

**SUPLEMENTAÇÃO DE ASCORBIL PALMITATO EM RAÇÕES
PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO E RESPOSTA AO
ESTRESSE**

ULISSES SIMON DA SILVEIRA

2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silveira, Ulisses Simon da.

Suplementação de ascorbil palmitato em rações para alevinos de
tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): desempenho e resposta ao estresse
/ Ulisses Simon da Silveira. -- Lavras : UFLA, 2008.

62 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Priscila Vieira Rosa Logato.

Bibliografia.

1. Ascorbil palmitato. 3. Ácido ascórbico. 3. Ácido dehidroascórbico. 4.
Cortisol. 5. Estresse. 6. Peixe. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 639.3758

ULISSES SIMON DA SILVEIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE ASCORBIL PALMITATO EM RAÇÕES
PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO E RESPOSTA AO
ESTRESSE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de ruminantes, para a obtenção do título "Doutor".

Orientadora
Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

ULISSES SIMON DA SILVEIRA

**SUPLEMENTAÇÃO DE ASCORBIL PALMITATO EM RAÇÕES
PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO E RESPOSTA AO
ESTRESSE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de “Doutor”.

Aprovada em 31 de julho de 2008

Prof^ª. Dr^ª. Adelir Aparecida Saczk	DQI / UFLA
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas	DMV / UFLA
Prof^ª. Dr^ª. Paula Adriane Perez Ribeiro	UNIFENAS
Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	DZO / UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Priscila Vieira Rosa Logato
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai, Otto Gramigna da Silveira, por todo o conhecimento!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia.

À professora Priscila Viera Rosa Logato, pela orientação e confiança em mim depositada, toda a minha gratidão e respeito.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, em nome do ex-reitor Luiz Antônio Alvarez Gonçalves e a ex-vice Reitora Eleuza Ferreira Duarte, pelo apoio.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro

Aos meus co-orientadores, professores, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e Elias Tadeu Fialho, pelas orientações, apoio e amizade, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Adelir Aparecida Saczk, Luis David Solis Murgas e Henrique César Pereira Figueiredo, pelas intervenções e sugestões a este trabalho e pela amizade.

Aos professores da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, José do Nascimento, José Fernando de Campos, Alex Sandro Richter Won Mühlen, Rita Carmen Richter, Nívea Margarete, Maria de Lurdes Nunes, Milton Valencuela, Luiz Fernando Bogaz e a todos que me apoiaram.

Aos amigos Daniel Okamura e Felipe Guedes de Araújo, pelas orientações corretas, apoio nas “crises” e pela amizade.

Aos colegas Meryene de Carvalho Teixeira, Gilmar Junqueira M. Pereira, Viviane de Oliveira Felizardo, Mariana Martins Drumond, Natália Michele Nonato Mourad, Rafael Venâncio de Araújo, Edvânia Pontes e a todos que me apoiaram nas análises de laboratório e no experimento, muito obrigado.

Aos funcionários do Setor de Piscicultura Eleci Pereira e José Roberto dos Santos, pelo apoio e amizade.

A minha esposa, Enaura Campos Freitas e aos meus filhos, Aleph e Amanda Campos da Silveira, minhas maiores motivações.

A minha mãe, Astrid Simon da Silveira e meus irmãos, Leopoldo, Marco Túlio, Otto e, principalmente, Yuri Simon da Silveira, que sempre me auxiliou, obrigado mano!

A todos aqueles que me auxiliaram, mas que aqui não são citados, muito obrigado por tudo!

A MENTE É COMO UM PARA-QUEDAS: SÓ FUNCIONA QUANDO ABERTA!

Lorde Thomas Dewar

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C NA COMPOSIÇÃO CORPORAL DE ASCORBIL PALMITATO, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO, NO DESEMPENHO E NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	3
SUPLEMENTAÇÃO DE ASCORBIL PALMITATO EM RAÇÕES PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE TRANSPORTE.....	26
CONCLUSÕES GERAIS.....	57

RESUMO

SILVEIRA, Ulisses Simon da. **Suplementação de ascorbil palmitato em rações para alevinos de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*): desempenho e resposta ao estresse**. 2008. 62 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O experimento foi conduzido no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de ascorbil palmitato como forma de vitamina C para alevinos de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 720 alevinos com peso médio inicial de $1,40 \pm 0,12$ g, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado em 24 tanques circulares com capacidade total de 100 L, seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos continham seis níveis de ascorbil palmitato: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/kg, em rações semipurificadas, isocalóricas com 3178 kcal ED e isoprotéicas com 35% PB, por um período de 36 dias. Ao trigésimo sétimo dia de experimento, os peixes foram mantidos em jejum, por 24 horas, para a simulação do transporte. Os animais foram transportados em sacos plásticos de 100 litros de capacidade total (com 1/3 de água e 2/3 de oxigênio), em rodovia asfaltada, por, aproximadamente, 2 horas. Não foi observada mortalidade durante e depois do transporte. Após o transporte, os peixes foram recolocados nas caixas experimentais. Foram coletados 20 alevinos por parcela, sendo cinco em cada período: antes do transporte (C1), logo após o transporte (C2), 8 horas após o transporte (C3) e 18 horas após transporte (C4). Os peixes foram insensibilizados com choque térmico para a determinação do comprimento total (CT), altura de cabeça (AC), peso (P) e taxa de sobrevivência (S). Após liofilização, foram determinados os valores de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (ADA) no corpo inteiro utilizando-se a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cortisol por kit ELISA. Com a suplementação de ascorbil palmitato foram constatados: efeito significativo nas avaliações de peso, comprimento total e altura de cabeça, com crescimento linear ($P < 0,01$); efeito significativo na redução da mortalidade; aumento linear da taxa de sobrevivência ($P < 0,01$) e efeito significativo sobre a composição corporal de ascorbil palmitato, nos períodos de coleta 1, 2, 3 e 4 ($P < 0,01$), aumentando linearmente. O teor de ácido ascórbico aumentou ($P < 0,01$) linearmente no período de coleta 1, ocorrendo efeito quadrático ($P < 0,01$) no período de coleta 2. A concentração de ADA aumentou linearmente ($P < 0,01$) nos períodos de coleta 2 e 4. A composição corporal total das formas de ácido ascórbico (ascorbil palmitato + ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) reduziu-se significativamente ($P < 0,02$) em uma curva quadrática progressivamente após o transporte. Observou-se redução linear na concentração de cortisol nos períodos

de coleta 3 ($P<0,01$) e 4 ($P<0,02$). As concentrações de cortisol total, analisadas durante os quatro períodos de coleta, apresentaram redução linear ($P<0,01$) com a suplementação de ascorbil palmitato.

Palavras-chave: Peixes, ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, cortisol, estresse.

Orientadora: Prof^a Priscila Vieira Rosa Logato

ABSTRACT

SILVEIRA, Ulisses Simon da. **Supplementation of ascorbil palmitate in diets for Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*): performance and response to stress**. 2008. 62 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The experiment was conducted in the Pisciculture Station Laboratory of the Federal University of Lavras (UFLA) with the objective of evaluating the effect of the supplementation of ascorbil palmitate as a form of vitamin C for Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). 720 fingerlings with an early live weight of 1.40 ± 0.12 g, allocated to a completely randomized design in 24 circular tanks with a total capacity of 100 L, six treatments and four replicates, were utilized. The treatments contained six levels of ascorbil palmitate: 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 g/kg, in semi-purified, isocaloric diets with 3,178 kcal DE and isoprotein diets with 35% CP for a 36-day period. On the thirty-seventh day of the experiment, the fishes were maintained fasting for 24 hours for the simulation of the transportation. The animals were transported in plastic bags of 100 liters' total capacity (with 1/3 of water and 2/3 of oxygen), on an asphalt-covered roadway for about 2 hours. No mortality either during or after the transportation was found. After transportation, the fishes were returned into the experimental boxes. 20 (twenty) fingerlings were collected per plot, that is, five at each period before transportation (C1), soon after transportation (C2), 8 hours after transportation (C3) and 18 hours after transportation (C4). The fishes were insensibilized with a heat shock for determination of the total length (CT), head height (AC), weight and survival rate (P). After freeze-drying, the values of ascorbil palmitate (AP), ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (ADA) in the whole body were determined by utilizing high performance liquid chromatography (HPLC) and cortisol by ELISA kit. With the supplementation of ascorbil palmitate were found significant effects in the evaluations of weight, total length and head height with linear growth ($P < 0.01$); significant effect in mortality reduction; linear increase of survival rate ($P < 0.01$) and significant effect on the body composition of ascorbil palmitate in the collection periods 1, 2, 3 and 4 ($P < 0.01$), increasing linearly. Ascorbic acid content increased ($P < 0.01$) linearly in collection period 1, quadratic effect ($P < 0.01$) occurring in collection period 2. The concentration of ADA increased linearly ($P < 0.01$) in collection periods 2 and 4. The total body composition of the forms of ascorbic acid (ascorbil palmitate + ascorbic acid + dehydroascorbic acid) reduced significantly ($P < 0.02$) in a quadratic curve progressively after transportation. A linear reduction in the cortisol concentration in collection periods 3 ($P < 0.01$) and 4 ($P < 0.02$) was observed. The concentrations of total cortisol, analyzed

during the four collection periods, showed a linear reduction ($P < 0.01$) with ascorbil palmitate supplementation.

Key words: Fishes, ascorbil palmitate, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, stress.

Advisor: Prof^a Priscila Vieira Rosa Logato

INTRODUÇÃO

A aqüicultura está atingindo um grau de profissionalismo semelhante ao observado na produção de suínos e aves. Para estimular o aumento da produtividade e de sobrevivência, é necessário que o produtor tenha conhecimento das características da espécie a ser cultivada, das exigências nutricionais e do manejo necessário para o bom desenvolvimento sem perdas, o qual ocasionaria prejuízos e inviabilização de continuidade na atividade aqüícola.

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie amplamente cultivada em todo o mundo e foi introduzida, inicialmente, no Brasil, no município de Pentecostes, no estado do Ceará, pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) em 1971. Devido à sua resistência a águas com temperatura superiores a 25°C, tornou-se uma das espécies preferidas, no Brasil, para o cultivo em piscicultura, tanto no manejo tradicional em viveiros como em tanque-rede.

Devido à grande procura de alevinos desta espécie, em todas as regiões do Brasil, faz-se necessário o transporte, na maioria das vezes, por longas idistâncias, entre o laboratório de reprodução e a aqüicultura de engorda. O manejo e o transporte por longas distâncias são fatores promotores de estresse e, se não realizado de maneira correta, favorece o aparecimento de indivíduos doentes, com baixo desempenho zootécnico e alta taxa de mortalidade.

Em pesquisas desenvolvidas desde a década de 1960, na nutrição e no manejo de peixes, verificou-se que certos nutrientes têm propriedades preventivas e terapêuticas, que auxiliam o processo de redução do estresse, promovido pelo manejo e o transporte dos alevinos.

O ácido ascórbico é fonte de vitamina C para os peixes. Como os primatas, os peixes também não têm capacidade de síntese desta vitamina, devido à ausência de enzima responsável pela formação de ácido ascórbico a partir da

glicose. Devido a esta limitação metabólica, é necessária a sua suplementação na dieta, em níveis que atendam à exigência metabólica dos peixes.

Em experimentos nos quais se testou o efeito da vitamina C sobre condições inadequadas de manejo, que promovem o estresse, observou-se que a vitamina C apresentou efeito positivo sobre a resistência e a recuperação de peixes lesionados, o que promoveu maior taxa de sobrevivência e desempenho dos peixes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- O experimento teve foi realizado com o objetivo geral de avaliar o efeito da suplementação de ascorbil palmitato como forma de vitamina C para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), como promotor de desempenho e na redução do estresse.

Objetivos específicos

- Determinação do melhor nível de suplementação de vitamina C na forma de ascorbil palmitato para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)
- Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de desempenho, foram observados a taxa de sobrevivência, o peso, o comprimento total e a altura de cabeça dos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), por um período de 36 dias.
- Para avaliar o efeito do ascorbil palmitato sobre o estresse provocado pelo transporte, foram analisados os valores corporais de ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e cortisol.

Efeito da suplementação de vitamina C na composição corporal de ascorbil palmitato, ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico no desempenho e na taxa de sobrevivência de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

Ulisses Simon da Silveira¹, Daniel Okamura¹, Felipe Guedes de Araujo¹, Priscila Vieira Rosa Logato², Rilke Tadeu Fonseca de Freitas², Luis David Solis Murgas³, Adelir Aparecida Saczk⁴

¹ Alunos do programa de doutorado do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras

² Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Correspondência para o autor: Priscila Vieira Rosa Logato, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, cep. 37200-000, MG, Brasil. Tel.: 55 35 3829 1286/1231; fax: 55 35 3829 1231. e-mail: priscila@ufla.br

RESUMO

O experimento foi conduzido no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de ascorbil palmitato como forma de vitamina C para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 720 alevinos com peso médio inicial de $1,40 \pm 0,12$ g, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em 24 caixas experimentais de fibra de vidro com capacidade de 100 litros e 30 peixes em cada, com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos continham seis níveis de ascorbil palmitato: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g kg⁻¹, em rações semipurificadas, isocalóricas, com 3.177 kcal ED e isoprotéicas, com 35,02% PB, por um período de 36 dias. Ao final do período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e sacrificados com água a 0°C para a determinação do comprimento total (CT), altura de cabeça (AC), peso (P) e taxa de sobrevivência (S). Após liofilização, foram determinados os valores de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (ADA) no corpo inteiro, utilizando-se HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Houve efeito significativo da suplementação de ascorbil palmitato nas avaliações de peso, comprimento total e altura de cabeça, com crescimento linear ($P < 0,01$). A taxa de sobrevivência aumentou linearmente com a suplementação de ascorbil palmitato ($P < 0,01$). O ascorbil palmitato teve efeito significativo ($P < 0,01$) em aumentar a composição corporal das formas de ascorbil palmitato e ácido ascórbico nos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que o ascorbil palmitato é uma eficiente forma de vitamina C para a adição a dieta de peixes.

Palavras-chave: Ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, desempenho, peixes.

ABSTRACT

The experiment was conducted in the Pisciculture Station Laboratory of the Federal University of Lavras (UFLA), with the objective of evaluating the effect of the supplementation of ascorbil palmitate as a form of vitamin C for Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). 720 fingerlings with an early average weight of 1.40 ± 0.12 g, allocated to a completely randomized design in 24 experimental glassfiber boxes with a capacity of 100 L and 30 fishes in each, with six treatments and four replicates were utilized. The treatments contained six levels of ascorbil palmitate: 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 g kg^{-1} , in semi-purified, isocaloric diets with 3,177 kcal DE and isoprotein diet with 35.02% CP for a 36-day period were utilized. At the final of the experimental period, the fishes were maintained fasting for 24 hours and slaughtered with water at 0°C for determination of the total length (CT), head height (AC), weight (P) and survival rate (S). After freeze-drying, the values of ascorbil palmitate (AP), ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (ADA) were determined in the whole body, by utilizing HPLC (High Performance Liquid Chromatography). There was a significant effect of the supplementation of ascorbil palmitate on the evaluations of weight, total length and head height with linear growth ($P < 0.01$). The survival rate increased linearly with ascorbil palmitate supplementation ($P < 0.01$). Ascorbil palmitate had a significant effect ($P < 0.01$) in increasing the body composition of the forms of both ascorbil palmitate and ascorbic acid in Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). The results obtained in this experiment demonstrated that ascorbil palmitate is an efficient form of vitamin C for addition to fish diet.

Key words: Ascorbil palmitate, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, performance, fishes.

INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é amplamente cultivada em todo o mundo, sendo o terceiro gênero de peixe mais produzido em cativeiro, superado apenas pelas carpas e os salmonídeos (EL-SAYED, 1999). No Brasil, a espécie foi introduzida no município de Pentecostes, estado do Ceará, pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em 1971, devido à sua origem tropical e boa aceitação a águas com temperatura superiores a 25°C. Por suas características de prolificidade, precocidade, rusticidade e hábito alimentar onívoro, é uma das espécies mais exploradas na aquicultura brasileira, representando 38,22% da produção total de pescado oriunda de cultivo (MOREIRA et al, 2007).

O estudo da suplementação de vitamina C na aquicultura remonta ao ano de 1965, quando Kitamura et al. (1965) foram pioneiros ao demonstrar a necessidade da suplementação de ácido ascórbico para a melhora do desempenho de carpas (*Cyprinus carpio*) e de truta arco-íris (*Salmo gairdneri*).

A vitamina C participa de importantes funções fisiológicas, como a síntese de colágeno, do tecido conectivo, a cicatrização e a regeneração de feridas e da matriz óssea, atuando no crescimento e no desenvolvimento do esqueleto dos vertebrados (CAHU et al. 2003; LALL & LEWIS-MCCREA, 2007). O ácido ascórbico é co-fator na hidroxilação da lisina e da prolina, necessárias para a conversão do protocógeno em colágeno. Esta hidroxilação ocorre dentro da célula, no retículo endoplasmático rugoso. A síntese de colágeno é dependente da atividade celular de fibroblastos e a vitamina C tem papel fundamental na maturação destas células (PADH, 1991).

As deformações ósseas, quando da deficiência de ácido ascórbico, estão associadas à incapacidade dos peixes de promover a síntese de colágeno (HALVER, 2002). As anormalidades físicas, como a lordose e a escoliose, são

consideradas os primeiros sinais da deficiência da vitamina C (DABROWSKI et al., 1988; DABROWSKI et al., 1990; WIMBERGER, 1993; MADSEN & DALSGAARD, 1999; WANG et al., 2002) e são mais frequentes em larvas e alevinos do que para peixes adultos (SATO et al., 1982).

A vitamina C também tem importante participação no metabolismo energético, pela biosíntese da carnitina, a partir da lisina e da metionina. A carnitina é responsável pelo transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias. Atua também na conversão do ácido fólico em folínico. Na absorção intestinal e no metabolismo do ferro, participa da transformação do ferro do estado férrico para o estado ferroso (CHIEN & HWANG, 2001; WAHLI et al., 2003; FALCON et al., 2007).

Embora algumas espécies sejam reconhecidas por possuir pequena capacidade de síntese, a maioria dos peixes teleósteos não tem capacidade de sintetizar o ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) a partir da D-glicose ($C_6H_{12}O_6$), devido à ausência da enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase (GLO), responsável pela catalise da última etapa da reação de síntese, no fígado. Devido a essa incapacidade, torna-se necessária a suplementação de vitamina C, na preparação de dietas para a produção intensiva de peixes (YAMAMOTO et al., 1978; ROBERTS et al., 1995).

Os sintomas de deficiência de vitamina C para peixes são caracterizados, inicialmente, por anorexia e redução da taxa de crescimento. Em seguida, surgem as deformações do tecido ósseo e cartilaginoso, pela deficiência de colágeno. Outros sintomas são erosões da barbatana caudal; fragilidade capilar, originando as hemorragias; anemias pela deficiência de absorção e metabolismo do ferro; dificuldades de cicatrização, culminando com uma alta taxa de mortalidade e redução significativa da taxa reprodutiva (KITAMURA et al., 1965; MARTINEZ-CHAVES & MARTINEZ, 1990; SOLIMAN et al., 1994;

FRISCHKNECHT et al., 1994; BLOM & DABROWSKI, 1996; ADHAM et al., 2000).

Diferentes formas de ácido ascórbico têm sido testadas para a suplementação de vitamina C para peixes. O ascorbil palmitato, um éster de ácido ascórbico insolúvel em água e considerado uma forma mais estável da vitamina C, é muito utilizado em emulsões para enriquecer alimentos vivos, como zooplâncton (RANKEN, 1974; GAPASIN et al., 1998; SMITH et al., 2004), mas pouco pesquisado como suplemento para ração dos peixes (SOLIMAN et al., 1986; ALBREKTSEN et al., 1988; OKAMURA, 2007)).

A utilização do ascorbil palmitato suplementado na dieta de peixes resume-se a poucos trabalhos em experimentos com bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*), tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), trutas arco-íris (*Salmo gairdneri*), dourado (*Salminus brasiliensis*) e com camarão-da-malásia (*Macrobrachium rosenbergii*), em pesquisas de vários autores, como BRANDT et al. (1985), SOLIMAN et al. (1986), ALBREKTSEN et al. (1988), OKAMURA (2007) e D'ABRAMO et al. (1994), respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico na forma de ascorbil palmitato para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), por um período de 36 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 27 de fevereiro a 4 de abril de 2008, totalizando 36 dias, em um ensaio com delineamento inteiramente casualizado, oferecendo seis tratamentos, com diferentes níveis de ácido ascórbico e quatro repetições.

Foram utilizados 720 alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso médio inicial de $1,40 \pm 0,12$ g, distribuídos aleatoriamente em 24 caixas experimentais, numa população de 30 alevinos por caixa.

As caixas foram abastecidas por um sistema de recirculação de água, com filtro biológico e aeradores elétricos individuais com pedra porosa. Foi estabelecido controle do fotoperíodo, mantendo período de luz e escuridão de 12/12 horas, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos da água foram registrados diariamente, em horários alternados, às 8 horas e às 15 horas. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos por termômetro e oxímetro digital (YSI, USA) e o pH, amônia, nitrito e nitrato medidos por kit de aquário comercial (Alcon, Brasil). A limpeza e a sifonagem das caixas foram feitas duas vezes por dia.

Os tratamentos experimentais (Tabela 1) foram compostos de seis rações semipurificadas, isocalóricas ($3177 \text{ kcal kg}^{-1}$) e isoprotéicas (35,02%), contendo os tratamentos: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de ascorbil palmitato na ração.

As rações foram elaboradas no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Lavras. O premix vitamínico foi formulado para não conter nenhuma fonte de ácido ascórbico. As rações foram peletizadas em moedor de carne, secas em estufa ventilada a 30°C , por 24 horas, trituradas em liquidificador elétrico e estocadas em geladeira a 4°C . As rações foram fornecidas três vezes ao dia, “ad libitum”.

Tabela 1: Composição da ração experimental, usada para testar o efeito do ascorbil palmitato para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingredientes (%)	Ração Basal
Farinha de peixe ^a	41,35
Amido de milho	32,89
Albumina	10,00
Gelatina	5,00
Celulose	5,00
Óleo vegetal	3,00
Premix mineral ^b	0,15
Premix vitamínico ^c	0,08
Fosfato bicálcico	1,50
Antioxidante (BHT) ^d	0,02
Composição centesimal da ração experimental	
Proteína bruta (%)	35,02
Energia digestível (kcal kg ⁻¹)	3177
Extrato etéreo (%)	6,54
Matéria seca (%)	91,46

^a Farinha de resíduos da indústria de sardinha

^b Premix mineral (composição/kg): Mn. 80 mg, Fe. 24 mg, Zn. 50 mg, Cu. 8 mg, I. 1,3 mg, Se. 0,10 mg, Co. 10 mg.

^c Premix vitamínico (composição/kg): Vit.A. 1200.000 UI; D₃. 200000 UI; E. 1200 mg; K₃. 2400 mg; B₁. 4800 mg; B₂. 4800 mg; B₁₂. 4800 mcg; B₆. 4800 mg; cloreto de colina. 108 g; pantotenato de cálcio. 12000 mg; niacina. 24000 mg; ácido fólico. 1200 mg; biotina. 48 mg.

^d butil-hidroxi-tolueno

Após o período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, insensibilizados por choque térmico para a determinação do peso (P) em balança analítica, comprimento total (CT) e altura de cabeça (AC), com paquímetro digital e porcentagem de sobrevivência (S), segundo metodologia descrita por Nakatani et al. (2001). Os animais foram liofilizados por 24 horas, armazenados em frascos de análises laboratoriais hermeticamente vedados e estocados em freezer. As análises das três formas de vitaminas nos peixes e na

ração foram feitas nos laboratórios dos Departamentos de Química e de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

A análise de vitamina C foi realizada pela técnica HPLC (VARIAN), com uma bomba ternária modelo 9012, injetor automático (modelo 9300) e, como detector, um espectrofotômetro (modelo 9050) na região de UV/Vis (Modelo 9010). Para todas as análises foi utilizada uma coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (1,0 x 4,6 mm, 5 um) (VARIAN).

Para a extração de ácido ascórbico e de ácido dehidroascórbico, utilizaram-se as metodologias de Papp et al. (1998), em que a 400 mg de amostra de peixe triturado foram adicionados 3 mL de acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ e pH 4,8 (solução extratora), centrifugado a 15.000 xg, a 4°C, por 10 minutos e retirado o sobrenadante. O procedimento foi repetido com 2 mL de acetato de sódio. Ao total de sobrenadante obtido, adicionaram-se mais 166 µL de acetato de sódio e 250 µL de ácido perclórico 72%. O sobrenadante foi novamente centrifugado e filtrado em membrana 0,45 µm Millipore. Uma alíquota de 20 µL foi injetada no HPLC e manteve-se constante o fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A fase móvel foi composta por sal tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,5 mM, ácido etilenodiaminotetra acético 0,5 mM (sal dissódico), acetato de sódio 0,04 M e pH ajustado para 3,76, com o ácido fosfórico a 85% e o comprimento de onda foi fixado em 250 nm.

Para a extração do ascorbil palmitato utilizou-se a metodologia descrita por Huo et al. (1996) e por Freitas e Moretti (2006), em que a 400 mg de peixe triturado e liofilizado foram adicionados 3 mL de metanol contendo 0,02% de butilhidroxitolueno (solução extratora), centrifugado a 15.000 xg, a 4°C, por 10 minutos e retirado o sobrenadante. O procedimento foi novamente repetido e os sobrenadantes somados. Posteriormente, cerca de 60 µl foram retirados e realizou-se um *clean-up* utilizando-se uma coluna de vidro contendo sílica C₁₈ e, depois, filtrados em membrana 0,45 µm. Uma alíquota de 20 µl foi injetada no

HPLC e o fluxo utilizado foi de $1,8 \text{ ml min}^{-1}$. A fase móvel foi composta de 100% de metanol e o comprimento de onda no detector espectrofotométrico foi de 280 nm.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, utilizando-se o pacote computacional Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas, ou SAEG (2005), versão 9.1 e o seguinte modelo estatístico

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}$$

em que Y_{ij} = observação referente a % de vitamina na ração i , na repetição j ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ e $j = 1, 2, 3$ e 4);

u = média geral do experimento;

t_i = efeito do tratamento i ($i = 1, 2, 3, 4, 5$ e 6);

e_{ij} = erro experimental associado à observação ij que, por suposição, tem média zero e variância σ^2 .

Para a determinação do nível de suplementação de ascorbil palmitato foi realizada análise de regressão linear, optando-se pelo modelo que melhor se ajustasse aos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, a temperatura da água manteve-se em $26,5 \pm 0,84^\circ\text{C}$, o oxigênio dissolvido em $3,89 \pm 0,79 \text{ mg L}^{-1}$ e o pH em $6,8 \pm 0,2$. Os valores de amônia, nitrito e nitrato mantiveram-se dentro do padrão da normalidade para a espécie (BOYD, 1990).

Os dados de desempenho podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores médios de peso (P em g), comprimento total (CT, em cm), altura de cabeça (AC, em cm) e sobrevivência (S em %) de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados por um período de 45 dias com diferentes níveis (g kg⁻¹) de ascorbil palmitato.

Parâmetro	Níveis de ascorbil palmitato na ração (g/kg)					
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
P	4,313±1,248	4,523±1,620	4,820±1,651	5,183±1,607	5,483±1,437	6,261±1,985
CT	5,885±0,539	5,883±0,525	6,011±0,574	6,185±0,688	6,274±0,538	6,581±0,637
AC	1,403±0,135	1,413±0,136	1,446±0,158	1,496±0,155	1,528±0,125	1,588±0,176
S	79,99±7,45	85,83±7,41	84,16±8,61	84,16±11,63	88,33±6,86	89,99±5,26

Os tratamentos com ascorbil palmitato tiveram efeito benéfico na melhora do desempenho dos peixes, durante o período de tratamento de 36 dias. O peso, o comprimento total e a altura da cabeça dos alevinos de tilápia-do-nilo cresceram linearmente ($P < 0,01$) à medida que houve aumento na suplementação do ascorbil palmitato (Figuras 1, 2 e 3).

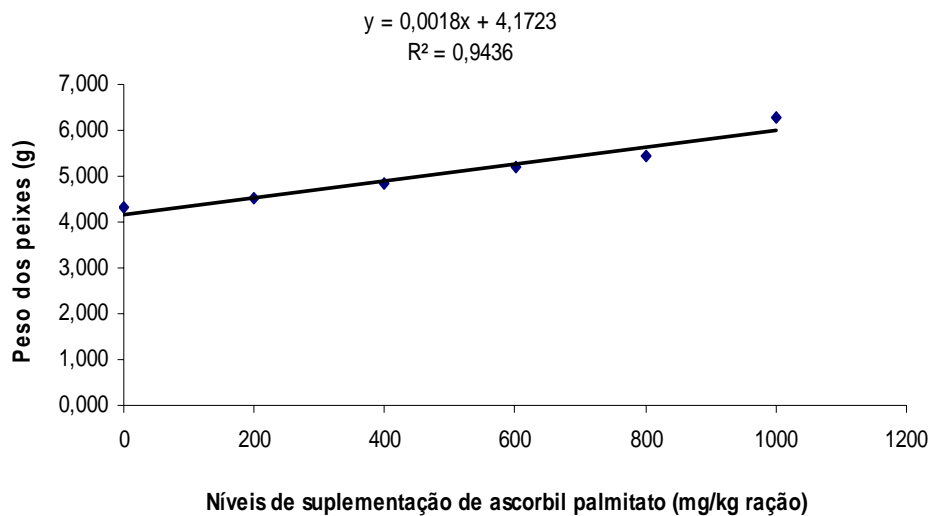


Figura 1: Peso dos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), no período de 36 dias, em função do nível de ascorbil palmitato na ração.

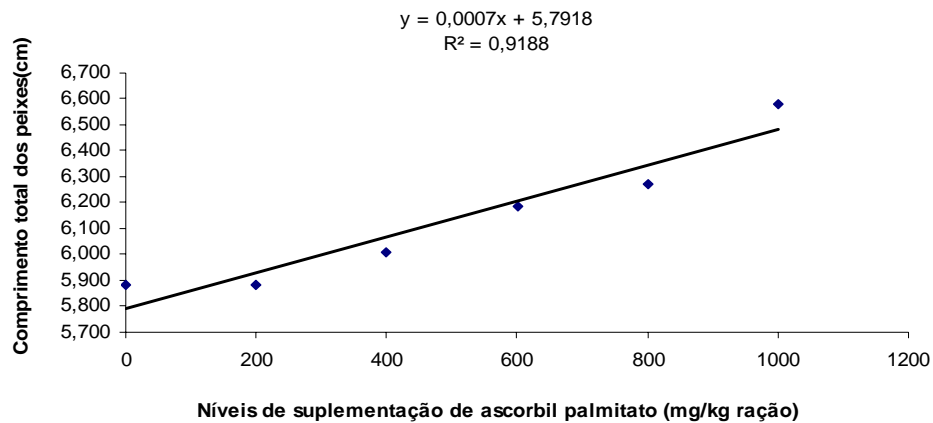


Figura 2: Comprimento total dos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), no período de 36 dias, em função do nível de ascorbil palmitato na ração.

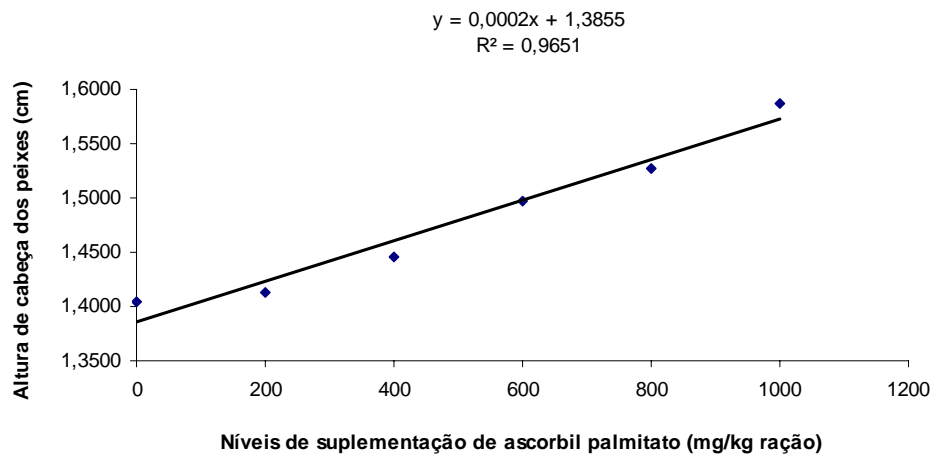


Figura 3: Altura de cabeça dos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), no período de 36 dias, em função do nível de ascorbil palmitato na ração.

O uso da vitamina C para a produção intensiva na aquicultura iniciou-se com os trabalhos pioneiros de Kitamura et al. (1965). A suplementação de ácido ascórbico demonstrou ser essencial para a melhora significativa da produtividade, participando de variadas funções metabólicas, relacionadas ao aumento do desempenho (JOHNSTON et al., 1994; MERCHIE et al., 1996; GAPASIN et al., 1998; HALVER, 2002).

A exigência de vitamina C pode variar de acordo com a espécie, o manejo e o período ontogenético dos peixes. Dabrowski (1992) sugere que as exigências de larvas e de alevinos são superiores às de peixes adultos para atender ao metabolismo e ao crescimento. Para Soliman et al. (1994), que testaram níveis de vitamina C de até 4,0 g kg⁻¹ de ração, os resultados nos parâmetros nutricionais e metabólicos sugeriram que a melhor suplementação foi com 1.250 g kg⁻¹ de vitamina C, para larvas e alevinos.

Poucos trabalhos foram desenvolvidos com o uso de ascorbil palmitato em rações para peixes (SOLIMAN et al., 1986; BRANDT et al., 1985; ALBREKTSSEN et al., 1988), todos observando efeito positivo sobre o desempenho para várias espécies. Brandt et al. (1985) recomendaram que a suplementação de ascorbil palmitato devesse ser apenas para alevinos. Os autores observaram que a suplementação para larvas determinou desempenho deficiente e sugeriram que este efeito poderia ser devido à falta de algum complexo enzimático específico para o metabolismo dessa fonte de vitamina C, na fase larval.

No período de 36 dias, os alevinos que receberam a suplementação de ascorbil palmitato apresentaram melhores taxas significativas de sobrevivência ($P < 0,01$) em relação aos peixes sem suplementação (Figura 4).

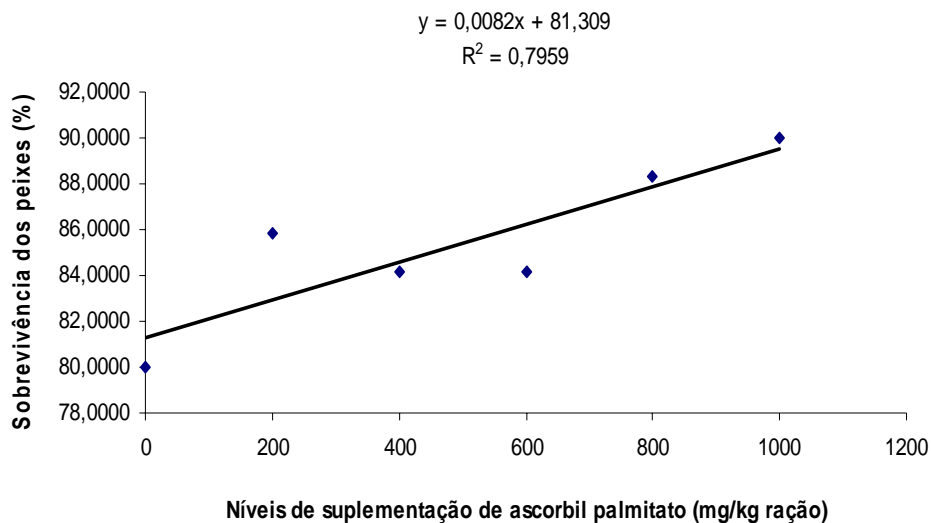


Figura 4: Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato sobre a taxa de sobrevivência dos alevinos de tilápia-do-nilo, no período de 36 dias.

Efeito similar foi obtido na pesquisa de Shiau & Hsu (1999), com alevinos híbridos de tilápia. Estes autores observaram que o tratamento sem suplementação de vitamina C também apresentou a maior taxa de mortalidade. Cavichiolo et al. (2002) também observaram que, com a suplementação de 1,000 mg/kg de ácido ascórbico monofosfatado, por 28 dias, houve redução da taxa de mortalidade de larvas de tilápia-do-nilo. Outros trabalhos também demonstraram o efeito benéfico da vitamina C sobre a taxa de sobrevivência dos peixes (BRANDT et al., 1985; SOLIMAN et al., 1986; ALBREKTSSEN et al., 1988; WANG et al., 2003; CHEN et al., 2004).

O efeito da vitamina C na taxa de sobrevivência dos peixes tem apresentado resultados contraditórios, principalmente correlacionados com a fase ontogenética dos peixes. Sato et al. (1982) citam que o ácido ascórbico é muito mais importante nas fases de larvicultura e alevinagem, do que na fase adulta.

Segundo Adham et al. (2000), a deficiência de vitamina C provoca redução gradual do consumo, culminando em alta mortalidade. Porém, diversos pesquisadores não observaram diferenças na taxa de mortalidade em experimento com carpas, trutas arco-íris e pacus (GOUILLOU-COUSTANS et al., 1998; BLOM et al. 1999; TRATTNER et al., 2007).

A composição de ascorbil palmitato e de ácido ascórbico analisada no corpo inteiro dos peixes elevou-se linearmente ($P < 0,01$) à medida que houve aumento na suplementação de ascorbil palmitato nas rações, durante o período de tratamento de 36 dias (Figuras 5 e 6).

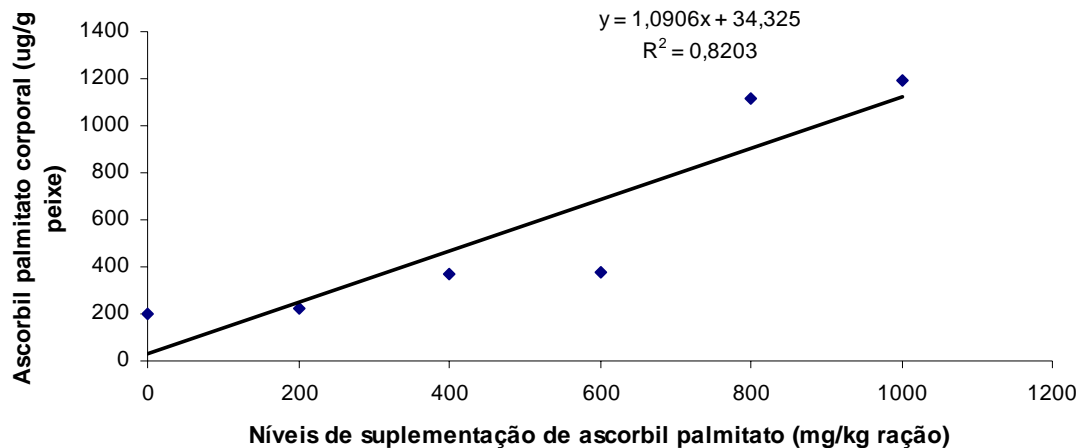


Figura 5 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato sobre a constituição de ascorbil palmitato no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de 36 dias.

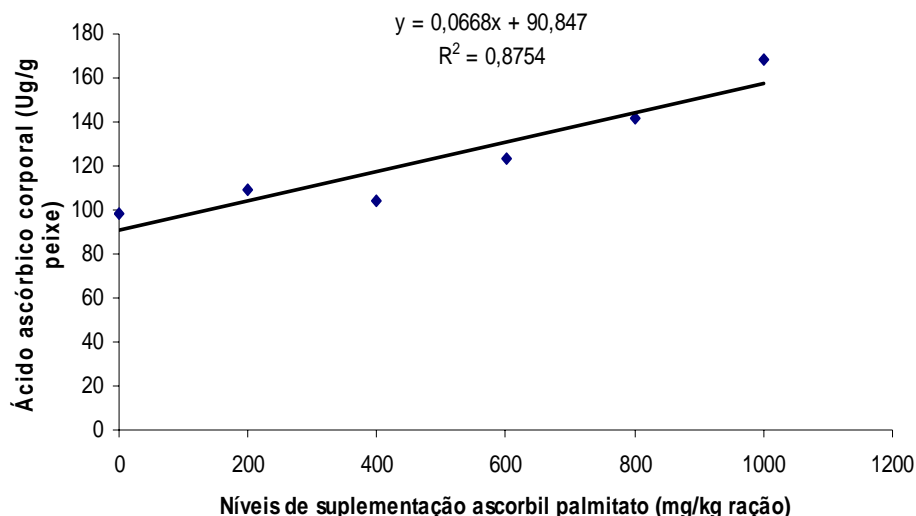


Figura 6 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato sobre a constituição de ácido ascórbico no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de 36 dias.

A concentração de ácido ascórbico no tecido animal está altamente correlacionada com o nível de suplementação de vitamina C oferecido pela dieta (SOLIMAN et al., 1994, AI et al., 2006). As análises de vitamina C de corpo inteiro de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstraram que, provavelmente, o ascorbil palmitato foi absorvido e parte manteve-se íntegro, não tendo sido hidrolisado no intestino para a forma de ácido ascórbico. Em estudos recentes, Pokorski & Marczak (2005) observaram que AP apresentou-se resistente à hidrólise no tecido neural de ratos e que parte do ascorbil palmitato foi depositada intacta na célula, sem mudanças estruturais, permanecendo biologicamente ativo.

Utilizando ascorbil palmitato como suplemento na dieta para tilápia-do-nilo, Soliman et al. (1986) determinaram, pela concentração de ácido ascórbico

nos tecidos dos peixes, que o ascorbil palmitato foi efetivamente hidrolisado, o que é coerente com a maioria dos autores, que o utilizaram como forma de suplementação em alimentos vivos (Merchie et al., 1995; Brown et al., 1998). Porém, May et al. (1996) sugerem que parte da fração de ascorbil palmitato pode ter sido absorvida em sua forma íntegra, o que foi observado na pesquisa feita por Okamura (2007), com larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), espécie ictiófaga, mas com atividade enzimática semelhante a de peixes onívoros. Estes resultados sugerem que novas pesquisas devem ser desenvolvidas para a determinação do mecanismo de absorção e do metabolismo da forma do ácido ascórbico associado ao ácido palmítico no organismo dos peixes.

A composição de vitamina C ativa, descrita nos tecidos dos peixes, é representada pelas formas do L-ácido ascórbico (reduzida) e do ácido deidroascórbico (oxidada), ambas biologicamente reversíveis. O ácido deidroascórbico pode ser revertido novamente a ácido ascórbico pela ação da dehidroascorbato redutase, recuperando o ácido ascórbico na forma reduzida nos tecidos. Quando o ácido deidroascórbico é oxidado à forma ácido dicetogulônico, sua atividade como vitamina C é perdida (LOVELL, 1998, ALMEIDA, 2003). Os resultados observados com este experimento são condizentes com os resultados observados por Soliman et al. (1986) que, ao testarem diversas fontes de ácido ascórbico, verificaram que o ascorbil palmitato, na concentração de 1.250 mg por kg de ração, mostrou-se significativamente eficaz em elevar à composição de ácido ascórbico no músculo de alevinos de tilápia-do-nilo.

Não foi observado efeito significativo ($P < 0.05$) da suplementação de ascorbil palmitato sobre a composição corporal de ácido deidroascórbico nos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Em experimentos com peixes submetidos ao teste de estresse, a elevação da concentração de ácido deidroascórbico, acompanhada pela suplementação de

ácido ascórbico na dieta, foi observada por Park et al. (2006), Trattner et al. (2007) e Okamura (2007). A justificativa para isso é a maior disponibilidade de ácido ascórbico na forma reduzida para ser oxidada no metabolismo dos peixes, na forma de ácido deidroascórbico, o que não foi observado neste experimento, quando os peixes estavam em homeostase.

CONCLUSÃO

A suplementação com ascorbil palmitato melhorou o desempenho, elevando a taxa de sobrevivência, o crescimento total, a altura de cabeça e o ganho de peso dos alevinos.

A concentração corporal do ascorbil palmitato e do ácido ascórbico, e as formas reduzidas de vitamina C nos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) elevaram-se com as diferentes concentrações de ascorbil palmitato.

Na situação de homeostase encontrada no experimento, a concentração de ácido deidroascórbico corporal, a forma oxidada da vitamina C, manteve-se igual entre os diferentes tratamentos, sem diferenças significativas.

A vitamina C na forma de ascorbil palmitato apresentou-se eficiente como suplemento de ácido ascórbico para uso em ração para peixes.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADHAM, K.G.; HASHEM, M.B.; ABU-SHABANA, M.B.; KAMEL, A.H. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 129-139, June 2000.

AI, Q.;MAI, K.; TAN, B.; XU, W.; ZHANG, W.; MA, H.; LIUFU, Z. Effects of dietary vitamin C on survival, growth and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 327-336, Nov. 2006.

ALBREKTSSEN, S.; LIE, O.; SANDNESS, K. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v. 71, n. 4, p. 359-368, July 1988.

ALMEIDA, G.S.C. **Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. 2003. 47 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

BLOM, J.H.; DABROWSKI, K. Ascorbic acid metabolism: is there a maternal effect on the progeny? **Aquaculture**, v. 147, n. 3/4, p. 215-224, Dec. 1996.

BLOM, J.H.; DABROWSKI, K.; RAPP, J.D.; SAKAKURA, Y.; TSUKAMOTO, K. Competition for space and food in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as related to ascorbic acid saturation. **Aquaculture**, v. 180, n. 1/4, p. 79-87, Aug. 1999.

BOYD, C. E. Water quality management for ponds fish culture development in aquaculture and fisheries science. New York: Elsevier Scientific, 1990. 315 p.

BRANDT, T.M.; DEYOE, C.W.; SEIB, P.A. Research and development communications. **Progressive Fish-Culturist**. v. 47, n. 1, p. 55-59, Jan. 1985.

BROWN, M.R.; SKABO, S.; WILKINSON, B. The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 151-156, Sept. 1998.

CAHU, C.;INFANTE, J.Z.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, n. 1/4, p. 245-258, Nov. 2003.

CAVICHIOLO, F.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.;MOREIRA, H.L.M.;LOURES, B.R.R., MAEHANA, K.; POVH, J.A.; LEONARDO, J.M.L.O. Efeito da suplementação de vitamina C e vitamina E na dieta, sobre a ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante a reversão sexual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p.943-948, 2002.

CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.J. effect of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, v. 242, n. 1/4, p. 553-569, Dec. 2004.

CHIEN, R.G.; HWANG, D.F. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. **Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 1, p. 91-97, Jan. 2001.

D'ABRAMO, L.R.; MONCREIFF, C.A.; HOLCOMB, F.P.; MONTANEZ, J.L.; BUDDINGTON, R.K. Vitamin C requerimento of the juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 128, n. 3/4, p. 269-275, Dec. 1994.

DABROWSKI, K. Ascorbate concentration in fish. **Journal of Fish Biology**, v. 40, n. 2, p. 273-279, Feb. 1992.

DABROWSKI, K.; HINTERLEITNER, S.; STURMBAUER, C.; EL-FICK, N.; WIESER, W. Do carp require vitamin C? **Aquaculture**, v. 72, n. 3/4, p. 295-306, Sept. 1988.

DABROWSKI, K.; EL-FICK, N.; KOCK, G.; FRIGG, M.; WIESER, W. Requeriment and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Aquaculture**, v. 91, n. 3/4, p. 317-337, Dec. 1990.

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

EUCLIDES, R.F. Sistema para análise estatística e genética. Viçosa: SAEG, 1983. 57 p.

FALCON, D.R.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; SAMPAIO, F.G.; HISANO, H. Physiological response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C and lipid supplemented diets and submitted to low temperature stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, n. 2, p. 287-294, May 2007.

FREITAS D.G.C.; MORETTI, R.H.; Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 2, p. 318-324, abr./jun. 2006.

FRISCHKNECHT, R.T.; WAHLI, W.; MEIER, W. Comparasion of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamin C and E in rainbow trout, *Oncorhunchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Disease**, v. 17, n. 1, p. 31-45, Jan. 1994.

GAPASIN, R.S.J.; BOMBEO, R.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; NELIS, H.J. Enrichment of live food with essencial fatyy acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. **Aquaculture**, v. 162, n. 1/4, p. 269-286, Feb. 1998.

GOUILLOU-COUSTANS, M.F.; BERGOT, P.; KAUSHIK, S.J. Dietary ascorbic acid needs of commmon carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, v. 161, n. 1/4, p. 453-461, Feb. 1998.

HALVER, J.E. The minerals, In: HALVERS, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish nutrition**. San Diego: Academic, 2002. p. 61-141.

HUO, J.Z.; NELIS, H.J.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; LEENHEER, A.P. Determination of vitamin E in aquatic organisms by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Analytical Biochemistry**, v. 242, n. 1, p. 123-128, Nov. 1996.

JOHNSTON, C.E.; HORNEY, B.S.; DELUCA, S.; MACKENZIE, A.; EALES, J.G. ; ANGUS, R. Changes in alkaline phosphatase isoenzyme activity in tissues and plasma of Atlantic salmon (*Salmo salar*) before and during samoltification and gonadal maturation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, n. 6, p.485-497, Dec. 1994.

KITAMURA, S.; OHARA, S.; SUWA, T.; NAKAQAWA, K. Studies on vitamin requeriments of rainbow trout, *Salmo gairdneri* I. On ascorbic acid. **Bulletin Japanese Society for Scientific Fisheries**, v. 67, p. 828, 1965.

LALL, S.P.; LEWIS-MCCREA, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – An overview. **Aquaculture**, v. 267, n. 1/4, p. 3-19, July 2007.

MADSEN, L.; DALSGAARD, L. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 171, n. 1/2, p. 41-48, Feb. 1999.

MARTINEZ-CHAVES, M.C.; MARTINEZ, M.C.C. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). **Aquaculture**, v. 86, n. 4, p. 409-416, May 1990.

MAY, J.M.; QU, Z.; COBB, C.E. Accessibility And Reactivity Of Ascorbate 6-Palmitate Bound To Erythrocyte Membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 471-480, 1996.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; DHERT, P. ; GARCÍA, U.G.; NELIS, H.; LEENHEER, A.; SORGELOOS, P. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. **Aquaculture**, v. 134, n. 3/4, p. 325-337, July 1995.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; DHERT, P.H.; GÓAMEZ, M.G.U.; NELIS, H. ; De LEENHEER, A.; SORGELOOS, P. Dietary ascorbic acid requirement during the hatchery production of turbot larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 49, n. 4, p. 573-583, Oct. 1996.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. ; W., S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, abr. 2007.

NAKATANI K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá, Paraná: Universidade Estadual de Maringá, 2001. 378 p.

OKAMURA, D. **Suplementação do ascorbil-palmitato e do alfa-tocoferol no desenvolvimento e estresse em larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*)**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástricos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PADH, H. Vitamin C: newer insight into its biochemical functions. **Nutrition Reviews**, v. 49, n. 3, p. 65-70, Mar. 1991.

PAPP, Z.G.; SAROGLIA, M.; TEROVA, G. An improved method for assay of vitamin C in fish feed and tissues. **Chromatographia**, v. 48, n.1/2, p.43-47, July 1998.

PARK, K.H.; TERJESEN, B.F.; TESSER, M.B.; PORTELLA, M.C.; DABROWSKI, K. Alfa- Lipoic acid-enrichment partially reverses tissue ascorbic acid depletion in pacu (*piaractus mesopotamicus*) fed vitamin C-devoid diets. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 4, p. 329-338, Dec. 2006.

POKORSKI, M.; MARCZAK, M. Stability of ascorbyl palmitate molecule in the rat brain. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 197-201, Sept. 2005. Supplement 4.

RANKEN, M.D. The significance of ascorbates and erythrobrates in meat products. In: BIRCH, G.G. ; PARKER, K.J. (Ed.). **Vitamin C**. London: Applied Science, 1974. p.121-135.

ROBERTS, M.L.; DAVIES, S.M.; PULSFORD, A.L. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, n. 1, p. 27-38, Jan. 1995.

SATO, M.; KONDO, T.; YOSHINAKA, R.; IKEDA, S. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. **Bulletin Japanese Society for Scientific Fisheries**, v. 48, p. 553-556, 1982.

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, n. 3/4, p. 317-326, May 1999.

SMITH, G.G.; RITAR, A.J.; BROWN, M.R.; Uptake and metabolism of a particulate form of ascorbic acid by *Artemia* nauplii and juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 1-8, Feb. 2004.

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, n. 1, p. 1-10, Feb. 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.). **Aquaculture Research**, v. 25, n. 3, p. 269-278, Mar.1994.

TRATTNER, S.; PICKOVA, J.; PARK, K.H.; RINCHARD, J.; DABROWSKI, K. Effects of alfa-lipoic and ascorbic acid on the muscle and brain fatty acids and antioxidant profile of the South American pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 273, n. 1, p. 158-164, Nov. 2007.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J.; AEBISCHER, C. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 225, n. 1/4, p. 371-386, July 2003.

WANG, X.; KIM, K.; BAI, S.C. Effects of different dietary levels of L-ascorbic-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Terminck et Achlegel). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 4, p. 261-267, Mar. 2002.

WANG, X.; KIM, K.W.; BAI, S.C.; HUH, M.D.; CHO, B.Y. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, v. 215, n. 3/4, p. 203-211, Jan. 2003.

YAMAMOTO, Y.; SATO, M.; IKEDA, S. Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts. **Bulletin Japanese Society for Scientific Fisheries**, v. 44, p. 775-779, 1978.

Suplementação de ascorbil palmitato em rações para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao estresse de transporte

Ulisses Simon da Silveira¹, Daniel Okamura¹, Felipe Guedes de Araujo¹, Priscila Vieira Rosa Logato², Rilke Tadeu Fonseca de Freitas², Adelir Aparecida Saczk²

¹ Alunos do curso de pós-graduação da Universidade Federal de Lavras

² Professores orientadores do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil.

³ Professora do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

Correspondência para o autor: Priscila Vieira Rosa Logato, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, cep. 37200-000, MG, Brasil. Tel.: 55 35 3829 1286/1231; fax: 55 35 3829 1231. e-mail: priscila@ufla.br

RESUMO

O experimento foi desenvolvido no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de ascorbil palmitato, como forma de vitamina C, sobre o estresse provocado pelo transporte de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 720 alevinos dessa espécie, com peso médio inicial de $1,40 \pm 0,12$ g, distribuídos aleatoriamente em 24 caixas experimentais, num delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos continham seis níveis de ascorbil palmitato: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de ração, em rações semipurificadas, isocalóricas, com 3.177 kcal ED e isoprotéicas com 35,02% PB, por um período de 36 dias. Após 36 dias de experimento, os animais foram mantidos em jejum, por 24 horas, para a simulação do transporte. Os peixes foram transportados em sacos plásticos de 100 litros de capacidade total (com 1/3 de água e 2/3 de oxigênio), em rodovia asfaltada, por, aproximadamente, 2 horas. Após o transporte, os peixes retornaram para as caixas experimentais. Foram coletados 20 alevinos por parcela, sendo cinco em cada período: antes do transporte (C1), logo após o transporte (C2), 8 horas após o transporte (C3) e 18 horas após transporte (C4). Os peixes foram insensibilizados com choque térmico. Após liofilização, foram determinados os valores de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (ADA) no corpo inteiro, utilizando-se HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e cortisol por kit ELISA. Não foi observada mortalidade após o transporte. Houve efeito significativo da suplementação com ascorbil palmitato sobre a composição corporal de ascorbil palmitato, nos períodos de coleta 1, 2, 3 e 4 ($P < 0,01$), aumentando linearmente. O teor de ácido ascórbico aumentou ($P < 0,01$) linearmente no período de coleta 1, ocorrendo efeito quadrático ($P < 0,01$) no período de coleta 2. A concentração de ADA aumentou linearmente ($P < 0,01$) nos períodos de coleta 2 e 4. Observou-se

redução linear na concentração de cortisol nos períodos de coleta 3 ($P < 0,01$) e 4 ($P < 0,02$). As concentrações de cortisol total, analisados durante os quatro períodos de coleta, apresentaram redução linear ($P < 0,01$) com a suplementação de ascorbil palmitato. Pelos dados obtidos neste experimento, conclui-se que o ascorbil palmitato tem participação no metabolismo do estresse e na liberação do cortisol.

Palavras-chave: ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, estresse, cortisol, peixes.

ABSTRACT

The experiment was developed in the Pisciculture Station Laboratory of the Federal University of Lavras (UFLA) with the objective of evaluating the effect of the supplementation of ascorbil palmitate as a form of vitamin C, on the stress provoked by the transportation of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). 720 Nile tilapia fingerlings with early average weight of 1.40 ± 0.12 g, allocated randomly to 24 experimental boxes, in a completely randomized design, with six treatments and four replicates were utilized. The treatments contained six levels of ascorbil palmitate: 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 g kg^{-1} of diet, in semipurified, isocaloric diets with 3,177 kcal DE and isoprotein diets with 35.02% CP for a 36-day period. After 36 days' experiment, the animals were maintained fasting for 24 hours for the simulation of transportation. The fishes were transported in plastic bags of 100 L of total capacity (with 1/3 of water and 2/3 of oxygen) on asphalt-covered roadway for about 2 hours. After transportation, the fishes were returned to the experimental boxes. 20 fingerlings per plot were collected, that is, five in each period: before transportation (C1), soon after transportation (C2), 8 hours after transportation (C3) and 18 hours after transportation (C4). The fishes were insensibilized with heat shock. After free-drying, the values of ascorbil palmitate (AP), ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (ADA) were determined in the whole body by utilizing HPLC (High Performance liquid Chromatography) and cortisol by ELISA kit. No mortality after transportation was found. With the supplementation of ascorbil palmitate, significant effect of ascorbil palmitate on the body composition in collection periods 1, 2, 3 and 4 ($P < 0.01$), increasing linearly, was found. The ascorbic acid content increased ($P < 0.01$) linearly in collection period 1, quadratic effect ($P < 0.01$) occurring in collection period 2. ADA concentration increased linearly ($P < 0.01$) in collection periods 2 and 4. A linear reduction was observed in the cortisol concentration in collection periods 3 ($P < 0.01$) and 4

($P < 0.02$). The concentrations of total cortisol, analyzed during the four collection periods showed a linear reduction ($P < 0.01$) with the supplementation of ascorbil palmitate. From the data obtained in this experiment, it follows that ascorbil palmitate has a participation in stress metabolism and cortisol release.

Key words: Ascorbil palmitate, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, stress, cortisol, fishes.

INTRODUÇÃO

A produção intensiva de peixes está atrelada ao uso de vários procedimentos de manejo que podem induzir ao estresse. Para o fornecimento de alevinos provenientes das unidades de reprodução, torna-se necessário que os peixes sejam manejados e transportados por longas distâncias, o que é considerado uma importante fonte de estresse (IVERSEN et al., 1998; GRUTTER & PANKHURST, 2000; BARCELLOS et al., 2001; URBINATI et al., 2004).

Os principais fatores promotores do estresse no transporte são classificados como físicos (temperatura da água e luminosidade), químicos (deficiência de oxigênio dissolvido, excesso de amônia, nitrito, nitrato e pH) ou biológicos (presença de organismos patogênicos ou excesso de peixes na embalagem de transporte), que podem provocar injúrias mecânicas (perda de muco e de escamas, perfurações na pele e da musculatura), servindo de porta de entrada para os agentes patogênicos (FRIES et al., 1993; ABDALLA & ROMAIRE, 1996; TORRANS et al., 2003; ALMAZÁN RUEDA et al., 2005).

O conceito de estresse é definido como uma condição em que o animal é incapaz de manter um estado fisiológico normal, devido a fatores chamados “estressantes” (SCHERECK et al., 2001). Desde o início da década de 1970, estudos envolvendo o estresse dos peixes têm sido realizados. Na aquicultura, devido ao tipo de manejo intensivo, com alta densidade de estocagem e produtividade, a situação de estresse está constantemente presente, sendo considerado um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de doenças e altas taxas de mortalidades (CONTE 2004; OLIVEIRA & CYRINO, 2008).

O estresse pode ser considerado um conjunto de respostas não específicas do organismo a situações que ameaçam desequilibrar sua homeostase (WENDELAAR BONGA, 1997). A resposta do peixe ao estímulo provocado

pelo estresse é proporcional à duração e à severidade do agente estressor (BARTON, 1997; IWAMA, 2004).

A resposta fisiológica em peixes é similar à verificada em outros vertebrados e tem sido descrita como mudanças neuroendócrinas que estimulam a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) das células cromafins e do fator liberador de corticotropina, estimulando a liberação de corticosteróides, principalmente cortisol das células inter-renais (IWAMA, 2004). As catecolaminas e os hormônios corticosteróides estimulam a ocorrência de alterações bioquímicas e fisiológicas, como hidrólise das reservas de glicogênio no fígado e aumento dos níveis de glicose no sangue, bem como diminuição da proteína muscular e alteração nos níveis plasmáticos de eletrólitos, gerando desequilíbrio osmorregulatório, inflamações e redução da resistência a doenças (PICKERING, 1993; WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 1999; BERNIER et al., 2004).

O acompanhamento das condições fisiológicas dos peixes é uma ferramenta bastante útil para o monitoramento de estresse (GALHARDO & OLIVEIRA, 2006). A medição do nível de cortisol é considerada o indicador ideal para a avaliação do grau de estresse primário em peixes (ROBERTSON et al., 1987; BARTON & IWAMA, 1991; BARTON, 2000; BARTON, 2002; RAWSEY et al., 2006), tendo sua concentração elevada após exposição à fonte estressora (VIJAYAN et al., 1997, ARENDS et al., 1999).

As medições do cortisol circulante são feitas no plasma (MONTERO et al., 1999), porém, para alevinos ou peixes com volume insuficiente de sangue, é utilizada a análise de corpo inteiro, técnica validada em experimentos de diversos autores (DE JESUS & HIRANO, 1992; POTTINGER & MOSUWE, 1994; BARRY et al., 1995; FEIST & SCHRECK, 2002; POTTINGER et al., 2002; VAN-ANHOLT et al., 2004; POTTINGER & CALDER, 1995; RAWSEY et al., 2006).

As alterações metabólicas provocadas pelo estresse exigem maior demanda por vitaminas, sendo recomendada suplementação de ácido ascórbico em níveis superiores às exigências normalmente sugeridas para aqüicultura, para melhora dos parâmetros de desempenho e imunidade (WEDEMEYER, 1969; NAVARRE & HALVER, 1989; SOBHANA et al., 2002). A adição de vitamina C em dietas para peixes foi sugerida para prevenir a conversão de ácido graxo insaturado em ésteres de colesterol que, segundo Kibatchi (1967), é um importante componente do cortisol (MONTEIRO et al., 1999). No entanto, este autor cita que, em estudos recentes, os níveis de cortisol após o estresse não foram influenciados por suplementação de vitamina C na dieta.

Segundo Montero et al. (1999), a vitamina C tem importante papel como agente redutor, com capacidade de minimizar a ação dos radicais livres e evitar a desestabilização da membrana lipídica, sendo também essencial para o crescimento e metabolismo dos peixes, tendo capacidade de interferir benéficamente na resposta ao estresse e na prevenção de doenças.

O ácido ascórbico atua como co-fator para diversas reações. Participa da hidroxilação da prolina, na biossíntese do colágeno, aumentando a resistência da fibra; da formação da cartilagem e do endotélio, das paredes do sistema circulatório; do metabolismo energético, pela síntese da carnitina, a partir da lisina e da metionina, responsável pelo transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias; do metabolismo do ferro; da conversão do ácido fólico em folínico; conversão do 3,4-dihydroxyphenylpiruvato em noradrenalina e da hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano (HENRIQUE et al., 1998; CHIEN & HWANG, 2001; WAHLI et al., 2003).

Embora algumas espécies de peixe tenham capacidade de síntese de ácido ascórbico a partir da D-glicose, a grande maioria dos peixes teleósteos não tem esta capacidade ou produz em quantidades insuficientes para atender às suas exigências nutricionais e metabólicas. Isso ocorre devido à inatividade da enzima

L-gulono-1,4 lactona oxidase (GLO), responsável pela catalização da última etapa da reação, no fígado dos peixes teleósteos (HENRIQUE et al., 1996; LOVELL., 1998), tornando-se necessária a suplementação na dieta.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico, na forma de ascorbil palmitato, para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), por um período de 36 dias, sobre a composição corporal das formas reduzida e oxidada do ácido ascórbico e no papel de suporte ao efeito do estresse provocado pelo manejo no transporte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 27 de fevereiro a 4 de abril de 2008, totalizando 36 dias de tratamento, em um ensaio com delineamento inteiramente casualizado, oferecendo seis tratamentos, com diferentes níveis de ácido ascórbico e 4 repetições.

Foram utilizados 720 alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso médio inicial de $1,40 \pm 0,12$ g, distribuídos aleatoriamente em 24 caixas experimentais, numa proporção de 30 alevinos por caixa.

As caixas foram abastecidas por um sistema de recirculação de água, com filtro biológico e aeradores elétricos individuais com pedra porosa. Foi estabelecido controle do fotoperíodo, mantendo período de luz e escuridão de 12/12 horas, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos da água foram registrados diariamente, em horários alternados, às 8 e às 15:00 horas. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos por termômetro e oxímetro digital (YSI, USA) e pH, amônia, nitrito e nitrato medidos por kit de aquário

comercial (Alcon, Brasil). A limpeza e a sifonagem das caixas foram feitas duas vezes por dia.

Os tratamentos experimentais (Tabela 1) foram compostos de seis rações semipurificadas, isocalóricas (3177 kcal kg⁻¹) e isoprotéicas (35,02 %), contendo os tratamentos: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g kg⁻¹ de ascorbil palmitato na ração.

As rações foram elaboradas no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Lavras. O premix vitamínico foi formulado para não conter nenhuma fonte de ácido ascórbico. As rações foram peletizadas em moedor de carne, secas em estufa ventilada a 30°C, por 24 horas, trituradas em liquidificador elétrico e estocadas em geladeira, a 4°C. As rações foram fornecidas três vezes ao dia, “ad libitum”.

Tabela 1: Composição da ração experimental, usada para testar o efeito do ascorbil palmitato para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingredientes (%)	Ração Basal
Farinha de peixe ^a	41,35
Amido de milho	32,89
Albumina	10,00
Gelatina	5,00
Celulose	5,00
Óleo vegetal	3,00
Premix mineral ^b	0,15
Premix vitamínico ^c	0,08
Fosfato bicálcico	1,50
Antioxidante (BHT) ^d	0,02
Composição centesimal da ração experimental	
Proteína bruta (%)	35,02
Energia digestível (kcal kg ⁻¹)	3177
Extrato etéreo (%)	6,54
Matéria seca (%)	91,46

^a Farinha de resíduos da indústria de sardinha

^b Premix mineral (composição/kg): Mn. 80 mg, Fe. 24 mg, Zn. 50 mg, Cu. 8 mg, I. 1,3 mg, Se. 0,10 mg, Co. 10 mg.

^c Premix vitamínico (composição/kg): Vit.A. 1200.000 UI; D₃. 200000 UI; E. 1200 mg; K₃. 2400 mg; B₁. 4800 mg; B₂. 4800 mg; B₁₂. 4800 mcg; B₆. 4800 mg; cloreto de colina. 108 g; pantotenato de cálcio. 12000 mg; niacina. 24000 mg; ácido fólico. 1200 mg; biotina. 48 mg.

^d butil-hidroxi-tolueno

Após 36 dias de experimento, os peixes foram mantidos em jejum, por 24 horas, para a simulação do transporte. Uma população de 20 peixes por parcela foi transportada em sacos plásticos de 100 litros de capacidade total (com 1/3 de água e 2/3 de oxigênio), em rodovia asfaltada, por, aproximadamente, duas horas e retornando às suas caixas experimentais. Foram coletados 20 alevinos por parcela, sendo cinco em cada diferente período: antes do transporte (C1), logo após o transporte (C2), 8 horas após o transporte (C3) e 18 horas (C4) após o transporte. Os peixes foram insensibilizados por choque térmico, liofilizados por 24 horas e armazenados em frascos de análises laboratoriais hermeticamente vedados e estocados em freezer. As análises de vitaminas nos peixes e na ração foram feitas nos laboratórios dos Departamentos de Química e Zootecnia e as análises de cortisol nos laboratórios dos Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

A análise de vitamina C foi realizada pela técnica HPLC (Varian), equipado com bomba ternária modelo 9012, injetor automático (modelo 9300) e, como detector, um espectrofotômetro (modelo 9050) na região de UV/Vis (Modelo 9010). Para todas as análises foi utilizada uma coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (1,0 x 4,6 mm, 5 µm) (Varian).

Para a extração de ácido ascórbico e de ácido dehidroascórbico, utilizaram-se as metodologias de Papp et al. (1998), em que a 400 mg de amostra de peixe triturado foram adicionados 3 mL de acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ e pH 4,8 (solução extratora), centrifugado a 15.000 xg a 4°C, por 10 minutos e retirado o sobrenadante. O procedimento foi repetido com 2 mL de acetato de sódio. Ao

total de sobrenadante obtido, adicionaram-se mais 166 μL de acetato de sódio e 250 μL de ácido perclórico 72%. O sobrenadante foi novamente centrifugado e filtrado em membrana 0,45 μm Millipore. Uma alíquota de 20 μL foi injetada no HPLC e manteve-se constante o fluxo de 0,6 mL min^{-1} . A fase móvel foi composta por sal tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,5 mM, ácido etilenodiaminotetra acético 0,5 mM (sal dissódico), acetato de sódio 0,04 M e pH ajustado para 3,76, com o ácido fosfórico a 85% e comprimento de onda fixado em 250 nm.

Para a extração do ascorbil palmitato, utilizou-se a metodologia descrita por Huo et al. (1996) e por Freitas & Moretti (2006), em que a 400 mg de peixe triturado e liofilizado foram adicionados 3 mL de metanol contendo 0,02% de butilhidroxitolueno (solução extratora), centrifugado a 15.000 xg a 4°C, por 10 minutos e retirado o sobrenadante. O procedimento foi novamente repetido e os sobrenadantes somados. Posteriormente, cerca de 60 μl foram retirados e realizou-se um *clean-up* utilizando-se uma coluna de vidro contendo sílica C_{18} , filtrando-se, em seguida, em membrana 0,45 μm . Uma alíquota de 20 μl foi injetada no HPLC e o fluxo utilizado foi de 1,8 ml min^{-1} . A fase móvel foi composta de 100% de metanol e o comprimento de onda no detector espectrofotométrico foi fixado em 280 nm.

Na análise de cortisol corporal dos alevinos foi utilizada a técnica de Van Anholt et al. (2004), em que 50 mg de peixe triturado foram homogeneizados em 500 μL de HCl 0,01 M, em banho ultrassônico, por 10 minutos e, posteriormente, centrifugados (17300.xg, a 5°C, por 10 minutos). O sobrenadante foi analisado pelo método ELISA, utilizando-se um kit CORTISOL ELISA accu-bind (cd:3625-300), com leitura em leitor automático de microplacas com 96 poços (ThermoPlate modelo TP-Reader). O cortisol foi quantificado por equação analítica. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, utilizando-se o pacote

computacional Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) (2005) versão 9.1 e o seguinte modelo estatístico

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij}$$

em que Y_{ij} = observação referente à % de vitamina na ração i , na repetição j ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ e $j = 1, 2, 3$ e 4);

u = média geral do experimento;

t_i = efeito do tratamento i ($i = 1, 2, 3, 4, 5$ e 6);

e_{ij} = erro experimental associado à observação ij que, por suposição, tem média zero e variância σ^2 .

Para a determinação do nível de suplementação de ascorbil palmitato, foi realizada análise de regressão linear, optando-se pelo modelo que melhor se ajustasse aos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o período experimental, a temperatura média da água foi de $6,5 \pm 0,84^\circ\text{C}$, o nível de oxigênio dissolvido de $3,89 \pm 0,79$ mg/L e o pH de $6,8 \pm 0,2$. Os valores de amônia, nitrito e nitrato mantiveram-se dentro do padrão de normalidade para a espécie (BOYD, 1990). Não foi observada mortalidade no período de duas horas de transporte e no de dezoito horas de coleta.

A composição de ascorbil palmitato no corpo inteiro dos alevinos de tilápia-do-nilo elevou-se linearmente ($P < 0,01$) com o aumento da suplementação de ascorbil palmitato na dieta, nos períodos de coleta C1, C2, C3 e C4 (Figuras 1, 2, 3 e 4).

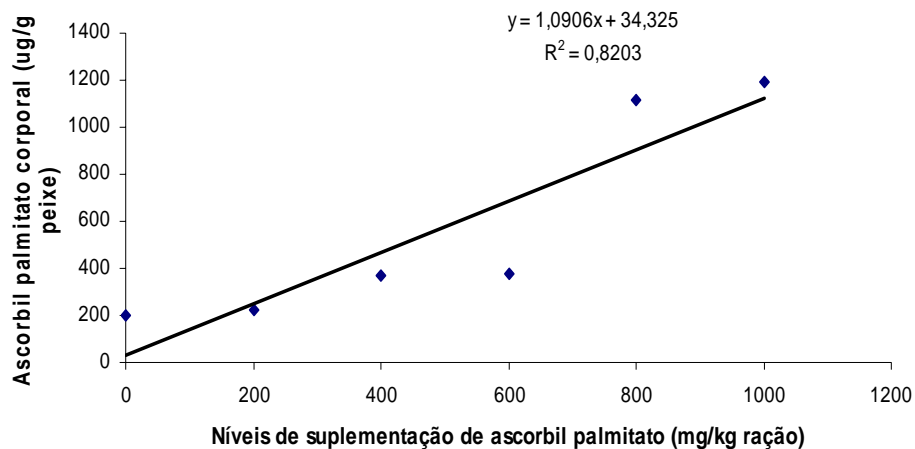


Figura 1 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ascorbil palmitato no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C1 (antes do transporte).

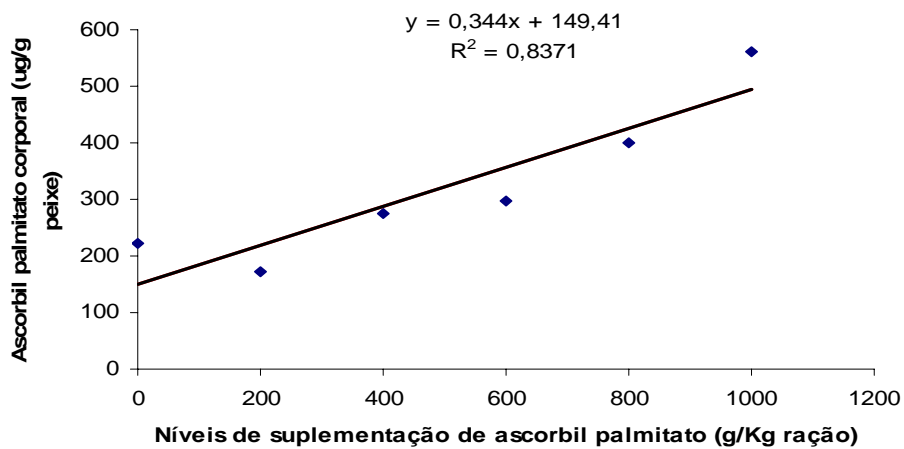


Figura 2 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ascorbil palmitato no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C2 (após o transporte).

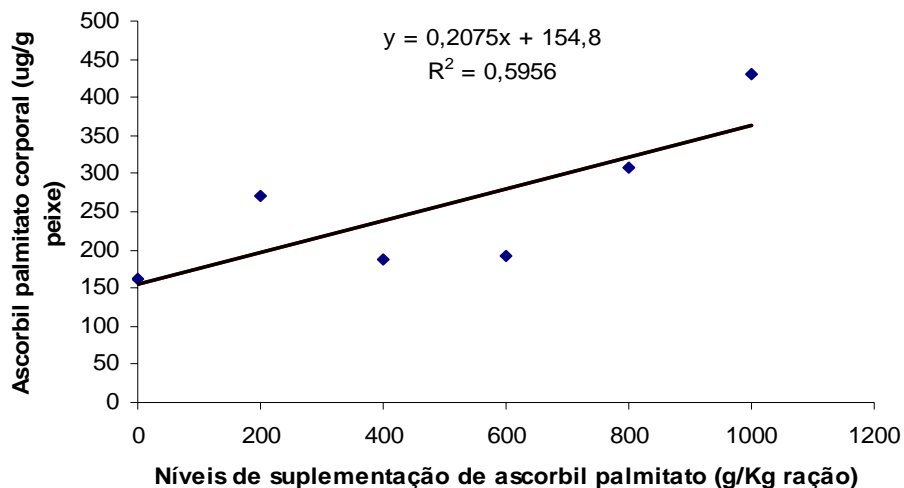


Figura 3 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ascorbil palmitato no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C3 (8 horas após o transporte).

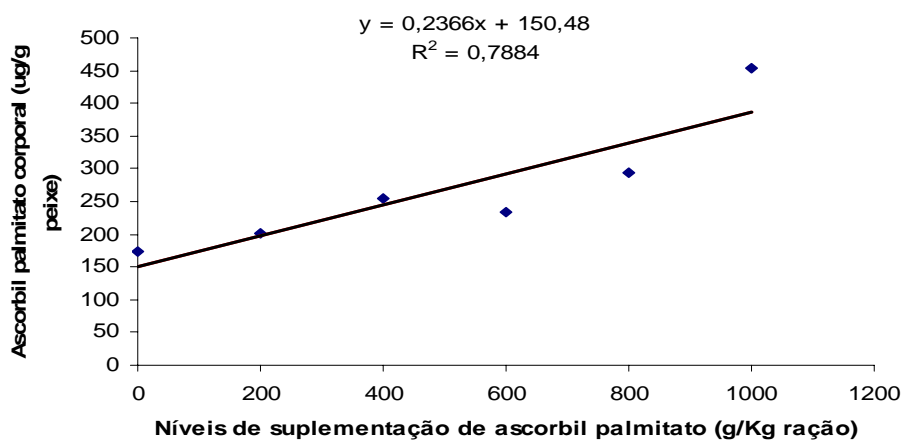


Figura 4: Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ascorbil palmitato no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C4 (18 horas após o transporte).

As análises de vitamina C de corpo inteiro de tilápia-do-nylo demonstraram que o ascorbil palmitato foi absorvido e parte manteve-se íntegra, não tendo sido hidrolisado no intestino para a forma de ácido ascórbico. Em estudos recentes, Pokorski & Marczak (2005) observaram que ascorbil palmitato apresentou-se resistente à hidrólise no tecido neural de ratos e que parte do ascorbil palmitato foi depositada intacta na célula, sem mudanças estruturais, permanecendo biologicamente ativa. May et al. (1996) sugerem que parte da fração de ascorbil palmitato pode ser absorvida em sua forma íntegra, o que foi observado na pesquisa feita por Okamura (2007) com larvas de dourado. Estes resultados sugerem que novas pesquisas devem ser desenvolvidas para a determinação do mecanismo de absorção e do metabolismo da forma do ácido ascórbico associado ao ácido palmítico no organismo dos peixes.

Esta forma de ácido ascórbico também foi encontrada na ração, para o tratamento T1, sem a suplementação de ascorbil palmitato. O valor obtido na análise foi de 471 ug/g de ração. Os alevinos recém-chegados da piscicultura comercial também apresentaram nível médio de 550 ug/g de ascorbil palmitato. Resultado semelhante foi observado por Falcon et al. (2007), também com alevinos de tilápia-do-nylo. Porém, os autores não souberam explicar a concentração de vitamina C encontrada no fígado dos peixes que receberam a dieta sem suplementação de ácido ascórbico. Okamura (2007), que tinha encontrado ascorbil palmitato em experimento com larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) sem a suplementação da vitamina, considerou que, provavelmente, era proveniente da farinha de peixe utilizada na confecção da ração.

No período de 36 dias de experimento, os peixes que receberam suplementação de ascorbil palmitato apresentaram elevação na composição corporal (Figuras 1 e 2), nos períodos de coleta C1 ($P < 0,01$) linear e C2 ($P < 0,01$)

quadrática. Nos períodos de coleta C3 e C4, os valores de ácido ascórbico apresentaram-se iguais ($P>0,05$), em todos os tratamentos.

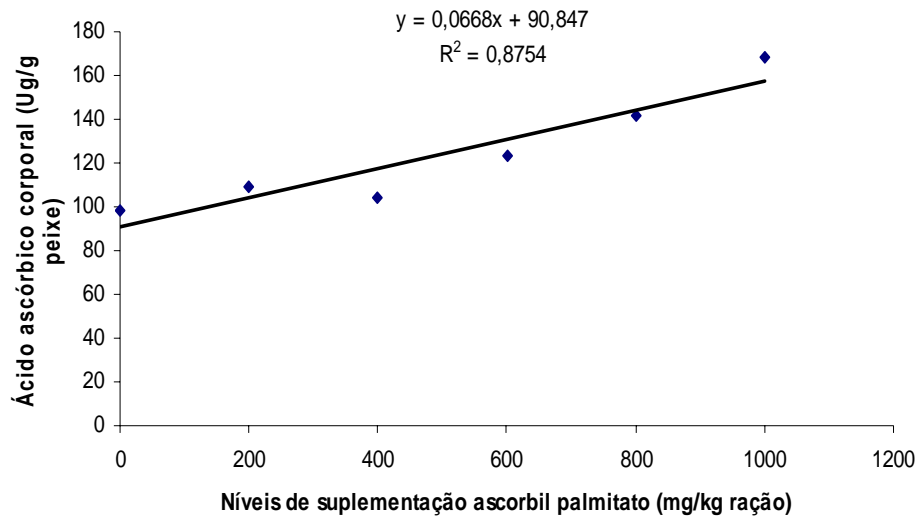


Figura 5 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ácido ascórbico no corpo inteiro de alevinos de tilápia-donilo, no período de coleta C1 (antes do transporte).

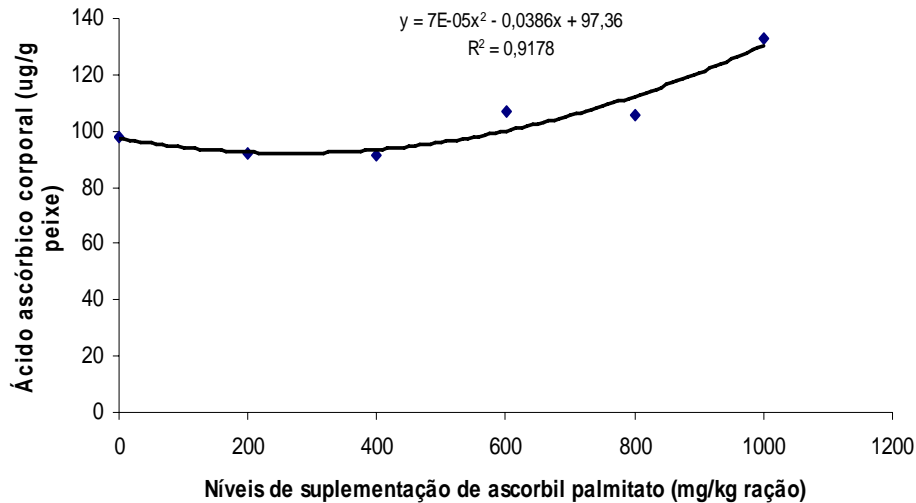


Figura 6 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ácido ascórbico no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nylo no período de coleta C2 (depois do transporte).

Observa-se uma relação entre o estresse e o metabolismo da vitamina C nos peixes. A necessidade de suplementação de ácido ascórbico tem sido demonstrada pelo papel apresentado na redução dos efeitos deletérios provocados pelo estresse (HADIE et al., 1991; SHIAU & HSU, 1995; SHEN et al., 2004), porém, os aspectos que esclarecem esta relação ainda não foram totalmente definidos (HENRIQUE et al., 1996; HENRIQUE et al., 1998).

Pela análise da composição de ascorbil palmitato e ácido ascórbico, no corpo dos alevinos de tilápia-do-nylo, observou-se uma redução na concentração corporal das duas formas de ácido ascórbico, armazenadas nos peixes após o transporte. Os valores de ácido ascórbico significativamente superiores na primeira e na segunda coleta apresentaram-se iguais na terceira e na quarta coleta, demonstrando uma depleção rápida dos estoques corporais de vitamina C após o estresse do transporte. Estes resultados também foram observados por

Falcon et al. (2007), que observaram depleção no conteúdo de ácido ascórbico em alevinos de tilápia-do-nilo, que sofreram estímulos de estresse térmico. Henrique et al. (1998) consideraram que a vitamina C pode ser utilizada como indicador do efeito fisiológico ao estresse, mas que é dependente do tipo de agente promotor.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na concentração de ácido dehidroascórbico corporal, nos períodos de coleta C1 (antes do transporte) e C3 (8 horas após o transporte). No período de coleta C2 (logo após o transporte) e no período de coleta C4 (18 horas após o transporte), houve diferenças significativas, observando-se efeito linear ($P < 0,01$) (Figuras 7 e 8).

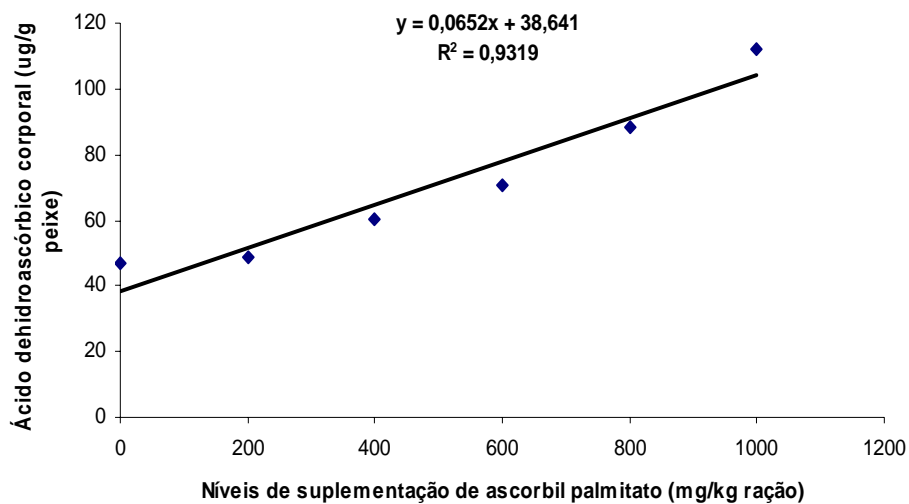


Figura 7 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ácido dehidroascórbico no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C2 (após do transporte).

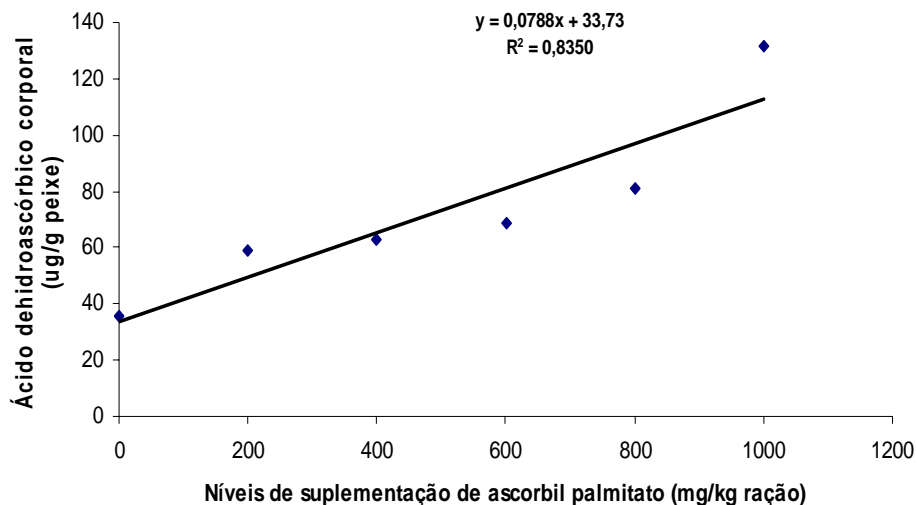


Figura 8 Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de ácido dehidroascórbico no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nylo, no período de coleta C4 (18 horas após o transporte).

Os valores de ADA foram iguais antes do transporte, quando os peixes estavam em homeostase, sem necessidade de oxidação de ácido ascórbico e 8 horas após o transporte, quando ocorreu o pico de liberação de cortisol, o que indica depleção acentuada nos estoques corporais de todas as formas da vitamina C. Observaram-se diferenças na composição corporal de ácido dehidroascórbico no período de coleta C2 (logo após o transporte), quando houve maior estoque de ácido ascórbico na forma reduzida para ser oxidado e no período de coleta C4 (18 horas após o transporte), havendo, possivelmente, grande reversão de ácido ascórbico nas formas reduzida e oxidada.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na concentração de cortisol corporal, nos períodos de coleta C1 (antes do transporte) e C2 (logo após o transporte). Observou-se efeito linear no período de coleta C3 (8 horas após o transporte) ($P < 0,01$) e também no período de coleta C4 (18 horas após o

transporte) ($P < 0,02$) na composição de cortisol corporal nos alevinos de tilápia-do-nilo (Figura 9 e 10).

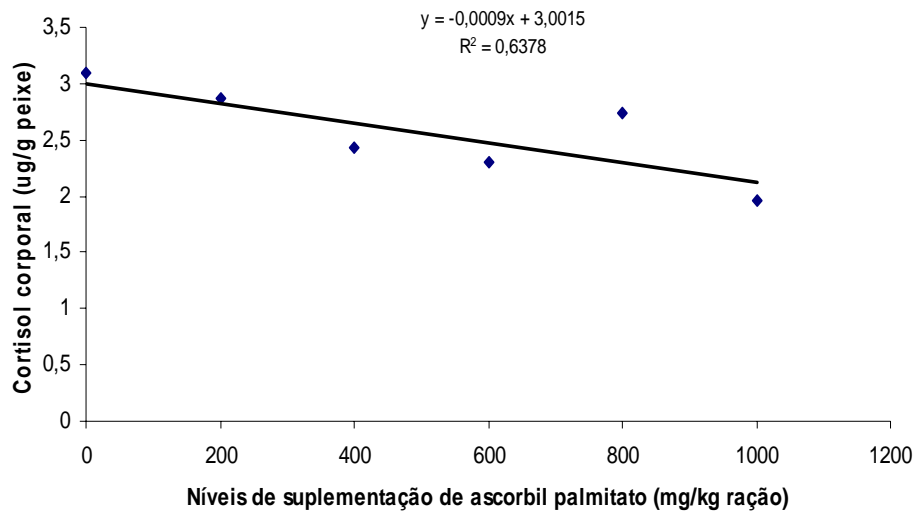


Figura 9: Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de cortisol no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C3 (8 horas após o transporte).

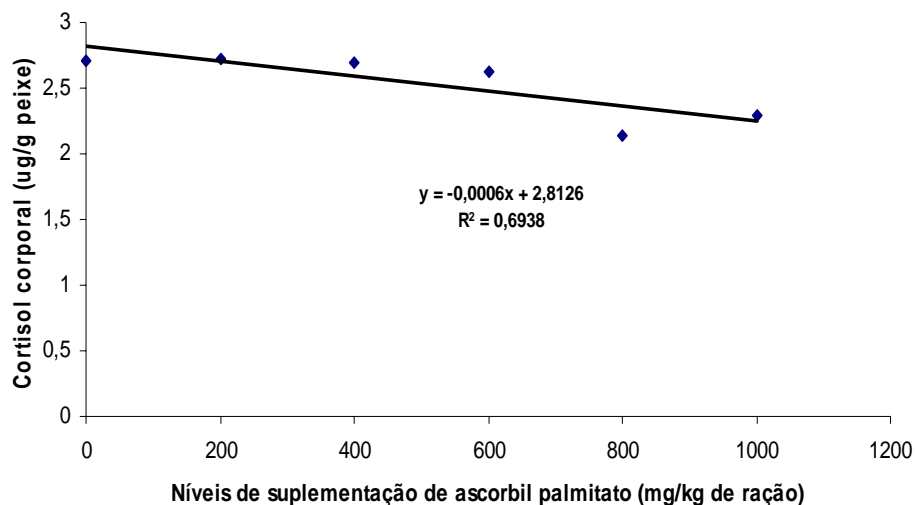


Figura 10: Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato, por 36 dias, sobre a constituição de cortisol no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período de coleta C4 (18 horas após o transporte).

O nível de cortisol corporal dos peixes é utilizado como indicador para avaliar a duração e a severidade do estresse (HENRIQUE et al., 1998). Fagundes & Urbinati (2008) citam que esta elevação na concentração pode apresentar variações segundo o indivíduo, a espécie, o estágio de desenvolvimento, o estado nutricional, as condições de estocagem dos peixes, os fatores ambientais, o tipo do agente promotor e a severidade e a condição de estresse agudo ou crônico.

Barcelos et al. (2006) observaram que o pico máximo da elevação na concentração de cortisol corporal ocorreu uma hora após o estímulo ao agente promotor do estresse térmico, observando redução na concentração, quatro horas após o estímulo. Para Acerate et al. (2004), a composição de cortisol corporal elevou-se após os peixes sofrerem estímulo de estresse agudo por transporte e o pico máximo (três vezes do valor, antes do transporte) foi alcançado somente no segundo dia.

Neste trabalho, a composição do cortisol corporal foi reduzida nos peixes tratados com altas doses de vitamina (Tabela 2). Os valores da concentração de cortisol corporal, somados antes e depois do transporte dos alevinos de tilápia-do-nilo, demonstraram tendência linear ($P < 0,01$) na sua composição com relação aos tratamentos com ascorbil palmitato (Figura 11).

Tabela 2: Composição de cortisol corporal nos alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes níveis de ascorbil palmitato (g/kg ração)

Parâmetro	Níveis de suplementação de ascorbil palmitato (g/kg ração)					
AP (g/kg)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Cortisol (ug/g peixe)	2,79	2,62	2,41	2,38	2,24	2,22

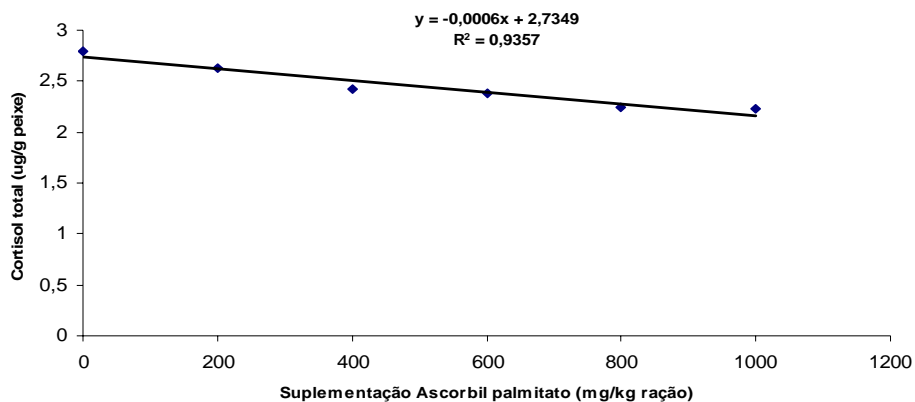


Figura 11: Efeito dos níveis de suplementação de ascorbil palmitato por 36 dias sobre a constituição de cortisol no corpo inteiro de alevinos de tilápia-do-nilo, no período total de coletas.

A possibilidade de a vitamina C ter propriedade inibitória sobre a liberação de cortisol é contraditória. O primeiro autor a propor esta hipótese foi Kitabchi (1967) que sugeriu que um tratamento com doses mais altas de ácido ascórbico na dieta dos peixes pode inibir a síntese de esteróides, prevenindo a conversão de ácidos graxos insaturados em ésteres de colesterol, que seriam incorporados aos esteróides, importantes componentes do cortisol (MONTEIRO et al., 1999). Henrique et al. (1998) também observaram que a suplementação de vitamina C obteve efeito na redução da composição corporal do cortisol, nove horas após estresse por hipóxia. Os peixes alimentados com ácido ascórbico apresentam melhor controle do cortisol, quando comparados aos peixes sem a suplementação de vitamina C.

Resultados semelhantes sobre o controle do cortisol corporal, com o uso da vitamina C, foram observados por Falcon et al. (2007), trabalhando com alevinos de tilápia-do-nylo, submetidos ao estresse térmico e Okamura (2007), avaliando a suplementação de ascorbil palmitato para larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), submetidas ao desafio de estresse por hipóxia.

CONCLUSÕES

O ascorbil palmitato apresentou-se, neste trabalho, como eficiente fonte de ácido ascórbico, promovendo o aumento das concentrações das diferentes formas de vitamina C, no corpo dos peixes.

Os resultados das análises de ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e cortisol, antes e após o estresse promovido pelo transporte, demonstraram que o ascorbil palmitato teve participação no metabolismo do estresse, reduzindo os valores de todas as formas de vitamina C após o transporte e promovendo valores menores de cortisol.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABDALLA, A.A.F.; ROMAIRE, L.P. Effects of timing and duration of aeration on quality and production of channel catfish. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 6, n. 1, p. 1-10, Jan. 1996.

ACERATE, L.; BALASH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v. 237, n. 3/4, p. 167-178, Aug. 2004.

ALMAZÁN RUEDA, P.; HELMOND, A.T.M. van. ; VERRETH, J.A.J.; SCHRAMA, J.W. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 4, p. 1029-1039, Oct. 2005.

ANHOLT, R.D. van; KOVEN, W.M.; LUTZKY, S.; WENDELAAR-BONGA, S.E. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, v. 238, n. 1/4, p.369–383, Sept. 2004.

ARENDS, R.J.; MANCERA, J.M.; MUÑOZ, J.L.; WENDELAAR-BONGA, S.E.; FLICK, G. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to the exposure and crowding. **Journal of Endocrinology**, v.163, n. 1, p. 149-157, Oct. 1999.

BARCELOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, n. 1/4, p. 317-321, Mar. 2006.

BARCELLOS, L.J.G.; WOEHL, V.M.; WASSERMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M. ITTZÉS, I.; KRIEGER, M.H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v.32, n. 2, p. 121-123, Feb. 2001.

BARRY, T.P.; MALISON, J. A.; HELD, J.J. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 57-65, Jan. 1995.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p.3-26, 1991.

BARTON, B. A. Stress in finfish: past, present and future : a historical perspective. In: IWANA, G. K. ; PICKERING, A. D. ; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). ***Fish stress and health in aquaculture***. Cambridge: Cambridge University, 1997. p. 1-33. (Society for Experimental Biology, Seminar Series, 62).

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, Jan. 2000.

BARTON, B. A. Stress in fishes : a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, July 2002.

BERNIER, N.J.; BEDARD, N.; PETER, R.E. Effects of cortisol on food intake, growth and forebrain neuropeptide Y and corticotrophin-releasing factor gene expression in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 230-240, Jan. 2004.

BOYD, C.E. **Water quality management for ponds fish culture development in aquaculture and fisheries science**. New York: Elsevier Scientific, 1990. 315 p.

CHIEN, R.G.; HWANG, D.F. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128, n. 1/4, p. 91-97, Dec. 2001.

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3/4, p. 205-223, June 2004.

EUCLIDES, R.F. Sistema para análise estatística e genética. Viçosa: SAEG, 1983. 57 p.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. **Aquaculture**, v. 276, n. 1/4, p. 112-119, Apr. 2008.

FALCON, D.R.; BARROS, M.M.B.; PEZZATO, L.E.; SAMPAIO, F.G.; HISANO, H. Physiological response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C and lipid supplemented diets and submitted to low temperature stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, n. 2, p. 287-295, Feb. 2007.

FEIST, G.; SCHRECK, C.B. Ontogeny of the stress response in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 31-40, Jan. 2002.

FREITAS, D.G.C.; MORETTI, R.H. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.318-324, abr./jun. 2006.

FRIES, J.N.; BERKHOUSE, C.S.; MORROW, J.C.; CARMICHAEL, G.J. Evaluation of na aeration system in a loaded fish-hauling tank. **The Progressive Fish-Culturist**, v.55, n. 3, p. 187-190, July 1993.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Bem-estar animal : um conceito legítimo dos peixes? **Revista de Etologia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p.51-61, jun. 2006.

GRUTTER, A.S.; PANKHURST, N.W. The effect of capture, handling, confinement and ectoparasite loa don plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 2, p. 391-401, Aug. 2000.

HADIE, L. J.; FLETCHER, T.C.; SECCOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 95, n. 3/4, p. 201-214, June 1991.

HENRIQUE, M.M.F.; GOMES, E.F.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F.; OLIVATELES, A.; DAVIES, S.J. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, v.161, n. 1/4, p. 415-426, Feb. 1998.

HENRIQUE, M.M.F.; MORRIS, P.C.; DAVIS, S.J. Vitamin C status and physiological response on the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to stressors associated with aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 27, n. 6, p. 405-412, June 1996.

HUO, J.Z.; NELIS, H.J.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; LEENHEER, A.P. Determination of vitamin E in aquatic organisms by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Biochemistry**, v. 242, n. 1, p.123-128, Nov. 1996.

IVERSEN, M.; FINSTAD.; NILSSEN, K. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. **Aquaculture**, v. 168, n. 1/4, p. 387-394, Oct. 1998.

IWAMA, G.K. Stress in fish. In: AQUANET WORKSHOP ON FISH WELFARE, 2004, Campbell River, B.C, Canada, 2004. **Anais...** Campbell River, B.C, Canada, 2004. 9 p.

JESUS, E.G.T.; HIRANO, T. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, n. 1, p. 55-61, Jan. 1992.

KIBATCHI, A.E. Ascorbic acid in steroidogenesis. **Nature**, v. 215, n. 5108, p. 1385-1386, Sept. 1967.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Massachusetts: Academic, 1998. 267 p.

MAY, J.M.; QU, Z.; COBB, C.E. Accessibility And Reactivity Of Ascorbate 6-Palmitate Bound To Erythrocyte Membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 471-480, 1996.

MONTEIRO, D.; IZQUIERDO, M.S.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *sparus aurata*, juvenile. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 53-60, Jan. 1999.

NAVARRÉ, O.; HALVER, J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**, v. 79, n. 1/4, p. 207-221, July 1989.

OKAMURA, D. **Suplementação do ascorbil-palmitato e do alfa-tocoferol no desenvolvimento e estresse em larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*)**.

2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástricos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CYRINO, J.E.P. **Estresse dos peixes em piscicultura intensiva**. Disponível em:< http://www.piscicultura.com.br/pdf/estresse_peixe>. Acesso em: 06 jul. 2008.

PAPP, Z.G.; SAROGLIA, M.; TEROVA, G. An improved method for assay of vitamin C in fish feed and tissues. **Chromatographia**, v .48, n.1/2, p.43-47, July 1998.

PICKERING, A.D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v. 111, n. 1/4, p. 51-63, Apr. 1993.

POKORSKI, M.; MARCZAK, M. Stability of ascorbyl palmitate molecule in the rat brain. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 197-201, Sept. 2005. Supplement 4.

POTTINGER, T. G.; CALDER, G. M. Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potential confounding factor. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 10, n.2, p. 135-146, May 1995.

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R.; YEOMANS, W. E. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 1, p. 207-229, July 2002.

POTTINGER, T. G.; MOSUWE, E. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a “critical period”. **General Comparative Endocrinology**, v. 95, n. 3, p. 350-362, Sept. 1994.

RAMSEY, J. M.; FEIST, G. W.; VARGA, Z. M.; WESTERFIELD, M.; KENT, M.L.; SCHRECK, C.B. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio Rerio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1/4, p. 565-574, Aug. 2006.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n. 1, p. 1-12, Jan. 1987.

SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHES, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. **Aquaculture**, v. 197, n. 1/4, p. 3-24, June 2001.

SHIAU, S.Y.; HSU, T.S. L-Ascorbic-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic-2-monophosphate for tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 133, n. 2, p. 147-157, June 1995.

SOBHANA, K.S.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of *Cirrhinus mrigala* (hamilton) to experimental infection of *aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 207, n. 3/4, p. 225-238, May 2002.

TORRANS, E.L.; HOGUE, C.D.; PILKINTONS, S. The sock-saver: a small trailer for proving liquid oxygen to remote sites on commercial channel catfish farms. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, n. 3, p. 260-265, July 2003.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, n. 1/4, p. 389-400, Jan. 2004.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Metabolic Responses Associated with Confinement Stress in Tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 89-95, Jan. 1997.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J.; AEBISCHER, C. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 225, n. 1/4, p. 371-386, July 2003.

WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in the salmonid fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 29, p. 1247-1251, 1969.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados observados com o uso da vitamina C

A suplementação de ascorbil palmitato teve efeito positivo como fonte de vitamina C para os alevinos de tilápia-do-nilo.

Com os resultados obtidos na análise de corpo inteiro de alevinos concluiu-se que o ascorbil palmitato foi uma eficiente fonte de ácido ascórbico, promovendo o aumento das concentrações das diferentes formas de vitamina C no corpo dos peixes.

O ascorbil palmitato demonstrou ser eficiente em aumentar o peso, o comprimento total, a altura da cabeça e interferiu na taxa de sobrevivência.

Os resultados das análises de ascorbil palmitato, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e cortisol, antes e após o transporte, demonstraram que o ascorbil palmitato teve participação no metabolismo do estresse, reduzindo seus valores após o transporte. Os peixes alimentados com ascorbil palmitato também apresentaram valores menores de cortisol.