fisiológicas durante o estresse em decorrência da liberação de catecolaminas e dos hormônios adrenocorticotróficos, tais como: mobilização das reservas de energia, aumento da pressão sanguínea e maior oxigenação. Desta maneira, com base nos resultados apresentados na Tabela 2, pode-se inferir que a suplementação de vitamina C facilitou a absorção do ferro, principal componente da síntese de hemoglobina, minimizando os efeitos do estresse sobre os parâmetros sanguíneos, e que essa vitamina manteve a integridade da membrana celular por meio da sua ação antioxidante,

permitindo que a vitamina E fosse utilizada de maneira eficaz para impedir a ação das espécies reativas de oxigênio sobre os ácidos graxos poliinsaturados e evitar ainda redução na resistência da membrana dos eritrócitos, com possível rompimento.

Corroborando com as hipóteses apresentadas, os parâmetros sanguíneos dos peixes dos tratamentos que receberam suplementação de vitamina C analisados após a realização do estresse (Tabela 2), mostraram efeito significativo dessa vitamina para número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito, além de tendência de aumento da taxa de hemoglobina. Observou-se assim, aumento linear à medida que se aumentou a vitamina C de 300,0 para 600,0 e 1200,0 mg/kg da dieta, não diferindo significativamente entre a suplementação de 600,0 para 1200,0 mg de vitamina C/kg da dieta. De forma semelhante, Waagbo et al. (1993) observaram aumento significativo da taxa de hemoglobina à medida que se aumentou a suplementação de vitamina C na dieta do salmão do Atlântico, *Salmo salar*.

Analisando-se os parâmetros sanguíneos em momentos diferentes, antes e após a realização do estresse (Tabela 2), verificou-se que a suplementação de vitamina C manteve os mesmos em níveis adequados após a realização do estresse, entretanto a diminuição significativa da porcentagem do hematócrito foi reflexo da menor taxa de hemoglobina e do número de eritrócitos. De forma semelhante, Hattingh & Van Pletzen (1974) observaram diminuição da porcentagem do hematócrito em *Labeo umbratus*, após três dias de estresse por captura.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios inicial e final do volume globular médio (VGM) e da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.

Observou-se nesta tabela que o tratamento ausente de suplementação em relação aos demais tratamentos suplementados (fatorial) apresentou efeito significativo após a realização do estresse para os índices hematimétricos, volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média das células. Isto evidencia a tentativa do organismo em manter a eritropoiese, liberando células imaturas de volume maior, e conseqüentemente, com menor taxa de hemoglobina. Barros et al. (2002) observaram que existe influência do nível de vitamina C com o aumento na porcentagem de hematócrito, sendo o valor deste, maior com o aumento do nível de vitamina C. Porém observaram que esse aumento ocorreu em virtude do maior volume globular médio das células, demonstrando que a vitamina C determinou a liberação de células imaturas na circulação.

Hrubec et al. (2000) determinaram o intervalo de 115,0 a 183,0 fL para o volume globular médio da tilápia híbrida, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, cultivadas. Embora os valores obtidos neste estudo estejam dentro do intervalo estabelecido por esses autores observou-se que o VGM das células, dos peixes do tratamento ausente de suplementação dos ingredientes teste, após o estresse estava próximo ao valor máximo limite (Tabela 3).

Observando a concentração de vitamina C no fígado dos peixes, notou-se que ocorreu efeito significativo ($P < 0,05$) da média dos tratamentos (fatorial) quando confrontado com o tratamento ausente de suplementação no início do período experimental (Tabela 4). Embora a ausência de suplementação tenha determinado menor concentração significativa de vitamina C, esta pode ser considerada expressiva, uma vez que não foi adicionada essa vitamina na dieta. Desta forma, esse resultado diverge da análise de vitamina C desta dieta, uma vez que não foi detectada

concentração mínima dessa vitamina, dificultando assim a compreensão do resultado apresentado pelos peixes desse tratamento.

Igualmente ao observado com o tratamento ausente de suplementação, a inclusão de 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta diferiu da média dos demais tratamentos (fatorial) (Tabela 4), sendo que a suplementação com valores acima da exigência para a espécie determinou aumento de 35,8% de vitamina C no fígado dos peixes. A importância da suplementação dessa vitamina em níveis maiores do que o recomendado para evitar sinais de deficiência e conseqüentemente determinar maior reserva foi afirmado por Eichbaum et al. (1977). Segundo Navarre & Halver (1989), peixes com alta concentração de ácido ascórbico nos tecidos apresentaram melhor tolerância à poluição ambiental e melhor resistência a infecções.

Em concordância com o afirmado acima, pode-se observar efeito significativo dos níveis de suplementação de vitamina C na dieta sobre a quantidade de reserva da mesma no fígado (Tabela 4), sendo que o acréscimo na suplementação determinou aumento da concentração desta vitamina no fígado. Ressalta-se que a suplementação de 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta não diferiu da suplementação de 1200,0 mg/kg da dieta, em relação à reserva. Isto permite inferir, que possivelmente existiu saturação do fígado quanto à capacidade de reserva, demonstrando que a suplementação de 600,0 mg de vitamina C/kg da dieta, promoveu economicamente, reserva orgânica adequada dessa vitamina.

Segundo Hilton et al. (1978) a concentração dessa vitamina no fígado dos peixes é influenciada diretamente pela concentração da dieta. Igualmente, Nitzan et al. (1996) estudando o efeito da suplementação de ácido ascórbico polifosfatado (AAPP) em híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, encontraram

concentração no fígado significativamente maior nos peixes que receberam suplementação de vitamina C em relação aos peixes que foram arraçoados com as dietas não suplementadas..

Confrontando-se os valores de vitamina C no fígado dos peixes ao início e final do período de estresse (Tabela 4), observou-se resposta similar de utilização da vitamina C entre os peixes alimentados com dietas isentas de suplementação e com suplementadas com 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. Essas respostas demonstraram que a suplementação com o nível de exigência, não foi suficiente na manutenção da concentração mínima desta vitamina no fígado após estresse crônico de temperatura. Hilton et al. (1978) determinaram como valor mínimo para o não surgimento de sinais clínicos de deficiência em truta arco-íris, 20,0 µg de vitamina C/g de fígado, e para o bagre do canal Lim & Lovell (1978) determinaram o valor mínimo da concentração desta como sendo 30,0 µg de vitamina C/g de fígado. De forma oposta, Robinson (1992) ressaltou que esse valor não necessariamente reflete a deficiência de vitamina C para essa espécie.

Embora, na presente pesquisa, não tenha havido mortalidade dos peixes nos diferentes tratamentos após a realização do estresse, pode-se inferir que em condições de cultivo intensivo, onde os fatores ambientais estão continuamente influenciando mudanças na homeostase dos peixes e conseqüentemente exigindo redistribuição das reservas de vitaminas, especialmente a vitamina C, esses animais provavelmente não suportariam o estresse cumulativo, em virtude da baixa reserva apresentada, podendo resultar em mortalidade expressiva.

Neste sentido, Li et al. (1998) enfatizaram possível diminuição na concentração de vitamina C nos tecidos após longos períodos de estresse, resultando portanto em

menor quantidade de vitamina C disponível para manutenção de outras funções, como por exemplo respostas imunológicas. De maneira semelhante, Li & Robinson (1994) afirmaram que bagres do canal suplementados com vitamina C e posteriormente submetidos a estresse térmico com diminuição da temperatura de 31,0 para 10,0°C, apresentaram decréscimo de 44,0% na concentração desta vitamina no fígado, demonstrando assim, a importância de manter alta a reserva dessa vitamina em períodos que antecedem a queda de temperatura. Igualmente Anderson (1990) destacou que a sensibilidade da tilápia híbrida, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, ao estresse térmico é resultado da baixa atividade do sistema imunológico em condições de baixa temperatura.

A necessidade da suplementação de vitamina C acima da exigência para a espécie foi ressaltada por Durve & Lovell (1982), os quais determinaram efeito positivo da suplementação desta vitamina acima dos níveis recomendados, e que essa maior exigência estaria, em condições de baixa temperatura, relacionada à baixa resistência natural dos peixes. Neste mesmo sentido, Mazik et al. (1987) demonstraram que melhor taxa de crescimento, maior sobrevivência e melhor resistência dos peixes, relacionados a fatores estressores implícitos na aquicultura, são dependentes dos níveis de vitamina C na dieta.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios inicial e final da concentração de cortisol plasmático e glicose plasmática de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico.

Observou-se efeito significativo, após estresse térmico, nos valores de cortisol plasmático dos peixes que receberam a dieta ausente de suplementação em relação à

média dos demais tratamentos (fatorial), sendo que a não suplementação manteve a mesma concentração de cortisol. Comparando-se este tratamento com os demais se observou aumento médio de 65,0% na concentração final deste hormônio. Wedemeyer (1969) sugeriu que a vitamina C é utilizada para a biosíntese dos esteróides, onde o aumento do nível de cortisol ocorre com a diminuição da vitamina C. Essa citação corrobora com a hipótese de Kitabchi (1967), o qual relatou que altos níveis de vitamina C inibem a síntese de esteróides pela prevenção da conversão de ácidos graxos insaturados em éster de colesterol, os quais são incorporados nos esteróides. Desta forma, o aumento da concentração de vitamina C preveniria a severidade da resposta do estresse.

Contudo, Li et al. (1998) observaram que o nível de cortisol não foi influenciado pelos níveis de suplementação de vitamina C da dieta. O mesmo resultado foi observado por Dabrowska et al. (1991), em carpa comum submetida a estresse.

Embora Hardie et al. (1991) tenham determinado que altos níveis de vitamina C na dieta diminuem os efeitos fisiológicos do estresse, pesquisas desenvolvidas com a carpa comum, bagre do canal e salmão do Atlântico não demonstraram correlação entre o nível de ácido ascórbico e a concentração plasmática de cortisol ou de glicose (Dabrowska et al., 1991; Davies et al., 1998; Li et al., 1998).

A comparação da concentração inicial e final de cortisol (Tabela 5) demonstrou que nos níveis de suplementação de 600,0 e 1200,0 mg de vitamina C/kg de dieta, independente da suplementação de lipídeo, houve redução significativa deste hormônio. Isto evidencia que níveis maiores que o recomendado para a manutenção normal do desenvolvimento propiciou redução na liberação de hormônios em níveis inferiores aos valores iniciais confirmando a ação inibitória dos altos níveis de vitamina C na síntese

de cortisol, descrita por Kitabchi (1967). Com relação à concentração de glicose não foi observado efeito significativo da suplementação dos nutrientes quando da comparação dos valores iniciais e finais do estresse térmico. Essas respostas corroboram com Schreck (2000) o qual ressaltou que a resposta fisiológica ao estresse contínuo é similar a causada pelo estresse agudo, podendo os indicadores de resposta ao estresse eventualmente retornarem às condições pré-estresse.

Segundo Schreck (1981) peixes submetidos por longo período a estresses ambientais podem morrer ou se adaptarem, quando os níveis de cortisol e catecolaminas retornam próximos aos do período pré-estresse, podendo permanecer desta maneira durante dias e até meses. Esta possibilidade de adaptação em relação à performance pode levar o peixe a duas situações distintas: a exaustão e conseqüentemente a morte ou a performance um pouco menor em relação ao período pré-estresse, quando algumas habilidades tais como crescimento, reprodução e resistência, diminuem (Reddy & Leatherland, 1998).

Igualmente ao observado neste estudo (Tabela 5), Ortuno et al. (2002) avaliando o efeito da suplementação de vitamina C e da vitamina E em dourada, *Sparus aurata*, submetida a múltiplo estresse, observaram queda de 33,0% no nível de cortisol plasmático dos peixes do tratamento que recebeu suplementação de vitamina C ou E em relação ao controle (ausente de suplementação) e 50,0% menor no tratamento que recebeu suplementação de ambas as vitaminas em relação ao controle.

Embora, neste estudo, não tenha havido influência dos diferentes níveis de suplementação de lipídeo e nem interação significativa com a vitamina C com relação às concentrações de cortisol e glicose (Tabela 5), a literatura descreve que a alteração dos componentes nutricionais na formulação das dietas pode promover melhor

resistência ao estresse. Segundo Barton (1997) o aumento dos níveis de ácidos graxos têm demonstrado favorecer a resistência dos peixes, podendo estar relacionado com a rápida mobilização da reserva energética para enfrentar o estresse. Bell et al. (1991) observaram que dietas contendo altas concentrações de n-3 e n-6, podem aumentar a resistência em salmão do Atlântico para transpor períodos de estresse.

Neste mesmo sentido, Sumpter (1997) enfatizou que as catecolaminas disponibilizam energia num período curto por meio da glicogenólise, sendo que o cortisol fornece energia a longo termo, pela estimulação do catabolismo do glicogênio, lipídeos e proteína. Barton et al. (1988) determinaram que o salmão “Chinook”, *Oncorhynchus tshawytscha*, alimentado com dietas com altos níveis de lipídeo e submetidos a estresse de manuseio apresentaram maior concentração de glicose, sugerindo que esta resposta refletiu possivelmente maior resistência dos peixes ao estresse. Com base nesta afirmação pode-se inferir que os peixes alimentados com níveis maiores de lipídeos, em função da reserva orgânica estabelecida, estavam mais preparados para enfrentar o estresse térmico.

Schreck (2000) destacou que peixes podem compensar e se adaptar a situações estressoras e, ainda, se tornarem condicionados ou habituados, em função de mudanças comportamentais e fisiológicas. Porém existe custo energético associado a essa compensação o que pode determinar efeitos deletérios no desenvolvimento, reprodução e resistência a doenças. Os efeitos do estresse nas respostas fisiológicas dependem da duração e severidade dos agentes estressores, da frequência e número de exposição ao agente estressor e, ainda, do número de experiências contemporâneas a esses agentes.

A análise de forma conjunta das respostas fisiológicas de eritropoiese, concentração de vitamina C no fígado, cortisol e glicose dos peixes submetidos a

estresse permite inferir que essas são resultado da série de fatores estressores aos quais esses peixes foram submetidos. Não só o estresse térmico ao qual esses peixes foram submetidos pode ser considerado fator estressor. Somado a este fator, a mudança de estrutura experimental, bem como o estabelecimento da nova hierarquia de dominância podem ter determinado respostas adaptativas significativas num primeiro momento. Mesmo diante desse quadro de estresse cumulativo, o qual é prejudicial ao retorno da homeostase, esse período prolongado de estresse pode ter favorecido a busca pelo equilíbrio e ter determinado novos patamares dos indicadores de estresse. Certamente nessas condições de desafio, as reservas de glicogênio podem não ter sido suficientes para manter a nova exigência energética e podem ter favorecido portanto o catabolismo de reservas orgânicas, respostas diretas do cortisol e glicose plasmáticas. A não ocorrência de mortalidade após esses desafios, foi resultado das condições orgânicas em que os peixes se encontravam determinadas pela suplementação de vitamina C e lipídeo na dieta. As respostas apresentadas pelos peixes do tratamento ausente de suplementação dos nutrientes teste, permitem inferir que o prolongamento do estresse certamente determinaria mortalidade.

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que a ausência de vitamina C prejudica a eritropoiese e em condição de estresse determina a liberação de células imaturas com menor capacidade de carrear oxigênio e ainda não prepara adequadamente os peixes para enfrentar o estresse; que a suplementação de vitamina C acima dos níveis recomendados mostra-se eficaz no preparo dos peixes para o estresse e a suplementação da dieta com 600,0 mg de vitamina C/kg mostra-se econômica e fisiologicamente adequada no preparo dos peixes para transpor condições adversas de temperatura.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudo concedida e a SOCIL GUYOMARC'H INDÚSTRIA E COMÉRCIO Ltda pelo apoio científico.

Referências

- Albrektsen, S., Lie, O. and Sanders, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 71: 359-365.
- Anderson, D.P. 1990. Antigen preparation. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. *Technology in Fish Immunology*. SOS Publ., N.J. pp.79-87
- A.O.A.C. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17.ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Barros, M.M., Pezzato, L.E., Kleemann, G.K., Hisano, H. and Rosa, G.J.M. 2002. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 31: 2149-2156.
- Barton, B.A., Schreck, C.B. and Fowler, L.G. 1988. Fasting and diet content affect stress-induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile chinook salmon. *Prog. Fish Cult.* 50: 16-22.
- Barton, B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: *Fish Stress and Health in Aquaculture*. pp.1-33. Edited by G.K. Iwana, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck. University Press, Cambridge.

- Bell, J.G., Mcvicar, A.H., Park, M.T. and Sargent, J.R. 1991. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. J. Nutr. 121: 1163-1172.
- Dabrowska, H., Dabrowski, K., Meyer-Burgdorff, K., Hanke, W. and Gunther, K.D. 1991. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*). Comp. Biochem. Physiol. 89b: 539-545.
- Davies, K.B., Simco, B.A., Li, M. and Robinson, E. 1998. Effect of reduction of supplemental dietary vitamins on the stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. World Aquacult. Soc. 29: 319-324.
- Devlin, T.M. 1997. Manual de Bioquímica com Correlações Químicas. Edgard Blucher, São Paulo.
- Durve, V.S. and Lovell, R.T. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 948-951.
- Eichbaum, F.W., Guedes, A.O., Neto, J.P. and Carvalho, F.V. 1977. Protecting effect of ascorbic acid in strychnine poisoning and in tetanus (fish, mice, rats). Int. J. Vitam. Nutr. Res. 16: 31-39.
- El Naggar, G.O. and Lovell, R.T. 1991. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic for channel catfish. J. Nutr. 121: 1622-1626.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Gamperl, A.K., Wilkinson, M. and Boutilier, R.G. 1994. β -Adrenoreceptors in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart: characterization, quantification & effects of repeated catecholamine exposure. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 259-272.
- Guerin, M. 1986. Feeding elevated levels of ascorbic acid to channel catfish in ponds: Effects on tissue level of ascorbic acid and ascorbate-2-sulfate and on resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Auburn. Master's Thesis, Auburn University.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C. and Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 95: 201-214.
- Hattingh, J. and Van Pletzen, A.J.J. 1974. The influence of capture and transportation on some blood parameters of fresh water fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 49: 607-609.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y. and Slinger, S.J. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets of rainbow trout. *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 431-436.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 29.
- Jaffa, M. 1989. Vitamin C can curb those stress associated losses. *Fish Farmer.* 12: 18-19.
- Jain, N.C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4.ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Johnson, R.A. and Wichern, D.W. 1992. *Applied multivariate statistical methods*. 3.ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- King, E.J. and Garner, R.J. 1947. Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Path.* 1: 1-30.
- Kitabchi, A.E. 1967. Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature* 215: 1385-1386.

- Lemly, A.D. 1996. Wastewater discharges may be most hazardous to fish during winter. *Environ. Pollut.* 32: 169-174.
- Li, M.H. and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.* 115: 123-131.
- Li, M.H. and Robinson, E.H. 1994. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin C concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and clearance rate at two temperatures- A preliminary investigation. *J. Applied Aquacult.* 4: 59-71.
- Li, M.H., Wise, D.J. and Robinson, E.H. 1998. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 1-8.
- Lim, C. and Lovell, R.T. 1978. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108: 1137-1146.
- Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H. and Robinson, E.H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185: 313-327.
- Lovell, R.T. and Sirikul, B. 1974. Winter feeding of channel catfish. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Game Fish Comm.* 28: 208-216.
- Martins, M.L. 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estressados. 125p. Doutorado (Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Mazeaud, M.M. and Mazeaud, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: *Stress and Fish.* pp.49-75. Edited by A.D. Pickering. Academic Press, New York.

- Mazik, P.M., Brandt, T.M. and Tomasso, J.R. 1987. Effect of dietary vitamin C on growth, caudal fin development, and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish Cult.* 49: 13-16.
- Navarre, O. and Halver, J.E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture* 79: 207-221.
- Nitzan, S., Angeoni, H. and Gur, N. 1996. Effects of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. *Isr. J. Aquacult.* 48: 133-141.
- Ortuno, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J. 2002. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 12: 1-12.
- Pickering, A.D. 1981. Introduction: The concept of biological stress. In: *Stress and Fish*. pp.1-9. Edited by A.D. Pickering. Academic Press, London.
- Reddy, P.K. and Leatherland, J.F. 1998. Stress physiology. In: *Fish Diseases and Disorders*. vol.2, pp.279-301. Edited by J.F. Leatherland and P.T.K. Woo. CAB International, New York.
- Robinson, E. H. 1992. Vitamin C studies with catfish: requirements, biological activity and stability. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Mississippi. (Technical Bulletin, 182).
- Schreck, C.B. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: *Stress and Fish*. pp.295-321. Edited by A.D. Pickering. Academic Press, London.

- Schreck, C.B. 2000. Accumulation and long term effects of stress in fish. In: The Biology of Animal Stress. pp.147-158. Edited by G. P. Moberg and J. A. Mench. CAB International, Wallingford.
- Sealey, W.M., Lim, C. and Klesius, P.H. 1997. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. J. World Aquacult. Soc. 28: 142-149.
- Shiau, S.Y. and Jan, F.L. 1992. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish. Sci. 58: 671-675.
- Soliman, A. K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquacult. Fish. Manage. 25: 269-278.
- Stickney, R.R. 1997. Tilapia nutrition, feeds and feeding. In: Tilapia aquaculture in the Americas. pp.34-54. Edited by B.A. Costa-Pierce and J.E. Rakocy. World Aquaculture Society, Louisiana.
- Sumpter, J.P. 1997. The endocrinology of stress. In: Fish Stress and Health in Aquaculture. pp.95-118. Edited by G.K. Iwana, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck. University Press, Cambridge.
- Takeuchi, T., Satoh, S. and Watanabe, T. 1983. Dietary lipids suitable for practical feed of *Tilapia nilotica*. Bull. Jpn. Sci. Fish. 49: 1361-1365.
- Wang, X.Y., Ming-Long, L., Hung, T.H. and Seib, P.A. 1988. Liquid chromatographic determination of L-ascorbate 2-polyphosphate in fish feeds by enzymatic release of L-ascorbate. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 1158-1161.

Waagbo, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E. and Sandnes, K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem. 12: 61-73.

Wedemeyer, G. 1969. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. Comp. Biochem. Physiol. 29: 1247-1251.

Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and Mcleay, D.J. 1990. Stress and acclimation. In: Methods for Fish Biology. pp.451-489. Edited by C.B. Schreck, and P.B. Moyle. American Fisheries Society, Bethesda.

Yassin, N. 2001. Análise de experimentos fatoriais de dois fatores com tratamentos adicionais. 161pp. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingrediente	Tratamentos							
	0mg	125mg	300mg	600mg	1200mg	300mg	600mg	1200mg
	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C	vit C
	0% lip	6% lip	8% lip	8% lip	8% lip	12% lip	12% lip	12% lip
Farelo soja	54,88	56,27	56,74	56,74	56,80	57,65	57,08	57,70
Glúten milho	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha peixe	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Fubá milho	24,10	16,67	14,15	14,07	13,84	9,24	9,13	8,94
Farelo trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo soja	-	6,00	8,00	8,00	8,00	12,00	12,00	12,00
Fosfato bicálcico	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Suplem vit e min ¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
VIT C ³	-	0,04	0,09	0,17	0,34	0,09	0,17	0,34
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100
PB (%) ^{5**}	36,05	36,12	35,70	34,97	35,69	36,20	36,50	36,03
EB (kcal/kg) ^{6**}	4640,10	4702,04	4809,71	4858,14	4853,41	5192,06	5184,51	5157,60
EE (%) ^{7**}	2,79	8,88	10,89	10,81	10,68	14,59	14,44	14,68
FB (%) ^{8*}	4,28	4,19	4,16	4,16	4,16	4,12	4,12	4,12
VIT C (mg/kg) ^{9**}	ND ¹⁰	189,00	360,00	527,00	1247,00	331,00	493,00	1108,00

¹ Suplemento vitamínico e mineral (Socil Guyomarc'H Indústria e Comércio Ltda): Vitamina A, 1.200.000 UI; Vitamina D₃, 200.000 UI; Vitamina E 1.200 mg; Vitamina K₃, 2.400 mg; Vitamina B₁, 4.800 mg; Vitamina B₂, 4.800 mg; Vitamina B₁₂, 4.800 mcg; Vitamina B₆, 4.800 mg; **Vitamina C, zero⁴**; Pantotenato de cálcio, 12.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Ácido fólico, 1.200 mg; Biotina, 48 mg; Cloreto de colina, 108 g; Cobalto, 10 mg; Cobre, 3.000 mg; Sulfato ferroso heptahidratado, 50.000 mg; Iodo, 100 mg; Manganês, 20.000 mg; Selênio, 100 mg; Sulfato de zinco, 30.000 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g;

² Antioxidante; ³ Vitamina C 35,0% ativa; ⁴ Adequado à pesquisa; ⁵ Proteína bruta; ⁶ Energia bruta; ⁷ Extrato etéreo; ⁸ Fibra bruta; ⁹ Vitamina C; ¹⁰ Não determinado; ** Valor calculado; * Valor determinado.

Tabela 2. Valores médios de eritrócitos (Erit), hematócrito (Htc) e hemoglobina (Hb) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Erit Inicial (10 ⁶ /μL)	Erit Final (10 ⁶ /μL)	Htc Inicial (%)	Htc Final (%)	Hb Inicial (g/dL)	Hb Final (g/dL)
0	0	1,67 (± 0,17)	1,52 (± 0,04)	27,10 (± 1,20)	26,50 (± 1,45)	7,75 (± 0,75)	7,01 (± 1,35)
125	6	1,92 α (± 0,11)	1,72 β (± 0,11)	29,40 α (± 0,92)	26,20 β (± 1,21)	8,33 (± 0,58)	8,54 (± 1,16)
300	8	1,94 (± 0,14)	1,80 b (± 0,05)	28,26 α (± 0,17)	25,10 bβ (± 1,02)	8,17 (± 0,56)	7,50 (± 1,02)
600		2,09 (± 0,20)	1,95 a (± 0,07)	29,20 α (± 0,29)	27,60 aβ (± 0,80)	7,65 (± 0,33)	7,70 (± 1,49)
1200		1,99 (± 0,10)	1,95 a (± 0,06)	30,27 α (± 2,01)	27,75 aβ (± 0,67)	7,96 (± 0,34)	8,39 (± 0,40)
300		1,98 (± 0,19)	1,79 b (± 0,09)	29,50 α (± 0,82)	25,00 bβ (± 1,45)	8,22 (± 0,80)	7,68 (± 0,91)
600	12	1,98 (± 0,17)	1,80 ab (± 0,08)	29,00 α (± 0,77)	27,08 aβ (± 0,88)	8,00 (± 0,49)	8,02 (± 2,37)
1200		1,97 (± 0,17)	1,94 a (± 0,05)	29,17 α (± 0,83)	27,00 aβ (± 0,57)	8,01 (± 0,41)	8,32 (± 1,38)
² Cont. 1 vs Fat.		0,01	0,05	0,05	ns	ns	ns
³ Cont. 2 vs Fat.		ns	ns	ns	ns	ns	ns
Vit C ⁴		ns	0,05	ns	0,05	ns	ns
300		1,96	1,80	28,88	25,05	8,20	7,59
600		2,04	1,88	29,10	27,34	7,83	7,86
1200		1,98	1,95	29,72	27,38	7,99	8,36
Lip ⁵		ns	ns	ns	ns	ns	ns
	8	2,01	1,90	29,24	26,82	7,92	7,86
	12	1,98	1,84	29,22	26,36	8,08	8,01
Vit C x Lip ⁶		ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 3. Número médio de volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	VGM ² Inicial (fL)	VGM Final (fL)	CHGM ³ Inicial (%)	CHGM Final (%)
0	0	162,28 (± 15,06)	174,34 (± 4,28)	28,60 (± 2,69)	26,45 (± 1,16)
125	6	153,13 (± 7,30)	152,33 (± 9,96)	28,33 (± 1,26)	32,60 (± 2,77)
300	8	145,67 (± 9,15)	139,44 (± 6,31)	28,91 (± 2,02)	29,88 (± 1,20)
600		139,71 (± 13,16)	141,54 (± 15,12)	26,20 (± 1,62)	27,90 (± 0,88)
1200		152,11 (± 13,78)	142,31 (± 4,27)	26,30 (± 2,27)	30,23 (± 1,01)
300		148,99 (± 10,71)	139,66 (± 10,71)	27,86 (± 1,16)	30,72 (± 1,51)
600	12	146,46 (± 7,28)	150,44 (± 9,09)	27,59 (± 2,81)	29,62 (± 1,80)
1200		148,07 (± 15,75)	139,18 (± 9,81)	27,46 (± 1,55)	30,81 (± 2,60)
⁴ Cont. 1 vs Fat.		ns	0,05	ns	0,05
⁵ Cont. 2 vs Fat.		ns	ns	ns	ns
Vit C ⁶		ns	ns	ns	ns
300	Lip ⁷	147,33	139,55	28,39	30,30
600		143,09	145,99	26,90	28,76
1200		150,09	140,75	26,88	30,52
		ns	ns	ns	ns
	8	145,83	141,10	27,14	29,33
	12	147,84	143,09	27,64	30,38
Vit C x Lip ⁸		ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ²VGM=[(Htc/Erit)*10]; ³CHGM=[(Hb/Htc)*100]; ⁴ Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁵ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁶ Efeito da vitamina C, nível P; ⁷ Efeito do lipídeo, nível P; ⁸ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 4. Concentração média de vitamina C (Vit C) no fígado de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Vit C Inicial (µg/g)	Vit C Final (µg/g)
0	0	120,85 α (± 13,60)	18,90 β (± 1,63)
125	6	313,18 α (± 19,60)	20,93 β (± 4,49)
300	8	280,19 bα (± 24,30)	27,77 bβ (± 1,18)
600		480,39 aα (± 46,90)	33,65 aβ (± 4,87)
1200		510,00 aα (± 32,90)	30,19 aβ (± 1,41)
300	12	340,43 bα (± 63,70)	27,05 bβ (± 1,81)
600		450,52 aα (± 70,18)	32,80 aβ (± 2,52)
1200		490,47 aα (± 60,18)	34,55 aβ (± 4,53)
² Cont. 1 vs Fat.		0,05	0,05
³ Cont. 2 vs Fat.		0,05	0,05
Vit C ⁴		0,05	0,05
300		310,31	27,41
600		465,46	33,23
1200		500,24	32,37
	Lip ⁵	ns	ns
	8	423,53	30,54
	12	427,14	31,47
Vit C x Lip ⁶		ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

Tabela 5. Concentração média de cortisol plasmático e glicose plasmática de juvenis de tilápia do Nilo arraçados com dietas suplementadas com diferentes níveis de lipídeo e vitamina C submetidos a estresse térmico¹

Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Cortisol Inicial (mg/dL)	Cortisol Final (mg/dL)	Glicose Inicial (mg/dL)	Glicose Final (mg/dL)
0	0	30,65 (± 3,19)	29,07 (± 7,94)	33,19 (± 4,27)	32,46 (± 3,68)
125	6	15,91 (± 7,80)	10,27 (± 6,75)	32,48 (± 7,28)	33,41 (± 4,37)
300		15,97 (± 17,79)	11,56 (± 1,99)	40,70 (± 5,82)	69,59 (± 38,15)
600	8	22,43 α (± 5,86)	9,62 β (± 3,26)	34,09 (± 4,31)	65,51 (± 37,20)
1200		34,20 α (± 8,83)	8,49 β (± 3,94)	35,94 (± 8,47)	32,57 (± 2,67)
300		20,91 (± 20,26)	13,80 (± 17,73)	33,85 (± 6,50)	32,35 (± 5,11)
600	12	30,06 α (± 6,48)	10,81 β (± 3,08)	37,19 (± 4,48)	33,03 (± 4,76)
1200		21,63 α (± 9,80)	6,75 β (± 6,09)	43,14 (± 6,80)	43,89 (± 16,06)
² Cont. 1 vs Fat.		ns	0,05	ns	ns
³ Cont. 2 vs Fat.		ns	ns	ns	ns
Vit C ⁴		ns	ns	ns	ns
300		18,44	12,68	37,28	50,97
600		26,25	10,12	35,64	49,27
1200		27,92	7,62	39,54	38,23
Lip ⁵		ns	ns	ns	ns
	8	24,20	9,89	36,91	55,89
	12	24,20	10,45	38,06	36,42
Vit C x Lip ⁶		ns	ns	ns	ns

¹ Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de vitamina C dentro de um mesmo nível de lipídeo; Letras maiúsculas comparam diferentes níveis de lipídeo dentro de um mesmo nível de vitamina C; Letras gregas comparam um mesmo nível de vitamina C e lipídeo nas diferentes condições experimentais; Valores médios acompanhados de letras iguais, ou ausente de letra, não diferem entre si estatisticamente; ² Controle 1 (ausente de suplementação de vitamina C e lipídeo) vs Fatores, nível P; ³ Controle 2 (125,0 mg de vitamina C/kg dieta e 6,0% lipídeo) vs Fatores, nível P; ⁴ Efeito da vitamina C, nível P; ⁵ Efeito do lipídeo, nível P; ⁶ Interação entre vitamina C e lipídeo, nível P.

IMPLICAÇÕES

Este estudo suscitou as seguintes implicações:

1. Existe significativa inter-relação entre o estado nutricional dos peixes e a resistência desses as doenças. Esta inter-relação é determinada principalmente pelas características nutricionais da ração. A deficiência e/ou o desbalanço de nutrientes neste produto, pode determinar aos peixes alterações fisiológicas significativas que resultem em queda na produção e até mesmo mortalidade. As rações formuladas para atender as exigências nutricionais dos peixes em crescimento, não necessariamente determinam melhores condições orgânicas que permitam aos peixes adequadas respostas fisiológicas adaptativas para o enfrentamento das situações de estresse, as quais esses são rotineiramente submetidos num processo de produção. Assim, o desenvolvimento de um produto com características nutricionais especiais vem de encontro com as necessidades dos produtores e determina um marco na nutrição e produção de peixes, onde o crescimento deixa de ser meta exclusiva num sistema de produção.
2. O produtor que adota em sua criação sistemas de produção intensivo ou super-intensivo reconhece os pontos críticos num processo de produção. A disponibilidade de uma ração especial no mercado apresenta-se como uma das

opções para mitigar ou eliminar os resultados negativos nesses pontos críticos. Esta ração não necessita necessariamente ser utilizada em todo o processo de produção, pode ser por exemplo, empregada nas semanas que antecedem o manejo intenso, momento considerado crítico. Esta prática vem sendo adotada com sucesso pelos produtores brasileiros, o que comprova a eficácia deste produto.

3. Em toda atividade de produção a relação custo/benefício do produto a ser utilizado deve ser considerada. No processo industrial de criação de peixes, a ração representa parte considerável do custo total de produção. A ração especial apresentada nesta pesquisa tem maior custo se comparada às demais disponíveis no mercado de rações. Contudo, sua qualidade nutricional e suas opções de utilização podem vir a determinar o sucesso econômico da produção, o qual está diretamente vinculado aos índices zootécnicos de produção.