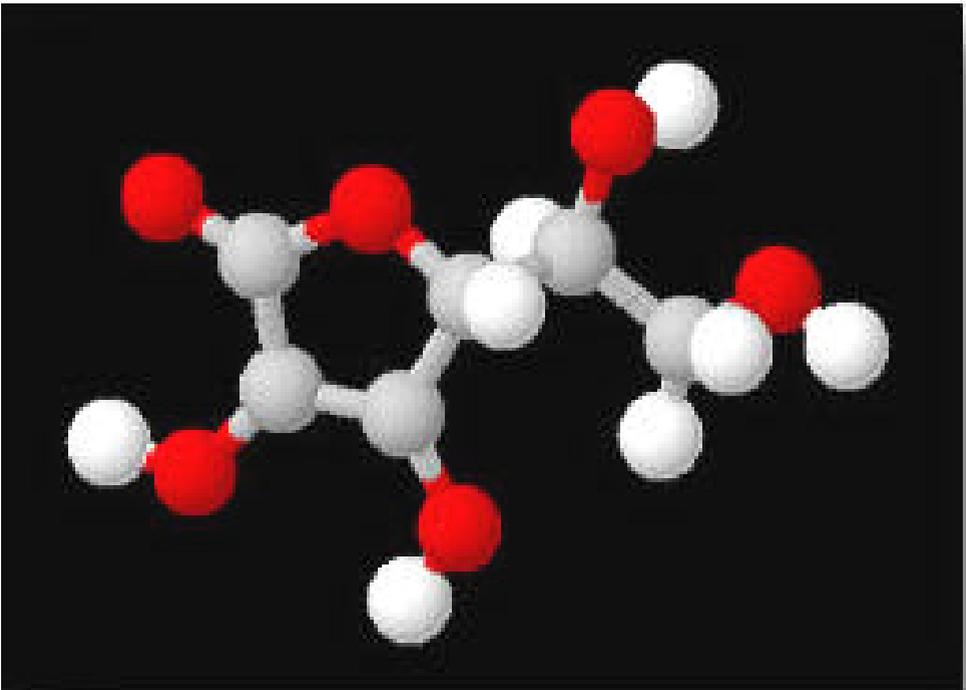


Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzzio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Luis Fernando Rigato Vasconcellos
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Pantanal

Emiko Kawakami de Resende
Chefe-Geral
José Anibal Comastri Filho
Chefe-Adjunto de Administração
Aiesca Oliveira Pellegrin
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
José Robson Bezerra Sereno
Chefe-Adjunto da Área de Comunicação e Negócios



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-1981
Dezembro, 2003*

Documentos 49

Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes

Marco Aurélio Rotta

Corumbá, MS
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, nº1880, Caixa Postal 109

Corumbá, MS, CEP 79.320-900

Fone: (67) 233-2430

Fax: (67) 233-1011

Home page: www.cpap.embrapa.br

E-mail: sac@cpap.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade:

Presidente: *Aiesca Oliveira Pellegrin*

Secretário-Executivo: *Marco Aurélio Rotta*

Membros: *Balbina Maria Araújo Soriano*

Evaldo Luis Cardoso

José Robson Bezerra Sereno

Secretária: *Regina Célia Rachel dos Santos*

Supervisor editorial: *Marco Aurélio Rotta*

Revisora de texto: *Mirane Santos da Costa*

Normalização bibliográfica: *Romero de Amorim*

Tratamento de ilustrações: *Regina Célia Rachel dos Santos*

Foto(s) da capa: Molécula do ácido ascórbico - University of Wales Swansea

(<http://www.swan.ac.uk/chemistry/DegreeSchemes/cmp>)

Editoração eletrônica: *Regina Célia Rachel dos Santos*

Elcio Lopes Sarath

1ª edição

1ª impressão (2003): formato eletrônico

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pantanal

Rotta, Marco Aurélio

Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes / Marco Aurélio

Rotta. - Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

54 p.; 21 cm -- (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973; 49).

1. Peixe - Ácido ascórbico - Vitamina C. 2. Nutrição - Peixe - Ácido ascórbico - Vitamina C. 3. Aquacultura - Peixe - Vitamina - Nutrição.

I. Embrapa Pantanal. II. Título. III. Série.

CDD: 639.8

©Embrapa 2003

Autor

Marco Aurélio Rotta

Eng^o. Agrônomo, M.Sc. em Zootecnia,
Pesquisador em Sistemas de Produção Aqüícolas,
Embrapa Pantanal,
Rua 21 de Setembro, 1880, Caixa Postal 109
CEP 79.320-900, Corumbá, MS
(67) 233-2430
rotta@cpap.embrapa.br, marcoarotta@yahoo.com.br
www.mrotta.cjb.net

Apresentação

Embora a indústria da aquicultura no Brasil venha crescendo nos últimos anos a uma taxa superior a 15% a.a., o potencial para a expansão dessa atividade é pouco aproveitado. Isso se deve, entre outras questões, à falta de uma política efetiva para organizar e promover o desenvolvimento da aquicultura como produtora de alimentos. Muito embora não se tenha um diagnóstico de ciência e tecnologia sobre a atividade, é possível inferir que as pesquisas no tema, além de dispersas territorialmente, caracterizam-se pela falta de integração entre os setores que compõem os diversos elos de sua cadeia produtiva.

Nas condições atuais, não há uma idéia real das potencialidades para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil, das prioridades de pesquisa e das demandas do setor produtivo. Essa situação tem resultado em diversos problemas que estão retardando o desenvolvimento da atividade. Visualiza-se, portanto, um papel central da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa - em termos de apoio à aquicultura, visando otimizar o aproveitamento do potencial natural, material e de recursos humanos existentes no País, através de uma atuação em nível nacional.

Diante deste quadro, a Embrapa Pantanal vem buscando suprir a falta de materiais técnicos que visem embasar o desenvolvimento da piscicultura, como podemos ver na presente publicação, que trata sobre a utilização do ácido ascórbico pelos peixes. Este assunto é de grande relevância quando se fala sobre otimização da produção, pois somente com um conhecimento das necessidades vitamínicas poderá se formular rações adequadas para o crescimento dos peixes, ainda mais para a fase de alevinagem, pois esta vitamina é de extrema importância nesta etapa do desenvolvimento.

Emiko Kawakami de Resende
Chefe-Geral da Embrapa Pantanal

Sumário

Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes	9
Introdução.....	9
Importância do Ácido Ascórbico na Nutrição dos Peixes	10
Histórico e evolução.....	10
Química.....	11
Absorção e funções metabólicas.....	15
Crescimento	20
Reprodução	24
Resposta ao estresse.....	27
Resistência a doenças	29
Formas do Ácido Ascórbico e Doses Utilizadas	31
Estabilidade	32
Bioatividade	34
Doses	37
Considerações Finais.....	42
Anexos	44
Referências Bibliográficas	45

Utilização do Ácido Ascórbico (Vitamina C) pelos Peixes

Marco Aurélio Rotta

Introdução

Os peixes, de um modo geral, necessitam dos mesmos nutrientes exigidos pelos animais terrestres para o crescimento, reprodução e outras funções fisiológicas. Esses nutrientes podem vir de organismos aquáticos ou de rações comerciais. Na piscicultura, como os peixes são mantidos em confinamento, o alimento natural se torna escasso, necessitando assim de uma ração nutricionalmente completa e balanceada.

O ácido ascórbico (vitamina C) é conhecido como promotor de numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, tanto em animais como em plantas. A maioria dos animais pode sintetizar esta vitamina em quantidades suficientes para prevenir os sinais clínicos de deficiência, conhecido como escorbuto. Entretanto, primatas, porcos da Índia, peixes, camarões, morcegos, pássaros e alguns insetos necessitam de uma fonte dietética de vitamina C para prevenir ou reverter os sintomas do escorbuto (O'Keefe, 2001).

Quando cultivados, os peixes tem se mostrado altamente sensíveis a dietas deficientes em ácido ascórbico, especialmente nos estágios iniciais de crescimento (Lavens et al., 1995). Muitos sinais, como crescimento reduzido, perda de apetite, conversão alimentar prejudicada, deformidades esqueléticas (lordose - curvatura da coluna vertebral de convexidade anterior; escoliose - desvio da coluna vertebral para um lado; e cifose - curvatura da coluna vertebral de convexidade posterior; Stedman, 1996), deformidades no opérculo e nas cartilagens das brânquias, anemia, hemorragia de vários órgãos, demora ou diminuição da cicatrização de feridas, coloração escura, redução do desempenho reprodutivo e diminuição da eclodibilidade têm sido encontrado em peixes que consomem dietas deficientes nesta vitamina (Lovell, 1989; Masumoto et al., 1991; Tacon, 1995).

O ácido ascórbico, na sua forma pura, é bastante instável, sendo facilmente destruído por temperaturas elevadas, luz, umidade, microelementos e lipídios oxidados (Tacon, 1991). Estes fatores também contribuem para as perdas de ácido ascórbico na ração durante o processo de industrialização e posterior armazenamento (Skelbaek et al., 1990; Tacon, 1991; Masumoto et al, 1991). Existem várias formas de ácido ascórbico e a estabilidade das mesmas tem sido testadas nas rações industrializadas para peixes (Soliman et al., 1986a; Skelbaek et al., 1990). Os trabalhos demonstram que as formas protegidas (ácido ascórbico-2-sulfato, ácido ascórbico-2-monofosfato, ácido ascórbico-2-difosfato, ácido ascórbico-2-trifosfato) são as mais estáveis e resistentes ao processo de industrialização e armazenamento e podem, desta forma, ser incorporadas em menores quantidades na ração para peixes (Matusiewicz et al., 1995; O'Keefe, 2001).

Este Documento tem por objetivo divulgar aos acadêmicos e estudiosos em nutrição de peixes um apanhado dos principais conhecimentos e trabalhos realizados sobre a utilização do ácido ascórbico, o seu metabolismo, sua influência no desempenho zootécnico dos peixes e as doses recomendadas.

Importância do Ácido Ascórbico na Nutrição dos Peixes

Histórico e evolução

O ácido hexurônico, descoberto em 1928 por Albert Szent-György, mostrou propriedades notáveis por ser facilmente e reversivelmente oxidado. Foi posteriormente identificado como sendo idêntico ao componente antiescorbútico presente nos limões e limas, sendo renominado para ácido ascórbico (Rose & Choi, 1990; Dabrowski et al., 1994).

Na literatura sobre nutrição de peixes, o primeiro autor a tratar desta vitamina e dos danos causados pela sua deficiência foi McLaren et al. (1947). Posteriormente Kitamura et al. (1965) e muitos outros autores estudaram a importância e a necessidade do ácido ascórbico na alimentação de peixes (Dabrowski et al., 1994).

Albert Szent-György postulou que o ácido ascórbico desempenha uma importante função nos mecanismos oxidativos em todas as espécies animais e vegetais. Tem sido recentemente reconhecido que os radicais livres ou as moléculas que contém oxigênio e que são altamente reativas atuam diretamente no desenvolvimento de doenças. Portanto, a hipótese que tem sido levantada é de que os primeiros vertebrados, que evoluíram antes do aumento do oxigênio atmosférico aos níveis atuais e que viveram nas águas onde a pressão de oxigênio é muito menor que na superfície terrestre, não

necessitariam do ácido ascórbico como necessitam as espécies terrestres, mais recentes evolutivamente que as primeiras (Rose & Choi, 1990).

Atualmente, algumas controvérsias existem a respeito da afirmação de que todos os Teleósteos (subdivisão dos Actinoptérgios, uma subclasse dos Osteíctes) são de fato incapazes de sintetizar ácido ascórbico. Em outros grupos taxonômicos dos Osteíctes (classe de peixes de esqueleto ósseo, têm a pele revestida de escamas ciclóides ou ctenóides, ou nua, quatro pares de brânquias reunidas numa cavidade única, protegida por opérculos), em particular os Condrósteos (ordem de peixes paleoptérgios, de corpo nu, ou com fileiras longitudinais de escudos ósseos, coluna vertebral cartilaginosa, mas ossos dérmicos no tronco e na cabeça), estudos demonstraram atividade da enzima *L-gulonolactona oxidase*. Estas descobertas sugerem que outros grupos taxonômicos entre os vertebrados inferiores (Pisces e Ciclostomados) mantêm uma rota metabólica ativa de síntese do ácido ascórbico e que os Teleósteos são os únicos que perderam esta habilidade. Estes achados também assinalam o fato de que o papel do ácido ascórbico como um antioxidante evoluiu nos vertebrados a mais de 400 milhões de anos, independentemente do aumento da pressão de oxigênio atmosférico aos níveis atuais (Dabrowski et al., 1994).

Química

Ácido ascórbico é o nome comum dado ao ácido 2,3-enediol-*L*-gulônico. É o agente redutor mais potente disponível às células e sua maior importância é devido a sua atuação como antioxidante, dado o seu alto potencial de redução. Contudo, em determinadas condições, o ácido ascórbico também pode atuar como um pró-oxidante. (Kaneko et al., 1997). Ambos os átomos de hidrogênio do grupo enediol (dois átomos de carbono duplamente ligados; Stedman, 1996) podem dissociar nas posições C-2 e C-3 (Smith et al., 1983), facilitando o transporte de hidrogênio dentro da célula animal (Tacon, 1987), o que resulta na grande acidez desta vitamina ($pK_1 = 4,2$; Kaneko et al., 1997). Os enedios são excelentes agentes redutores, sendo que a reação de redução normalmente ocorre de um modo gradativo, com o ácido monodesidroascórbico como uma semiquinona (radical livre que resulta da remoção de um átomo de hidrogênio com seu elétron durante o processo de desidrogenação; Stedman, 1996) intermediária (Kaneko et al., 1997).

O ácido desidroascórbico não é tão hidrofílico como o ácido ascórbico. Como tal, esta forma do ácido ascórbico se move facilmente através das membranas (Kaneko et al., 1997) e mantém o seu potencial vitamínico, pois pode ser reconvertida para ácido ascórbico através de redutases e co-fatores específicos, como a enzima *glutationa* e o $NADP^+$ (Lovell, 1989; NRC, 1993; O'Keefe, 2001). A forma desidrogenada, entretanto, é mais facilmente quebrada por um álcali, sofrendo a hidrólise do anel lactona, produzindo irreversivelmente o ácido 2,3-dicetogulônico (Lovell, 1989; Masumoto et al., 1991; Smith et al., 1983; O'Keefe, 2001), como pode ser visto na Fig. 1.

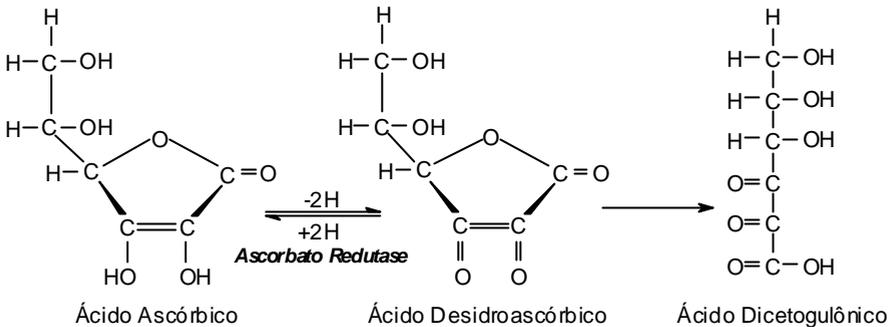


Fig. 1. Rota de oxidação e degradação do ácido ascórbico (Masumoto et al., 1991).

Quando ingerido em quantidades acima das necessidades metabólicas, níveis teciduais de ácido ascórbico são mantidos homeostaticamente. A homeostase (processo pelos quais é mantido o equilíbrio corporal com relação a diversas funções e composições químicas de líquidos e tecidos; Stedman, 1996) ocorre através da indução da descarboxilase do ácido ascórbico e da atividade enzimática de quebra, que resulta no aumento da degradação do ascorbato para CO_2 mais ribulose, ou ácido oxálico mais ácido treônico (Kaneko et al., 1997).

Em muitos organismos, a glicose, através da UDP-glicose, promove o aumento do *D*-glicuronato, um componente dos glicosaminoglicanos e um participante essencial em certos processos de desintoxicação, como também da síntese de ácido ascórbico no organismo (Nelson & Cox, 2000). Muitas espécies animais, como vacas, ovelhas e cabras, produzem seu próprio ácido ascórbico pela conversão do ácido glicurônico derivado da glicose. Três enzimas são necessárias para realizar esta conversão, entretanto uma destas enzimas está faltando nos peixes (Holford, 1997). A fim de manter as funções que necessitam de ácido ascórbico, os animais que a sintetizam produzem de 10 a 60 mg de ácido ascórbico por 1.000 kcal utilizadas no curso do metabolismo normal, através da rota do glicuronato (Fig. 2). Esta rota inicia-se com a *D*-glicose-1-fosfato, a qual é ativada mediante a união de um nucleotídeo (uridina-difosfato - UDP) e é catalisada pela enzima *glicose-1-fosfato uridil transferase*. A UDP-glicose sofre depois uma oxidação no carbono 6 (C-6) para formar o ácido glicurônico (UDP-*D*-glicuronato), a qual é catalisada pela enzima *UDP-glicose desidrogenase* (Kaneko et al., 1997). Nesse momento o ácido glicurônico pode entrar na rota da síntese do ácido ascórbico (Smith et al., 1983; Nelson & Cox, 2000). O *D*-glicuronato, formado a partir da hidrólise do UDP-*D*-glicuronato, é o precursor do ácido *L*-ascórbico. Nesta rota, *D*-glicuronato é reduzido para o açúcar ácido *L*-gulonato, o qual é convertido para lactona, a *L*-gulonolactona, que então sofre desidrogenação pela flavoproteína *L-gulonolactona oxidase* para produzir ácido *L*-ascórbico (Nelson & Cox, 2000), como pode ser visto na Fig. 2.

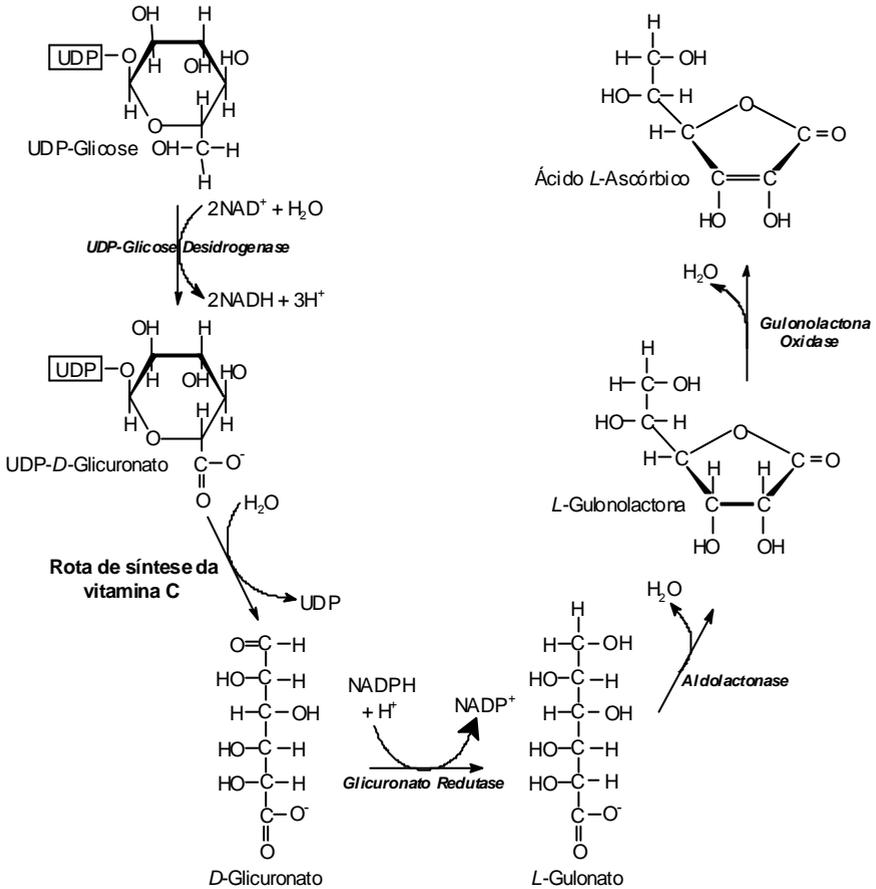


Fig. 2. Rota de biossíntese do ácido ascórbico (Nelson & Cox, 2000).

Entretanto, o ácido ascórbico não é sintetizado por alguns animais, como os primatas, os porcos da Índia, algumas cobras e alguns pássaros (Kitamura et al., 1965; Smith et al., 1983; McCluskey, 1985; O'Keefe & Grant, 1991; Jobling, 1994; Kaneko et al., 1997; Nelson & Cox, 2000). Muitas espécies de peixes também parecem ter falta ou limitada habilidade de sintetizar o ácido ascórbico (Kitamura et al., 1965; Jobling, 1994; O'Keefe, 2001). Esta essencialidade dietética da vitamina C nos peixes, camarões e nos outros animais provavelmente se deve pela falta ou insuficiência da enzima *L-gulonolactona oxidase* (GLO, EC 1.1.3.8), que catalisa o último passo da transformação do ácido glicurônico em ácido ascórbico (Fig. 2; Smith et al., 1983; Lovell, 1989; Wilson & Poe, 1973; Yamamoto et al., 1978). Esta enzima

é necessária para a biossíntese do ácido ascórbico através da glicose ou de outros precursores simples (Nelson & Cox, 2000).

Como exemplo desta falta ou deficiência enzimática nos peixes, estudos realizados com tilápia nilótica mostraram que a administração de dieta livre de ácido ascórbico resultou na redução da concentração tecidual desta vitamina e, em alguns casos, não foi verificada atividade vitamínica, indicando que esta espécie depende de fonte exógena de ácido ascórbico para o seu crescimento e desenvolvimento (Soliman et al., 1986a), sendo também essencial para reprodutores e larvas de tilápia mossâmbica (Soliman et al., 1986b).

Nos peixes, anfíbios e répteis, o ácido ascórbico, quando produzido pelo organismo, ocorre nos rins. Nos mamíferos, o fígado é o local de produção e os rins são inativos (McCluskey, 1985). Aparentemente, durante o curso evolutivo das espécies animais, a produção de enzimas para a síntese do ácido ascórbico mudou do rim, pequeno e saturado, para o fígado, mais amplo. Esta mudança foi a resposta evolutiva para a necessidade das espécies mais desenvolvidas por maiores fornecimentos desta substância vital (Stone, 1997). Esta mudança evolutiva dos rins para o fígado ocorreu juntamente com a mudança dos mecanismos de regulação da temperatura, quando os animais de sangue quente se desenvolveram a partir dos seus antecessores de sangue frio. Nos peixes, anfíbios e répteis, todos animais de sangue frio, as quantidades de ácido ascórbico produzidas nos seus pequenos rins eram suficientes para as suas necessidades. Entretanto, com o desenvolvimento da regulação da temperatura, que gerou os mamíferos, mais ativos e de sangue quente, cujos rins que estavam bioquimicamente saturados e não podiam mais suportar a produção de ácido ascórbico em grandes quantidades. Tanto os mamíferos quanto os pássaros, as duas linhas de vertebrados evoluíram conjuntamente e chegaram, de forma independente, a mesma solução para esse problema fisiológico, mudando para o fígado o local de síntese da vitamina C (Stone, 1997).

O fato de quase todas as espécies animais continuarem a sintetizar vitamina C sugere que a quantidade dessa vitamina, que geralmente está disponível na dieta, não é suficiente para uma nutrição adequada, exceto em circunstâncias excepcionais, como as que ocorrem em ambientes tropicais. Em circunstâncias normais, a quantidade diária de ácido ascórbico produzida pelo organismo, ajustada para a comparação com um animal com peso corporal de 10 kg, é algo entre 400 mg e 3.000 mg de vitamina C (Tabela 1). Os animais produzem quantidades variáveis, dependendo das circunstâncias, como por exemplo, em condições de estresse ou infecção a sua síntese pode facilmente quadruplicar (Holford, 1997).

Tabela 1. Produção diária de vitamina C em diferentes espécies animais (ajustado para o peso corporal de 10 kg).

<i>Espécie Animal</i>	<i>Produção de Vitamina C</i>
Cabra	530 a 3.090 mg
Rato	636 a 3.230 mg
Coelho	359 a 3.676 mg
Vaca	255 a 298 mg
Camundongo	547 a 4.473 mg
Ovelha	403 mg
Gato	78 a 651 mg

Fonte: Adaptado de Holford (1997) e ajustado pelo peso metabólico $P^{0,75}$.

Absorção e funções metabólicas

A absorção do ácido ascórbico no intestino difere de forma notável entre os mamíferos que não sintetizam esta vitamina e aqueles que a sintetizam. Os animais que necessitam de fontes exógenas de vitamina C necessitam de uma absorção intestinal muito eficiente, que os levou a possuir um processo de mediado por um transportador e que opera no epitélio intestinal, sendo altamente dependente da concentração de Na^+ na mucosa (Dabrowski et al., 1994).

A absorção celular de ácido ascórbico ocorre pelos processos de difusão facilitada simples e ativa. Nos peixes, como nos mamíferos, a absorção da vitamina C, que ocorre na membrana apical do enterócito, é realizada através de transportadores específicos dependentes de Na^+ , promovendo portanto uma absorção de Na^+ pela célula. A absorção da vitamina e do sódio não gasta energia diretamente, mas é dependente de um gradiente formado por um sistema de transporte ativo, usualmente a bomba de Na^+/K^+ . Esta bomba cria um gradiente de sódio favorável à sua entrada no enterócito. Desse modo, o Na^+ tende a entrar e, como o transportador só funciona se houver uma vitamina conectada, acaba por carregar ambos para dentro da célula. O ácido ascórbico, na sua forma reduzida, passa por difusão do interior do enterócito para os capilares sanguíneos existentes nas dobras intestinais (Rose & Choi, 1990; Verlhac & Gabaudan, 1998; Baldisserotto, 2002). O número de transportadores específicos de vitamina C na mucosa intestinal são substrato dependentes, logo, quanto maior a suplementação desta vitamina, mais eficiente será a sua absorção (Dabrowski et al., 1994).

O ácido ascórbico é mantido nas células por vários mecanismos. A enzima *ascorbato redutase* mantém o ácido *L*-ascórbico na forma reduzida, o que previne a perda desta vitamina nas células devido à menor possibilidade de hidrólise do ácido desidroascórbico (Fig. 1; Rose & Choi, 1990; Kaneko et al., 1997). Isto indica que o intestino dos peixes também absorve a forma oxidada do ácido ascórbico (ácido desidroascórbico - forma eletricamente neutra da vitamina C a qual é transportada por um mecanismo independente de Na^+ ; Dabrowski et al., 1994) como um nutriente e que participa da manutenção do potencial redox desta vitamina, nos fluidos corporais, pela redução do ácido desidroascórbico circulante. Esta função do intestino está presente tanto nas espécies animais que sintetizam o ácido ascórbico como também nas que não sintetizam e que necessitam da sua presença na dieta, aparentemente fazendo parte do sistema de transporte. Entretanto, somente os animais que necessitam da suplementação desta vitamina na dieta possuem no enterócito um mecanismo específico de transporte para a absorção do ácido ascórbico na forma reduzida (Rose & Choi, 1990).

Particularmente nos peixes, quantidades significativas de ácido ascórbico também podem existir como derivados 2-sulfato (O'Keefe & Grant, 1991). A habilidade de modificar o ácido ascórbico como derivados 2-sulfato ou 2-O-metil, tanto quanto de oxidá-lo, tem um impacto considerável na habilidade das células em compartimentalizar ou modular níveis funcionais desta vitamina (Kaneko et al., 1997). Tucker & Halver (1984) afirmam que ácido ascórbico-2-sulfato é um metabólito utilizado para armazenar a vitamina C nos tecidos dos peixes e funciona como um regulador da concentração desta vitamina nos mesmos. A interconversão do ácido ascórbico para o derivado 2-sulfato é catalisada pela enzima *ácido ascórbico sulfatase* (EC 3.1.6.1), a qual é modulada pelos níveis teciduais de ácido ascórbico através de retroalimentação (*feedback*) negativa.

O principal papel biológico do ácido ascórbico é como agente redutor, atuando em um grande número de funções importantes. Ele serve como co-fator nas oxidações, com funções distintas, as quais promovem a incorporação de oxigênio molecular em vários substratos (Kaneko et al., 1997). Atua também em várias reações de hidroxilação como, por exemplo, nas hidroxilações de lisina e prolina no protocólágeno, necessárias para as ligações cruzadas entre as fibras de colágeno, pois mantêm o ferro prostético (co-fator) da enzima *hidroxilase* na forma ferrosa (reduzida), mantendo a atividade enzimática. Por esta razão, o ácido ascórbico é importante na manutenção do tecido conectivo normal e na cicatrização, onde o tecido conectivo é o primeiro a proliferar, atuando, portanto, na síntese protéica (Kaneko et al., 1997). O ácido ascórbico também é importante na formação do osso, por participar na síntese do colágeno da matriz óssea, como pode ser visto na Fig. 3 (Smith et al., 1983; Lovell, 1989; Tacon, 1991; Masumoto et al., 1991; NRC, 1993; Jobling, 1994; Kaneko et al., 1997). Segundo Halver (1972), peixes alimentados com

ácido ascórbico marcados radioativamente com C^{14} mostraram que esta vitamina é rapidamente absorvida pelas áreas onde o colágeno é formado, isto é, na pele, na nadadeira caudal, nas cartilagens da cabeça e do maxilar, nas cartilagens que suportam as brânquias e nos ossos.

O atividade de ácido ascórbico é necessária pelo fígado para a destoxificação do organismo, utilizando as hidroxilases (mono-oxigenases) e algumas hidroxilases dependentes do Citocromo P450 que promovem a hidroxilação dos esteróides e drogas em outros xenobióticos e que também utilizam a vitamina C o como um agente redutor (O'Keefe & Grant, 1991; NRC, 1993, Iwama et al., 1997). Contaminantes dietéticos e do ambiente, como os metais pesados (Yamamoto & Inoue, 1985) e pesticidas organoclorados (Mayer & Mehrle, 1978) aumentam as necessidades de vitamina C pelos peixes. Segundo Murty (1988), o aumento do uso de vitamina C pelos peixes para a detoxificação de xenobióticos químicos causa uma deficiência funcional desta vitamina. Portanto, a ocorrência de deformidades na coluna vertebral em peixes pode ser um indicador precoce de estresse devido a contaminantes na água. Segundo Mehrle et al. (1982), o contaminante induz a competição por vitamina C entre o metabolismo do colágeno ósseo e as oxidases envolvidas na destoxificação de produtos químicos, que poderá causar danos vertebrais. Esta competição diminuiria os conteúdos de vitamina C e de colágeno no osso, com um aumento concomitante da relação entre os minerais ósseos e o colágeno, resultando em um aumento da fragilidade óssea.

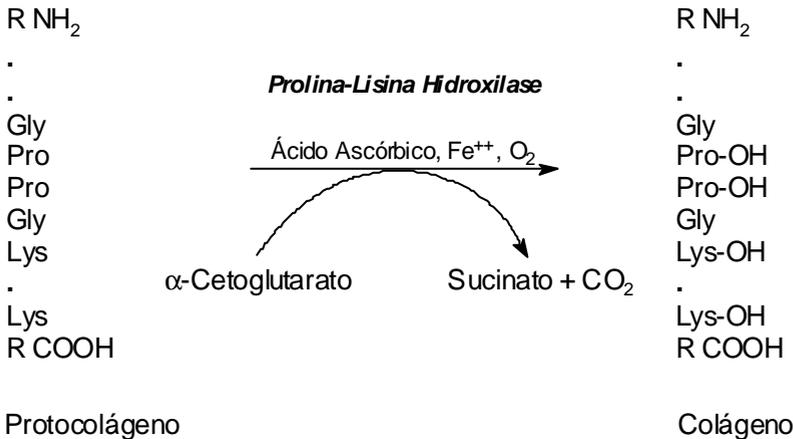


Fig. 3. Biossíntese do colágeno (Masumoto et al., 1991).

Além disso, os passos da hidroxilação na biossíntese da carnitina (Fig. 4) e a hidroxilação da tirosina na formação das catecolaminas representam outras importantes funções catalíticas do ácido ascórbico. A maioria das enzimas

vitamina C regenerar a vitamina E para sua forma funcional, porém também sugerem que a vitamina E possui capacidade de poupar o uso da vitamina C. Em outro estudo sobre a interação destas duas vitaminas, Cavichiolo et al. (2001) mostraram que o uso em conjunto das vitaminas C e E em tilápia nilótica influenciam na integridade branquial, embora nem sempre de forma significativa.

Como características gerais da deficiência de ácido ascórbico nos peixes, pode-se citar a escoliose, a cifose e a lordose, sendo que problemas branquiais também podem ocorrer, como podemos ver nas Fig. 5 (Soliman et al., 1986a; Tacon, 1991; Masumoto et al., 1991). As lesões que ocorrem nos tecidos conectivos são primeiramente um resultado do colágeno sub-hidroxilado (nos resíduos específicos de prolina e lisina), ficando suscetível à degradação de forma anormal (Kaneko et al., 1997). O colágeno sub-hidroxilado possui um baixo ponto de fusão em relação ao colágeno normal, sendo que a temperatura da água parece afetar a incidência de deformação óssea. Peixes que receberam dietas com baixos níveis de vitamina C apresentaram altas taxas de deformação em ambientes com alta temperatura da água (Sato et al., 1983). Além disso, a inabilidade de lidar com o estresse metabólico, que requer um funcionamento normal da glândula adrenal, e a reduzida habilidade de metabolizar ácidos graxos (síntese de carnitina) contribuem para os sintomas de escorbuto (Kaneko et al., 1997). Segundo Tucker e Halver (1984), os sintomas de letargia e fadiga apresentados no início dos sintomas de deficiência desta vitamina podem ser devido à depleção da concentração de carnitina no músculo.

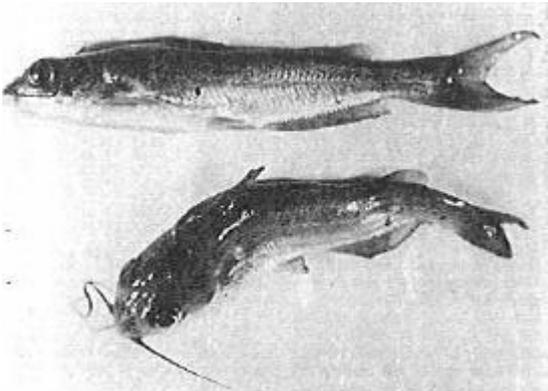


Fig. 5. Bagre-de-canal alimentado com dieta contendo ácido ascórbico (acima, normal) ou não (abaixo, apresentando escoliose e lordose; Lovell, 1989).

Como ocorre em todas as vitaminas hidrossolúveis, não há um mecanismo específico de conservação da vitamina C no organismo animal. Dabrowski et al. (1994) demonstraram que a diminuição da concentração tecidual de ácido ascórbico em trutas arco-íris após um período alimentar isento desta vitamina

segue um modelo em que os tecidos sofrem uma redução brusca nos primeiros 2 a 9 dias, seguido de uma redução gradual pelos próximos 34 a 78 dias. Segundo Halver et al. (1975), é necessário um crescimento em peso de 10 vezes para promover uma depleção tecidual de vitamina C e para o aparecimento dos sinais de deficiência desta vitamina nos peixes.

A meia-vida do ácido ascórbico nos animais está relacionada ao peso corporal e à temperatura. Na carpa comum, um peixe de águas quentes, a meia vida da vitamina C é de 34 dias, enquanto que na truta arco-íris é de 21 dias (Dabrowski et al., 1990). Quanto ao efeito do tamanho do peixe, Dabrowski et al. (1988) afirmam que há uma grande diferença nas taxas catabólicas de ácido ascórbico entre um peixe de 1 mg e um peixe de 10⁶ mg. Com estes resultados pode-se supor que, devido as características antioxidantes do ácido ascórbico no nível intracelular, os peixes de água fria, como a truta arco-íris, expostos à uma alta pressão de oxigênio e munidos com uma menor capacidade de transporte de oxigênio (transferência branquial e afinidade da hemoglobina) irão necessitar de uma grande proteção, na forma de ácido ascórbico, contra os radicais livres gerados pelos processo metabólicos normais. Esta suposição não ignora o fato de que baixas concentrações de ácido ascórbico no tecidos podem atuar como pró-oxidantes e produzir radicais livres. Entretanto, a redução não enzimática do ácido desidroascórbico e a enzima *ascorbato redutase* presente nos tecidos dos peixes são mecanismos utilizados para prevenir estas reações indesejáveis (Dabrowski et al., 1990; 1994).

Crescimento

O ácido ascórbico influencia diretamente o crescimento dos peixes, pois tem função importante na formação do colágeno, que é o principal componente do esqueleto, sendo, por isso, necessário para o desenvolvimento normal do organismo.

A curvatura na coluna vertebral é um sinal clássico encontrado precocemente em peixes com deficiência de vitamina C (Fig. 6). Escoliose, lordose, cifose e deformidades na cabeça e no opérculo (Fig. 7) têm sido produzidas pela alimentação deficiente em vitamina C em truta arco-íris, truta-de-riacho, salmão prateado, tilápia, bagre-de-canal e carpa comum (Lovell, 1989).

Em um experimento sobre crescimento de juvenis de tilápia nilótica, onde cinco formas de ácido ascórbico foram avaliadas (ácido L-ascórbico, ácido L-ascórbico sódico, ácido L-ascórbico revestido por glicerídeos, ácido L-ascórbico 2-sulfato e ascorbilpalmitato), por um período de oito semanas, foi verificado que a composição da carcaça foi pouco modificada. Entretanto, os peixes alimentados com dieta isenta de ácido ascórbico apresentaram vários sinais de deficiência após a sexta semana, como anemia, hemorragias, deformidade espinhal (Fig. 5 e 6), opérculo diminuído (Fig. 7), exoftalmia (Fig. 7) e erosão da nadadeira caudal (Fig. 8; Soliman et al., 1986a).



Fig. 6. Douradinho com deformidade na coluna vertebral devido à deficiência de ácido ascórbico na dieta.

Características semelhantes foram encontradas por Shiau & Hsu (1995) após oito semanas de alimentação de juvenis de tilápia híbrida com uma dieta isenta de ácido ascórbico, porém não foram encontradas anormalidades na coluna vertebral. Verificou-se, entretanto, que a concentração de colágeno na coluna foi proporcional à concentração de ácido ascórbico da dieta.

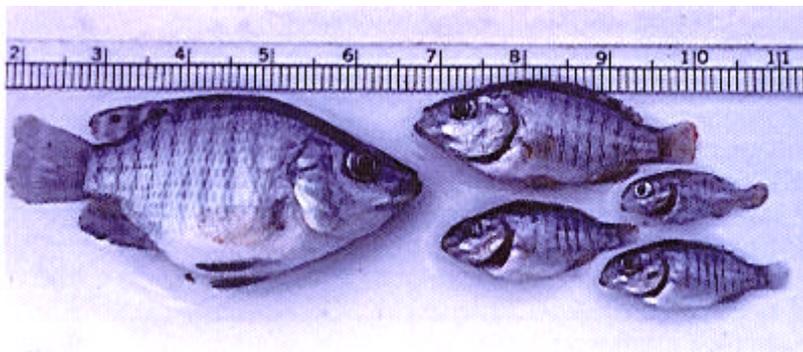


Fig. 7. Tilápia normal (à direita) e tilápias com deformidade opercular e exoftalmia devido à deficiência de ácido ascórbico na dieta (à esquerda).

Em um experimento com larvas de tilápia mossambica foi observado redução no crescimento e piora na conversão alimentar em larvas alimentadas com dieta isenta de ácido ascórbico. Estes sinais foram mais pronunciados em larvas oriundas de reprodutores que não receberam ácido ascórbico na dieta em relação àqueles que receberam. Outra consequência da deficiência vitamínica foi a alta porcentagem de larvas deformadas, cuja análise histológica revelou que a deformidade estava relacionada com danos na coluna vertebral (Soliman et al., 1986b).

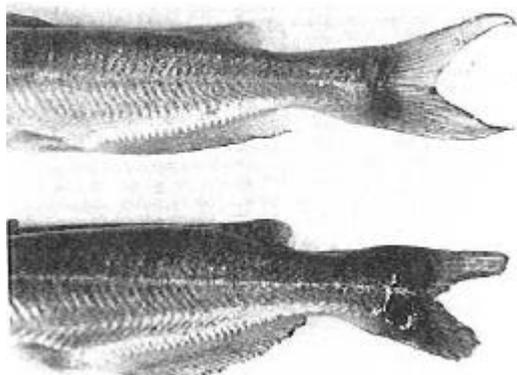


Fig. 8. Bagre-de-canal alimentado com dieta com (acima, normal) ou sem ácido ascórbico (abaixo, apresentando erosão na nadadeira caudal; Lovell, 1989).

Em larvas de truta arco-íris que foram alimentadas durante 10 semanas com uma dieta isenta de ácido ascórbico foram observadas lordose e escoliose, combinadas com letargia e despigmentação da pele (Albrektsen et al., 1988). Já Skelbaek et al. (1990) trabalhando com alevinos de truta arco-íris constataram que, após oito semanas de alimentação com uma dieta isenta de ácido ascórbico, não ocorreram diferenças dos pesos médios quando comparados com os peixes alimentados com ácido ascórbico. Estes resultados mostram que a ausência desta vitamina durante oito semanas não prejudicou a taxa de crescimento em trutas jovens. Neste mesmo experimento foi constatado que, a partir da sétima semana, os animais do grupo privado de ácido ascórbico apresentaram sintomas clínicos de dilatação da bexiga natatória e inflamação e hemorragia no sistema gastrointestinal, sintomas possivelmente relacionados à deficiência desta vitamina na dieta.

Outro experimento com alevinos de truta arco-íris mostrou que, após 18 semanas de alimentação com dieta isenta de ácido ascórbico, os peixes não apresentaram nenhum sinal visível de escorbuto. Porém, em um experimento anterior, usando alevinos bem menores, sinais de deficiência de ácido ascórbico apareceram na nona semana (Matusiewicz et al., 1995). Isto levou à conclusão de que peixes menores possuem maior exigência em ácido ascórbico do que peixes maiores, demonstrando que as necessidades dietéticas de vitamina C pelos peixes parecem decrescer com a idade (Matusiewicz et al., 1995), possivelmente devido a uma menor necessidade para as funções bioquímicas com a idade, uma reutilização endógena mais eficiente ou pelo aumento da capacidade de armazenamento (Waagbø et al., 1989). Porém, mesmo os peixes maiores, após 18 semanas sem ácido ascórbico, apresentam níveis teciduais desta vitamina bastante reduzidos (Matusiewicz et al., 1995). Estes achados corroboram com Li & Lovell (1985) que afirmam que a dose de 60 mg/kg de ácido ascórbico na dieta foi necessário para um crescimento normal e para o

desenvolvimento ósseo em juvenis (10 g de peso) de bagre-de-canal, mas a dose de 30 mg/kg foi suficiente para peixes maiores (50 g de peso).

Alevinos de bagre-de-canal apresentaram sinais de escorbuto, como escoliose, lordose e anorexia, 12 semanas após receberem dieta isenta de ácido ascórbico. Além disso, foi constatado que estes animais apresentaram tamanhos significativamente menores e com menos colágeno ósseo que aqueles alimentados com uma dieta contendo alguma fonte desta vitamina (Mustin & Lovell, 1992).

Em alevinos de piauçu, a suplementação de vitamina C, com doses entre 50 e 850 mg/kg de ração, não apresentou influência significativa no ganho de peso e na taxa de sobrevivência (Mello et al., 1999). Utilizando doses maiores em alevinos de pintado (entre 0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 mg/kg), Fujimoto et al. (2000) observaram que ocorreram deformidades no sistema ósseo nos peixes alimentados sem suplementação a partir do segundo mês de experimento, com maior ocorrência de deformidades na boca e nas nadadeiras.

Como as dietas deficientes em vitamina C resultam em má formação de ossos e cartilagens, principalmente na região do opérculo, que ficam curtos e deformados, deixando parte das brânquias expostas (Fig. 7), como ocorre também deformidade nos arcos branquiais e cartilagens de sustentação das lamelas e filamentos branquiais (Fig. 9), ocorre, como consequência, uma perda de eficiência no bombeamento de água através das brânquias (diminui a ventilação) e na extração de oxigênio da água pelo peixe, ficando menos tolerante às condições de baixo oxigênio dissolvido (Kubitza, 1999).

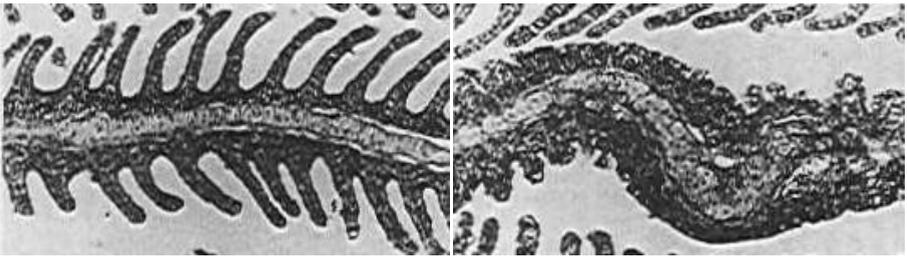


Fig. 9. Filamento branquial normal (direita) e filamento braquial com deformidade na cartilagem de suporte e formação irregular dos condrócitos (células cartilaginosas - esquerda) em bagre-de-canal alimentado com dietas com e sem ácido ascórbico, respectivamente (Lovell, 1989).

Em acará-açú (Fracalossi et al., 1998), estudos histológicos demonstraram que peixes sem suplementação de vitamina C apresentaram deformidades na cartilagem de suporte dos filamentos branquiais, como também atrofia nas fibras musculares.

Reprodução

As funções cruciais do ácido ascórbico na reprodução parecem estar na vitelogênese e na embriogênese e entende-se que um bom estado nutricional desta vitamina no organismo é essencial para um bom desempenho de ambos estados de desenvolvimento (Masumoto et al., 1991).

Sabe-se que o estado nutricional do embrião dos peixes, necessário para o desenvolvimento adequado dos animais, depende da transferência dos nutrientes dos reprodutores para os gametas, inclusive o ácido ascórbico, durante a vitelogênese, influenciando a sua qualidade tanto nas fêmeas quanto nos machos (Masumoto et al., 1991; Dabrowski et al., 1994; Dabrowski & Blom, 1994). Assim, a dieta dos reprodutores não deve atender somente as exigências nutricionais ou o desenvolvimento gonadal, mas também o desenvolvimento embrionário após a desova (Masumoto et al., 1991). Tem sido demonstrado que o desempenho reprodutivo das fêmeas diminui quando são fornecidas dietas sem ou com baixa suplementação de ácido ascórbico, havendo uma diminuição da concentração de ácido ascórbico no ovário, do número de ovos desovados, do peso úmido dos ovos, da eclodibilidade e do aumento do número de larvas com deformidade e da mortalidade das mesmas (Soliman et al., 1986b; Masumoto et al. 1991;).

Soliman et al. (1986b) realizaram um experimento onde reprodutores de tilápia mossâmbica foram alimentados com dietas com e sem suplementação de ácido ascórbico, sendo suas progênies alimentadas posteriormente também com dietas com e sem suplementação. Os autores observaram que as fêmeas alimentadas com a dieta sem vitamina C exibiram concentrações significativamente menores de ácido ascórbico total no ovário (um dos tecidos que apresenta as maiores concentrações desta vitamina). A quantidade total de ácido ascórbico nos ovos coletados das fêmeas alimentadas com a dieta contendo vitamina C representou somente 47% do conteúdo ovariano de ácido ascórbico do peixe, devido, provavelmente, a limitações na transferência desta vitamina do ovário para os ovos como também devido ao metabolismo do ácido ascórbico. Esta transferência de ácido ascórbico do ovário para os ovos é muito importante para as larvas, pois fornece um estoque de ácido ascórbico a estas para ser utilizado após a eclosão, a qual é a fase mais crítica para a sobrevivência das larvas. O ácido ascórbico não foi detectado nos ovos e nas larvas oriundas de peixes alimentados com dietas isentas desta vitamina.

A eclodibilidade dos ovos produzidos por fêmeas de tilápia mossâmbica alimentadas com dieta sem ácido ascórbico diminuiu significativamente após 21 semanas, concomitantemente com o aumento da porcentagem de larvas deformadas na coluna vertebral (Soliman et al., 1986b). Não foi encontrado deformidade na coluna vertebral em larvas oriundas de ovos de peixes que se alimentaram da dieta com vitamina C. Para explicar as deformidades na coluna vertebral das larvas, os autores sugerem que a síntese de colágeno ficou

prejudicada devido a falta de ácido ascórbico. Também foi observado que o nível total de ácido ascórbico detectado nas larvas oriundas das fêmeas com suplementação foi menor que nos seus respectivos ovos, indicando que o ácido ascórbico foi metabolizado durante o desenvolvimento embrionário. De acordo com Masumoto et al. (1991), a biossíntese de colágeno ocorre ativamente após a fertilização, período no qual o tecido conectivo colagenoso e o esqueleto começam a ser construídos, indicando assim a utilização do ácido ascórbico no desenvolvimento embrionário.

Soliman et al. (1986b) também observaram retardamento da maturação gonadal em tilápia mossâmbica alimentada com dieta isenta de ácido ascórbico. Nesses animais, os sinais de maturação gonadal apareceram 16 semanas após o início do experimento, enquanto que, nos peixes que receberam ácido ascórbico na dieta, os sinais de maturação gonadal apareceram na 14ª semana.

Em um estudo com truta arco-íris, fêmeas de dois anos de idade foram mantidas por 10 meses com dietas com 360 mg/kg e sem ácido ascórbico. A mortalidade cumulativa das larvas oriundas das fêmeas sem ácido ascórbico e alimentadas posteriormente com dietas contendo níveis altos (500 mg/kg de ração) e marginais (20 mg/kg de ração) de ácido ascórbico foi avaliada. As proles obtidas das fêmeas com deficiência de ácido ascórbico e que receberam a dieta com nível marginal dessa vitamina mostraram continuamente altas mortalidades, chegando a 100% após a 15ª semana. As larvas oriundas das fêmeas com deficiência de ácido ascórbico, mas que receberam dietas com alto nível desta vitamina, não apresentaram diferenças significativas em termos de mortalidade a partir da sétima semana em relação às proles alimentadas com a mesma dieta, porém oriundas de fêmeas alimentadas com dietas com ácido ascórbico. Com relação ao nível corporal de ácido ascórbico, a partir do 50º dia e 74º dia após o início da alimentação, as larvas que se alimentaram, respectivamente, de dietas com nível alto ou marginal de ácido ascórbico, não apresentaram diferenças significativas, independentemente da origem materna (Blom & Dabrowsky, 1996).

Sandnes et al. (1984), em seu estudo para testar o efeito da suplementação do ácido ascórbico adicionado à ração de reprodutores de truta arco-íris, encontraram resultados muito favoráveis quanto ao desempenho reprodutivo, como podemos ver na Tabela 2.

O efeito positivo dos altos níveis de vitamina C nos embriões se estende por longos períodos de nutrição endógena. Acredita-se que não há um mecanismo de conservação existente durante as fases iniciais de vida, onde 37% das reservas de ácido ascórbico são utilizadas durante o desenvolvimento embrionário, o qual é independente da concentração inicial nos ovos no momento da fertilização (Dabrowski et al., 1994).

Tabela 2. Diferenças dos parâmetros reprodutivos em truta arco-íris suplementadas ou não com ácido ascórbico (AA).

Parâmetros	Sem AA	Com AA
Nº de ovos/peixe	2.963 ± 882	3.156 ± 1.114
[AA] nos ovos (µg/mg)	15 ± 7	31 ± 9
% eclosão dos ovos/peixe	63 ± 29	85 ± 15

Fonte: Sandnes et al. (1984).

Diferenças do nível de suplementação de ácido ascórbico monofosfato levaram a diferenças significativas tanto no número total quanto no peso das ovas produzidas, entretanto não influenciaram o tamanho do ovo (Tabela 3; Blom & Dabrowski, 1995). Em truta arco-íris o ácido ascórbico monofosfato não foi detectado nas ovas, o que leva a conclusão de que somente o ácido ascórbico puro é transportado e armazenado nestes tecidos (Dabrowski et al., 1994).

Tabela 3. Efeito de diferentes níveis de ácido ascórbico monofosfato em dietas para reprodutores de truta arco-íris na produção de ovos.

Nível na ração (mg/kg)	Fecundidade (ovos/peixe)	Peso das ovas (g/peixe)	Tamanho do ovo (mg)
0	2288 ± 426a	114 ± 28a	49,8 ± 5,0a
30	3245 ± 730bc	142 ± 32ab	44,2 ± 6,3a
110	2890 ± 815ab	116 ± 33a	40,5 ± 5,3a
220	3630 ± 989bc	167 ± 40b	46,3 ± 1,9a
440	3470 ± 684bc	168 ± 50b	47,5 ± 6,2a
870	3729 ± 613c	173 ± 15b	47,0 ± 5,7a

Valores expressos como média ± DP. Médias dentro das colunas com mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$).

Fonte: adaptado de Blom & Dabrowski (1995).

Outra influência que a vitamina C possui sobre a reprodução é o seu efeito na esteroidogênese que ocorre nas gônadas. O alto nível de ácido ascórbico nos ovários e na glândula supra-renal é um reflexo da sua função endócrina, na qual a vitamina C pode atuar como um regulador ou co-fator na biossíntese de esteróides no folículo ou nas células adrenais (Tolbert et al., 1975). Em um estudo sobre reprodução, Waagbø et al. (1989) mostraram um decréscimo nos níveis de 17-β-estradiol e vitelogenina durante o rápido crescimento ovariano em truta arco-íris alimentada com dieta isenta de ácido ascórbico. A síntese de vitelogenina no fígado é regulada pelos receptores do 17-β-estradiol e ambos são bons indicadores bioquímicos do processo de vitelogênese. Portanto,

parece haver uma relação direta entre o ácido ascórbico e o desenvolvimento ovariano em peixes.

Resposta ao estresse

Atualmente, nos modernos sistemas de aquacultura intensiva, os peixes são criados em altas densidades utilizando grandes quantidades de ração. Sob estas condições certamente haverá alta concentração de amônia, oriunda dos excrementos ou da excreção de nitrogênio, conjuntamente com a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido (OD), devido a intensa utilização pelos peixes e à degradação da matéria orgânica do viveiro. Ambas situações levam a um ambiente com péssimas condições para o crescimento e desenvolvimento dos peixes, levando-os a um estado de estresse (Masumoto et al., 1991).

As deficiências em vitaminas e micronutrientes normalmente atuam sinergicamente nas infecções. A vitamina C, em particular, é geralmente considerada como detentora de efeitos benéficos no tratamento das doenças e na resistência ao estresse, tanto em salmonídeos como no bagre-de-canal, quando alimentados com um nível que supra as necessidades básicas, geralmente entre 50 e 100 mg/kg de ração (Wedemeyer, 1997).

A disponibilidade da vitamina C e o estado nutricional podem também influenciar na dispersão da infecção por afetarem a produção e manutenção dos tecidos de reparo. A vitamina C e os aminoácidos sulfurados são necessários para a deposição da fibrina, colágeno e polissacarídeos dentro dos vacúolos que são formados para isolar o microrganismo patogênico invasor pelos lisossomos (organela membranosa que contém diversos tipos de enzimas hidrolíticas, coadjuvantes da digestão intracelular e de organismos exógenos). Logo, deficiências desta vitamina podem inibir o processo de vacuolização (Wedemeyer, 1997).

Um crescimento substancial na atividade proteolítica plasmática não-específica pode ser estimulada por bactérias patogênicas que produzem endotoxinas ou por certos tipos de situações estressantes. Condições de estresse crônico, como o que ocorre quando há baixo oxigênio dissolvido nas unidades de criação, tendem a diminuir a atividade dos lisossomos, enquanto que situações de estresse agudo, como transporte e confinamento, levam ao aumento dos mesmos, tanto em carpas chinesas quanto em salmão do Atlântico (Hajji et al., 1990; Thompson et al., 1993). Portanto, é possível que o estresse agudo possa agir sinergicamente com a deficiência em vitamina C para facilitar a dispersão dos patógenos invasores nos tecidos dos peixes (Wedemeyer, 1997).

A vitamina C possui uma função positiva na melhora do estresse, sendo que vários fatores tem sido atribuídos a ela quanto à resposta ao estresse nos peixes. Os corticosteróides estão associados com o rim anterior, onde funções adrenais estão localizadas nos tecidos interrenais, que estão sobre controle do hormônio adrenocorticotropico (ACTH) e que é rico em ácido ascórbico,

refletindo mudanças na sua concentração conforme o nível de vitamina C na dieta (White et al., 1993). Após duas horas de pequeno estresse, o salmão prateado apresentou uma diminuição nos níveis de ácido ascórbico nos rins durante os primeiros 20 minutos, seguido de uma recuperação após duas horas a, praticamente, o nível inicial. Como não houve um aumento concomitante do nível plasmático de ácido ascórbico, Wedemeyer (1969) sugere que o ácido ascórbico possa ser utilizado na biossíntese de esteróides, pois o cortisol sérico aumentou enquanto a concentração de ácido ascórbico diminuiu. Dabrowski et al. (1994) também afirmam que o ácido ascórbico é um co-fator na biossíntese de hormônios esteróides e de neuro-hormônios. Waagbø et al. (1989) demonstraram um nível significativamente menor em trutas arco-íris que foram alimentadas com dietas deficientes em vitamina C.

Kitabchi (1967) afirma que altos níveis de ácido ascórbico possuem uma função inibitória na síntese de esteróides, pois previnem a conversão dos ácidos graxos insaturados em ésteres de colesterol, os quais são incorporados nos esteróides. Esta foi, portanto, uma conclusão que levou a sugerir que o aumento da disponibilidade de ácido ascórbico possa prevenir a severidade da resposta ao estresse nos peixes.

Em um experimento que visou testar o efeito da suplementação de ácido ascórbico na resposta ao estresse devido à hipóxia no peixe papagaio, Ishibashi et al. (1992) utilizaram dietas com níveis de 0, 75 e 300 mg AA/kg, sendo estas ministradas ao peixes por duas semanas antes de submeter a metade dos peixes a uma condição de hipóxia a cada 3 ou 4 dias, durante 16 semanas. No grupo alimentado com a dieta sem ácido ascórbico sintomas associados a deficiência de vitamina C apareceram mais cedo e foram mais severas nos peixes que foram submetidos ao estresse do que aqueles que não foram. Os peixes alimentados com 300 mg/kg de vitamina C não foram significativamente afetados pelo estressor, concluindo-se que a suplementação de ácido ascórbico amenizou os efeitos causados pelo estresse devido à hipóxia.

Ainda é controversa a função do ácido ascórbico na biossíntese de cortisol. O ácido ascórbico possui uma função específica na biossíntese de catecolamina, que é outro hormônio relacionado ao estresse. A enzima *dopamina b-hidroxilase* necessita da forma reduzida do íon cobre como um co-fator, tendo o ácido ascórbico uma ação efetiva na manutenção deste co-fator na sua forma ativa reduzida, como pode ser visto na Fig.10 (Masumoto et al., 1991). Entretanto, diversos estudos não foram capazes de relacionar as concentrações dietéticas do ácido ascórbico com a resposta ao estresse. O nível de cortisol sérico aumentou no salmão do Atlântico após estresse físico, porém não foi influenciado significativamente pelo nível de vitamina C tecidual dos peixes. As concentrações de vitamina C no fígado e nos rins refletiram sua absorção via dieta, entretanto não houve mudanças significativas nessas concentrações após o estresse (Sandnes & Waagbø, 1991).

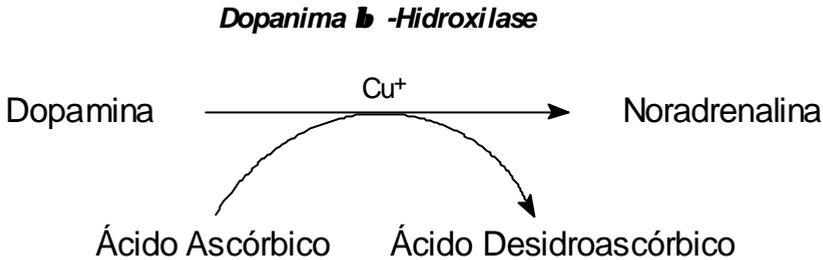


Fig. 10. Biossíntese da noradrenalina (Masumoto et al., 1991).

Segundo Thompson et al (1993), os níveis de ácido ascórbico não foram afetados pelo estresse em salmão do Atlântico, ao contrário do que ocorreu com várias atividades imunológicas. A queima respiratória e a atividade bactericida dos leucócitos diminuiu, enquanto que a atividade bactericida do plasma aumentou devido ao estresse, mas nenhum destes fatores foram afetados pela concentração corporal de vitamina C.

Não parece haver qualquer estudo bioquímico que confirme o envolvimento do ácido ascórbico na biossíntese dos corticosteróides ou catecolaminas nos peixes (Fletcher, 1997). Mesmo que o ácido ascórbico não tenha sido provado como sendo um atenuante das respostas dos peixes a certos tipos de estresse, parece haver pouca dúvida que o aumento dos níveis dietéticos contribuem para a resistência a doenças e para o aumento de certas respostas imunológicas nos peixes (Blazer, 1992; Waagbø, 1994).

Resistência a doenças

Em situações de estresse ou de saúde debilitada, os peixes ficam propensos às infecções bacterianas. Sua primeira defesa contra estes patógenos são as barreiras naturais, como a pele e o epitélio das membranas (Masumoto et al., 1991). Após a invasão do patógeno, ocorrem respostas do sistema imunológico, principalmente respostas não específicas (Fracalossi, 1998), através da atividade dos leucócitos (células brancas do sangue), os quais possuem uma elevada atividade fagocítica, destruindo os organismos patogênicos (Masumoto et al., 1991).

Atividade fagocítica das células do sistema imune nos peixes produzem radicais livres reativos ao oxigênio que possuem uma potente ação microbicida, mas também são tóxicos aos macrófagos (Secombes et al, 1988), porém a vitamina C evita danos à estas células e aos tecidos circunvizinhos (NRC, 1993).

Os leucócitos são capazes de armazenar grandes quantidades de ácido ascórbico no seu citosol e, conseqüentemente, requerem um grande período de carência para ficarem com deficiência nesta vitamina. Esta capacidade que os leucócitos tem para armazenar e manter a ácido ascórbico no citosol pode estar

relacionada às exigências por substâncias antioxidantes com o intuito de manter a integridade das membranas e o adequado funcionamento das células imunes (Verlhac et al., 1996), pois peróxidos e radicais livres são produzidos por estas células com o objetivo de destruir os patógenos fagocitados pelos lisossomos, mas uma superprodução destes pode ser letal para a própria célula (NRC, 1993; Fracalossi, 1998).

Em truta arco-íris foi demonstrado que o nível de ácido ascórbico afeta a primeira proteção celular contra injúrias, pois a longa fase indutiva da proteção humoral mostrou que os anticorpos não são o primeiro sistema de resposta envolvidos na rápida proteção da célula, sendo que uma alta e persistente proteção foi induzida por imunização combinada com o consumo de altas doses de ácido ascórbico (Navarre & Halver, 1989). Em outro experimento com a truta arco-íris foi demonstrado que a combinação de glicanos (polissacarídeos, como a amilose e a celulose) com altas doses de ácido ascórbico em um pequeno período de tempo tiveram um efeito estimulatório nos parâmetros imunológicos específicos (resposta dos anticorpos) e não específicos (atividade fagocítica; Navarre & Halver, 1989). Já no bagre-de-canal estudos mostraram que dietas com altas doses de ácido ascórbico parecem ser ineficientes como tratamento profilático visando um aumento na resistência contra a bactéria *Edwardsiella ictaluri* (Li et al., 1993). Segundo Li & Lovell (1985), o bagre-de-canal mostrou resistência completa a septicemia entérica ocasionada por esta mesma bactéria após ser alimentado com megadoses de vitamina C (3.000 mg/kg), como podemos ver na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem da mortalidade do bagre-de-canal alimentado com níveis crescentes de vitamina C e infectado com a bactéria *Edwardsiella ictaluri*.

Nível de vitamina C (mg/kg)	Porcentagem da mortalidade (8 dias após a infecção)
0	100
30	70
60	70
150	35
300	15
3.000	0

Fonte: Li & Lovell (1985).

A alimentação com vitamina C e E em quantidades acima das doses básicas necessárias também mostrou possuir efeitos benéficos na resistência a doenças do salmão do Atlântico e do Pacífico (Hardie et al., 1990). Entretanto, ainda não se tem pleno conhecimento sobre o potencial das megadoses de ácido ascórbico sobre o sistema imunológico comparado às doses recomendadas para

evitar sinais de escorbuto. A razão destas discrepâncias não está esclarecida, contudo, a metodologia empregada, as espécies de peixes utilizadas, o tamanho do peixe, a dieta experimental, o antígeno usado, a severidade da exposição e o método de exposição do patógeno certamente influenciam nos resultados (Masumoto et al., 1991).

Resistência ao vírus da necrose hematopoiética infecciosa foi verificada em trutas com seis semanas de idade, sendo diretamente proporcional ao nível de ácido *L*-ascórbico-2-polifostato, entre os níveis de 20 a 320 mg/kg de atividade de ácido ascórbico. Esta resposta foi observada tanto nos peixes vacinados como nos não vacinados, indicando um efeito tanto na resposta imune nativa como na resposta imune conferida pela vitamina C (Satyabudhy et al., 1989).

Segundo Martins (1998), para o pacu a suplementação de ácido ascórbico promoveu um aumento na resistência a parasitas e sugere que um nível adequado de suplementação desta vitamina promove uma melhora nutricional tanto pelo estímulo do apetite como pela melhora da resposta imunológica.

Formas do Ácido Ascórbico e Doses Utilizadas

Desde o conhecimento da necessidade de se adicionar ácido ascórbico nas rações industrializadas (peletizadas ou extrusadas), para as diferentes espécies animais, vem se buscando conseguir uma forma desta vitamina que seja mais estável ao processo de industrialização (Tabela 5), o qual a destrói em grande parte. Conjuntamente ao avanço nesta área, as doses empregadas podem ser diminuídas, uma vez que as formas de ácido ascórbico protegidas são mais estáveis e resistem ao processo de industrialização.

Tabela 5. Formas da vitamina C disponíveis para a alimentação animal.

<i>Pura</i>	<i>Protegida</i>	<i>Estabilizada</i>
Cristalina	Lípido/Glicerídeo	6-Palmitato
Sal sódico	Etilcelulose	2-Sulfato
	Polímero sintético	2-Monofosfato
		2-Monofosf. (sal sódico)
		2-Monofosf. (sal magnesiano)
		2-Polifosfato

Estabilidade

O ácido *L*-ascórbico na sua forma cristalina, seca e pura é razoavelmente estável. Entretanto, é facilmente oxidado em condições neutras ou alcalinas, onde o oxigênio, a umidade, os microelementos, as temperaturas elevadas, a luz e os lipídios oxidados promovem sua oxidação e destruição (O'Keefe, 2001). Por estas razões, perdas dessa vitamina podem ocorrer durante a industrialização e o prolongado armazenamento das rações (Tacon, 1991). Os métodos de processamento e armazenamento que removem o oxigênio, reduzem o calor, evitam o contato com ferro, cobre e outros metais aumentam significativamente a retenção da atividade de vitamina C nas rações. Entretanto, a estabilidade efetiva do ácido ascórbico foi alcançada somente com a proteção física ou química dos agentes oxidantes (O'Keefe, 2001).

Um dos principais métodos de proteção física é a encapsulação do ácido ascórbico puro. Num estudo com truta arco-íris para determinar a estabilidade de quatro diferentes formas de ácido ascórbico incorporados a ração, sendo uma a forma pura e as outras três as formas protegidas (encapsuladas) com glicerídeo, etilcelulose e polímero sintético, mostrou que o ácido ascórbico protegido com o polímero sintético foi mais estável que a forma pura e as outras formas protegidas. As perdas no processamento foram de 29% para a forma pura e 19% para a forma protegida com polímero sintético, enquanto que a degradação durante o armazenamento foi rápida para a forma pura, o que não ocorreu com a forma protegida com polímero sintético. As formas protegidas com glicerídeo e etilcelulose pareceram ter a mesma estabilidade que a forma pura (Skelbaek et al., 1990). Segundo O'Keefe (2001), quando a vitamina C encapsulada é misturada com os outros ingredientes da ração e submetida a todo o processo de industrialização necessário sua proteção é restrita.

Gorduras com altos pontos de fusão também têm sido utilizadas para proteger o ácido ascórbico adicionado às rações, principalmente as utilizadas na aquacultura, pois evitam a sua lixiviação. Além disso, estas gorduras são altamente digestíveis e não afetam a biodisponibilidade da vitamina, parecendo ser bem mais efetiva que a proteção gerada pela etilcelulose. Entretanto, grandes perdas de vitamina C encapsulada com gordura podem ocorrer se houver forte atrito ou calor, rompendo assim a sua proteção. Estas características acabam limitando a utilização deste tipo de encapsulamento nas rações extrusadas (O'Keefe, 2001).

Como alternativa ao encapsulamento, vários métodos químicos de estabilização do ácido ascórbico foram desenvolvidos com vistas a manter a atividade da vitamina C nas rações utilizadas na aquacultura. Os derivados mais efetivos são os ésteres 2-sulfato e 2-fosfato. Nestes componentes a esterificação protege o grupo 2,3-enediol do ácido ascórbico da oxidação pela substituição do grupo 2-hidroxila pelo grupo eletrodensosulfato ou fosfato (O'Keefe, 2001). Segundo

O'Keefe (2001), o ácido *L*-ascórbico-2-sulfato é, provavelmente, o mais estável derivado do ácido ascórbico já descoberto. É um metabólito natural do ácido ascórbico, sendo encontrado na urina de primatas, porcos da Índia e peixes.

Em um experimento que comparou a estabilidade das formas ácido *L*-ascórbico, *L*-ascorbil-2-sulfato e *L*-ascorbil-2-monofosfato em rações de tilápia híbrida, encontrou-se, após a industrialização, níveis que variaram de 25,4 a 27%, 76,5 a 83,4% e 74,6 a 79% dos níveis iniciais, respectivamente (Shiau & Hsu, 1995).

O mais recente derivado do ácido ascórbico desenvolvido para ser utilizado nas rações para aquacultura são os ésteres fosfóricos (O'Keefe, 2001). Tanto o ácido *L*-ascórbico-2-monofosfato quanto o ácido *L*-ascórbico-2-polifosfato (uma mistura de ésteres mono, di e tri fosforilados) são extremamente estáveis nas condições adversas as quais são submetidas no processo de industrialização e armazenamento de rações para aquacultura (O'Keefe, 2001), não sofrendo oxidação durante a passagem pelo trato gastrintestinal até o momento da hidrólise e absorção no enterócito (Dabrowski et al., 1994).

Como no ácido *L*-ascórbico-2-sulfato, o carbono 2 da molécula do ácido *L*-ascórbico-2-monofosfato é protegido quimicamente da oxidação. Entretanto, ao invés do enxofre, o fósforo está presente (O'Keefe, 2001), como pode ser visto na Fig. 11.

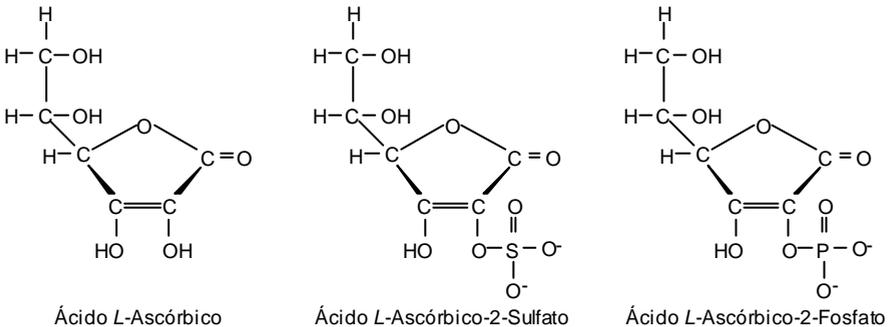


Fig. 11. Formas pura e protegidas do ácido ascórbico (Masumoto et al., 1991).

Em um experimento que comparou a estabilidade das formas ácido *L*-ascórbico, *L*-ascorbil-2-sulfato e *L*-ascorbil-2-monofosfato em rações de tilápia híbrida, encontrou-se, após a industrialização, níveis que variaram de 25,4 a 27%, 76,5 a 83,4% e 74,6 a 79% dos níveis iniciais, respectivamente (Shiau & Hsu, 1995).

Segundo Liao & Seib (1990), as vantagens da forma trifosfato sobre a monofosfato é sua síntese simplificada. A fosforilação do ácido ascórbico para obter a forma monofosfato necessita de alto pH (12-13) e alta concentração de

piridina, que precisa ser subsequenteiramente removida do produto final para seu possível uso farmacológico. A síntese da forma polifosfatada utiliza trimetafosfato e obtém uma mistura de 4 g/100 g de ácido ascórbico, 1 g/100 g da forma monofosfatada, 3 g/100 g da forma difosfatada e 86 g/100 g da forma trifosfatada.

Num experimento com objetivo de mostrar a atividade vitamínica do Na-L-ascorbil-2-monofosfato como fonte de ácido ascórbico em rações para bagre-de-canal, comparando-a com o Mg-L-ascorbil-2-monofosfato (que possui a mesma bioatividade vitamínica que o ácido L-ascórbico para esta espécie), apresentaram uma retenção de 99% e 97%, respectivamente, após o processo de extrusão (Mustin & Lovell, 1992).

Bioatividade

Para proteger qualquer nutriente instável da destruição, o procedimento adequado é estabilizar o composto lábil antes do consumo pelo animal sem que este procedimento comprometa a sua atividade biológica. A bioatividade de um micronutriente, como a vitamina C ou de um derivado físico ou quimicamente alterado, é avaliado pela sua habilidade de promover o crescimento, manter os níveis teciduais e manter outras atividades fisiológicas onde esse micronutriente é utilizado. Atualmente estão disponíveis produtos estáveis, com o ácido ascórbico encapsulado, que embora não seja resistente à muitas situações, mostrara ser boa fonte de vitamina C (O'Keefe, 2001).

Num teste de comparação da bioatividade entre as formas de ácido ascórbico pura e protegida por polímero sintético em truta arco-iris, verificou-se que elas possuem o mesmo grau de bioatividade, sendo porém a forma protegida mais estável (Skelbaek et al., 1990). Em outro experimento, com a mesma espécie, verificou-se que durante a fase inicial de alimentação a retenção do ascorbilpalmitato foi menos efetiva do que a do ácido ascórbico. Durante este período o ascorbilpalmitato também exibiu alguns efeitos negativos na taxa de crescimento. Nos estágios posteriores de desenvolvimento, o ascorbilpalmitato mostrou uma performance similar à do ácido ascórbico. Os autores concluíram que o ascorbilpalmitato suplementado em uma base equimolar ao ácido ascórbico em dietas para salmonídeos é adequado para hidroxilação normal da prolina na molécula de colágeno (Albrektsen et al., 1988).

A bioatividade da vitamina C oriunda do ácido L-ascórbico-2-sulfato possivelmente depende da presença da enzima *sulfatase* (Benitez & Halver, 1982) e o animal necessita produzir continuamente quantidades suficientes de *sulfatase* para suprir as necessidades de ácido ascórbico (O'Keefe, 2001). Semelhantemente, tanto o ácido L-ascórbico-2-monofosfato quanto o ácido L-ascórbico-2-polifosfato necessitam da atividade da enzima intestinal alcalina *fosfatase* para liberar seus grupos protetores fosfato (Matusiewicz et al., 1995; O'Keefe, 2001). Entretanto, a conversão do trifosfato para ácido ascórbico livre

mais ions fosfato é muito menos eficiente que a hidrólise que os ésteres monofosfatos. A fórmula polifosfatada possui uma eficiência intermediária pois possuem uma mistura de mono, di e trifosfatos (Dabrowski et al., 1994).

Em estudos de bioatividade da vitamina C oriunda do ácido *L*-ascórbico-2-sulfato, os resultados parecem variar de acordo com a espécie e talvez com as condições ambientais. Com base no crescimento e níveis teciduais de vitamina C, Halver et al. (1975) concluíram que o ácido *L*-ascórbico-2-sulfato possui uma atividade equivalente ao ácido ascórbico em uma base equimolar para preencher as necessidades desta vitamina em truta arco-iris. Entretanto, o de bagre-de-canal mostrou que, quando alimentado com níveis abaixo de 200 mg/kg de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato, teve um crescimento muito inferior daqueles alimentados com 50 mg/kg de ácido ascórbico. Além disso, a atividade da vitamina C no sangue e no fígado foi muito maior nos animais alimentados com ácido ascórbico do que os alimentados com ácido *L*-ascórbico-2-sulfato em uma base equimolar (Murai et al., 1978). Liu et al. (1989) encontrou pequenas quantidades de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato nos tecidos do bagre-de-canal e estas concentrações foram independentes dos níveis de ácido ascórbico contidos na dieta. Portanto, a truta arco-iris pode utilizar o ácido *L*-ascórbico-2-sulfato como um substitutivo do ácido ascórbico mais eficientemente do que o bagre-de-canal.

Sandnes et al. (1989) observaram diferenças nos níveis teciduais de vitamina C em salmão do Atlântico alimentado com ácido *L*-ascórbico-2-sulfato versus ácido ascórbico. Os resultados obtidos nos peixes, juntamente com os encontrados em outros animais, aumenta o questionamento sobre a utilização do ácido *L*-ascórbico-2-sulfato como uma fonte vantajosa de vitamina C (O'Keefe, 2001).

Em um trabalho que avaliou o efeito de diferentes formas de ácido ascórbico incorporado na dieta para juvenis de tilápia nilótica, Soliman et al. (1986a) concluíram que todas as formas de ácido ascórbico avaliadas (ácido *L*-ascórbico, sal sódico de ácido *L*-ascórbico, ácido *L*-ascórbico protegido com glicerina, sal bórico de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato e ascorbilpalmitato) preveniram a ocorrência de sinais patológicos do escorbuto e promoveram melhora no crescimento e na conversão alimentar quando comparados com o controle, cuja dieta era livre desta vitamina. Neste estudo também foi demonstrado que a tilápia nilótica possui habilidade em converter ácido *L*-ascórbico-2-sulfato em ácido *L*-ascórbico, indicando que esta espécie possui a enzima *ácido L-ascórbico-2-sulfato sulfohidrolase* (EC 3.1.6.1), responsável por esta reação. Shiau & Hsu (1995) também sugerem a presença desta enzima na tilápia híbrida, pois verificaram habilidade na conversão do ácido *L*-ascórbico-2-sulfato em ácido *L*-ascórbico e demonstraram que ambas as formas possuem a mesma atividade vitamínica. Porém, os peixes alimentados com ácido *L*-ascórbico-2-sulfato apresentaram níveis teciduais de ascorbato significativamente menores que os peixes alimentados com as outras formas de

ácido ascórbico. Soliman et al. (1986a) também concluíram que o sal sódico de ácido *L*-ascórbico, o ascorbilpalmitato e o ácido *L*-ascórbico protegido com glicerina desempenharam a função antiescorbútica tão bem quanto o ácido *L*-ascórbico, numa base eqüimolar.

Efeitos antiescorbuto largamente documentados em uma ampla gama de animais são responsáveis por se considerar os ésteres fosfóricos do ácido ascórbico como a forma de maior potencial para o uso como fonte de vitamina C (O'Keefe, 2001). Dados dos testes conduzidos por Grant et al. (1989) mostraram crescimento equivalentes em trutas arco-íris alimentados com dietas contendo 400 mg/kg de atividade vitamínica C oriunda de ácido ascórbico ou 20 mg/kg de atividade vitamínica C oriundo do ácido *L*-ascórbico-2-polifostato. Neste experimento, os peixes controle, que se alimentaram com dietas isentas de ácido ascórbico, exibiram todos os sintomas clássicos de deficiência de vitamina C. Wölker & Fenster (1994) afirmam que o ácido ascórbico-2-polifostato possui, no mínimo, a mesma bioatividade que o ácido ascórbico puro em truta arco-íris.

Em tilápia híbrida, tanto o *L*-ascorбил-2-sulfato, o *L*-ascorбил-2-monofosfato e o ácido *L*-ascórbico possuem atividade antiescorbútica similar. Porém o *L*-ascorбил-2-sulfato é menos efetivo na manutenção de altas reservas teciduais de ácido *L*-ascórbico (Shiau & Hsu, 1995). Em bagre-de-canal o Mg-*L*-ascorбил-2-monofosfato é mais eficiente que o ácido *L*-ascórbico (El Naggar & Lovell, 1991ab) e possui a mesma atividade vitamínica que o Na-*L*-ascorбил-2-monofosfato, em uma base eqüimolar de ácido ascórbico (Mustin & Lovell, 1992; Walter & Lovell, 1992), porém este último possui a vantagem da sua fabricação ser bem menos dispendiosa que a do sal de Mg (Mustin & Lovell, 1992).

Baseado em dados de crescimento com bagre-de-canal, a bioatividade da vitamina C oriunda do ácido *L*-ascórbico-2-sulfato foi estimada em quase um quarto da do ácido ascórbico em uma base eqüimolar (Murai et al., 1978). Diferentemente do ácido *L*-ascórbico-2-sulfato, tanto o ácido *L*-ascórbico-2-monofosfato quanto o ácido *L*-ascórbico-2-polifostato provaram possuir a mesma atividade do ácido ascórbico em uma base eqüimolar quando utilizados para o bagre-de-canal (Brandt et al., 1985; Robinson et al., 1989) e para a truta arco-íris (Grant et al., 1989; Matusiewicz et al., 1995). Wilson et al. (1989) verificaram que, pelas respostas de crescimento e eficiência alimentar, o bagre-de-canal pode utilizar o ácido ascórbico polifostato tão eficazmente quanto ao ácido ascórbico puro (Tabela 6).

Segundo O'Keefe (2001), a atividade aparentemente equivalente foi evidente nos valores dos níveis teciduais de ácido *L*-ascórbico e de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato nos peixes após a alimentação com dietas com suplementação de ácido ascórbico e de ácido *L*-ascórbico-2-polifostato em diferentes níveis. A atividade da vitamina C no tecido corporal dos peixes alimentados com ácido *L*-

ascórbico-2-polifosfato como fonte de vitamina C foi aproximadamente duas vezes maior do que naqueles peixes que foram alimentados com ácido L-ascórbico.

Tabela 6. Ganho de peso, eficiência alimentar e sobrevivência em alevinos de bagre-de-canal alimentados com dietas contendo diferentes fontes de ácido ascórbico.

<i>Tratamento (fonte de ácido ascórbico)</i>	<i>Ganho de peso (% do peso inicial)</i>	<i>Eficiência alimentar (g ganho de peso/ g ração consumida)</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
Isento	522 ± 90	0,47 ± 0,08	95
Protegida c/ celulose	916 ± 106	0,72 ± 0,05	100
Sulfato	970 ± 62	0,72 ± 0,02	100
Polifosfato	1.235 ± 147	0,81 ± 0,05	100

Valores expressos como média ± DP. Médias dentro das colunas com mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Fonte: adaptado de Wilson et al. (1989).

Embora os mecanismos da ação do ácido ascórbico na reprodução dos peixes ainda não estejam bem entendidos, Dabrowski et al. (1994) afirmam que o ácido ascórbico monofosfato, ao invés do ácido ascórbico puro, utilizado na dieta de reprodutores de truta arco-íris, resultou em um nível de deposição nos ovos desta vitamina significativamente superior.

Doses

As exigências por ácido ascórbico pelos peixes, como para qualquer outra vitamina, é expressa como a quantidade de atividade vitamínica necessária por kg de peso vivo por dia para atingir uma resposta fisiológica específica no organismo. Em qualquer nível de resposta, estas exigências são afetadas pelo tamanho do peixe e pelo seu estado fisiológico, como também pelas inter-relações dos nutrientes e fatores ambientais (O'Keefe, 2001).

Em geral, doses relativamente baixas de atividade vitamínica C são suficientes para um bom crescimento e conversão alimentar, os quais são as respostas desejadas na criação comercial de peixes. Entretanto, para se obter uma resposta adaptativa máxima, como a resistência a doenças e tolerância ao estresse ambiental, é necessário doses levemente maiores. As diferentes características de estabilidade das várias formas de vitamina C aumentam a dificuldade de se fornecer a quantidade adequada para o bom desenvolvimento dos peixes (O'Keefe, 2001). Dependendo do tamanho do peixe, as doses de 30 a 60 mg/kg de ração de ácido ascórbico são suficientes para promover o

crescimento e evitar o aparecimento de sinais subclínicos de deficiência desta vitamina em bagre-de-canal (Lim & Lovell, 1978; Li & Lovell, 1985).

As rações comerciais devem ter um composição tal que, quando administradas diariamente, mantenham um nível constante e adequado de vitaminas no organismo dos peixes. Assim, uma adequada formulação das dietas é essencial, devendo-se dar atenção especial para o fato de que grande quantidade das vitaminas hidrossolúveis (p. ex. vitamina C e as do complexo B) nas rações serem perdidas muito rapidamente quando em contato com a água, antes do alimento ser ingerido pelos peixes. Em geral, quanto menor for a partícula de alimento e maior o seu tempo de permanência na água, antes de ser ingerida, tanto maior será a perda de vitamina. O ácido ascórbico é particularmente sensível a estas condições e calcula-se que 50% a 70% dessa vitamina presente na ração se perca depois de um período de 10 segundos de imersão na água (Pavanelli et al., 2002).

Rações para pós-larvas são de textura muito fina, geralmente menor que 0,5 mm e estão sujeitas a excessivas perdas de nutrientes por dissolução ou lixiviação na água, principalmente as hidrossolúveis. Desta forma, as rações para pós-larvas devem apresentar adequada flutuabilidade na água, reduzindo a sua superfície de contato e, portanto, reduzindo as perdas de nutrientes por lixiviação. Além do mais, a utilização de megadoses de vitaminas é altamente recomendada para compensar eventuais perdas destes nutrientes (Kubitza, 1999).

Segundo Sato et al. (1982) as trutas arco-íris que receberam doses de vitamina C abaixo de 50 mg/kg apresentaram reduzida atividade de sintetizar o colágeno, evidenciada por uma baixa taxa de síntese. Já os peixes que receberam 100 mg/kg mostraram uma alta e constante taxa de síntese, indicando a formação do colágeno para reposição nos tecidos. Halver et al. (1969) afirmam que 50 mg/kg foi suficiente para promover o crescimento normal e o desenvolvimento ósseo no salmão prateado, entretanto a dose de 400 mg/kg foi necessária para a máxima taxa de cicatrização. Hilton et al. (1978) concluíram que 20 mg/kg de vitamina C na dieta para truta arco-íris foi suficiente para promover o crescimento normal dos peixes, porém 40 mg/kg foi necessário para prevenir os sinais típicos de deficiência. Hardy (1989) sugere uma dose de 75 mg de vitamina C/kg de ração para a engorda de truta arco-íris.

Em um experimento para determinar a bioatividade do ascorbato polifosfato como fonte de ácido ascórbico em juvenis de truta arco-íris, verificou-se que a quantidade mínima necessária de ácido ascórbico polifosfato para causar uma saturação do tecido hepático de foi de 360 mg por kg de ração, na base equimolar ao ácido ascórbico (Matusiewicz et al., 1995).

Para reprodutores de truta arco-íris é recomendado uma dosagem mínima de 820 mg/kg de ácido ascórbico monofosfato na dieta para se obter níveis

teciduais adequados e para alcançar um bom sucesso reprodutivo. (Blom & Dabrowski, 1995).

Com o objetivo de testar a influência de diferentes doses de ácido ascórbico na resistência a doenças e na produção de anticorpos em truta arco-íris, Navarre & Halver (1989) concluíram que a dose de 1.000 mg de ácido ascórbico/kg de ração promoveu uma ótima resistência a contaminação bacteriana por *Vibrio anguillarum*, tanto pela contaminação por injeção como por imersão.

Em um trabalho para avaliar o efeito de diferentes formas de ácido ascórbico na dieta em juvenis de tilápia nilótica, verificou-se que as exigências de ácido ascórbico foram satisfeitas quando qualquer uma das formas de ácido ascórbico testadas (ácido *L*-ascórbico, sal sódico de ácido *L*-ascórbico, ácido *L*-ascórbico protegido com glicerina, sal bórico de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato e ascorbilpalmitato) foram suplementadas na quantidade de 1.250 mg/kg ração (Soliman et al., 1986a), como podemos ver nas Tabelas 7 e 8. Soliman et al. (1986b) também sugerem a dose de 1.250 mg de vitamina C/kg de ração para a tilápia mossâmbica, pois proporcionou desovas com altas taxas de eclodibilidade e melhorou o desempenho das larvas. Entretanto, estes valores correspondem a quantidade vitamina C colocada na dieta, sendo equivalente ao nível de 420 mg/kg no momento da ingestão (Jauncey, 1998). Lim (1989) sugere uma dose de 200 mg de vitamina C/kg de ração para a engorda de tilápia. Jauncey (1998) cita a dose de 40-50 mg/kg para alevinos de tilápia mossâmbica e Stickney et al. (1984) recomendam a dose de 50 mg/kg para juvenis de tilápia áurea.

Tabela 7. Desempenho de larvas de tilápia nilótica após serem alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de vitamina C: IAA - isenta de ácido ascórbico; AA - ácido *L*-ascórbico; AANA - sal sódico de ácido *L*-ascórbico; AAPG - ácido *L*-ascórbico protegido com glicerina; AA2S - sal bórico de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato e AP - ascorbilpalmitato¹.

Parâmetros	IAA	AA	AANA	AAPG	AA2S	AP
Peso Méd. Inicial ²	1,19a	1,17a	1,16a	1,17a	1,19a	1,19a
Peso Méd. Final ²	6,61b	11,49a	11,92a	11,28a	10,51a	11,28a
TCE. ³	2,98b	4,07a	4,16a	4,04a	3,89a	4,02a

¹ Valores na mesma linha com mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,01$)

² Peso em gramas; ³ Taxa de Crescimento Específico (% de ganho de peso/dia).

Fonte: Adaptado de Soliman et al. (1986a).

As necessidades dietéticas de vitamina C pelos peixes parecem decrescer com a idade. Li & Lovell (1985) concluíram que a dose de 60 mg/kg de ácido ascórbico na dieta foi necessário para um crescimento normal e para o desenvolvimento ósseo em juvenis (10 g de peso) de bagre-de-canal, e a dose

de 30 mg/kg foi suficiente para peixes maiores (50 g de peso), porém 40 mg/kg foi necessário para prevenir os sinais típicos de deficiência.

Tabela 8. Concentração de AA em larvas de tilápia nilótica após serem alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de vitamina C: IAA - isenta de ácido ascórbico; AA - ácido *L*-ascórbico; AANA - sal sódico de ácido *L*-ascórbico; AAPG - ácido *L*-ascórbico protegido com glicerina; AA2S - sal bórico de ácido *L*-ascórbico-2-sulfato e AP - ascorbilpalmitato¹.

Parâmetros ²	AAF	AA	AANA	AAPG	AA2S	AP
[AA] Fígado	6,12d	51,36b	78,77a	80,00a	30,16c	79,31a
[AA] Músculo	0,00e	14,31c	16,82b	18,52a	4,10d	19,54a
[AA] Ovário	0,00e	333,51c	432,08a	440,00a	200,89d	398,08b

¹ Valores na mesma linha com mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,01$)

² [AA] - Concentração de ácido ascórbico em mg/kg.

Fonte: Adaptado de Soliman et al. (1986a).

Li et al. (1993) afirmam que alevinos de bagre-de-canal não necessitam de uma dose maior que 26 mg/kg de ração, pois esta foi suficiente para promover ótimos níveis de crescimento e eficiência alimentar. Lovell (1989) sugere uma dose de 25 mg/kg de ração para engorda de bagre-de-canal. Já Jobling (1994) propõe uma dose de 60 mg/kg de ração para esta espécie. Wilson et al. (1989) verificaram que o bagre-de-canal pode utilizar eficientemente o ácido ascórbico polifosfato e que a dose de 100 mg/kg de ração foi adequada para promover um bom ganho de peso e evita sinais de escorbuto.

Para o tambaqui, a dose de 100 mg/kg de ácido ascórbico na ração mostrou-se adequada, garantindo um bom ganho de peso e a manutenção da homeostase do organismo (Chagas & Val, 2003). Já para o pacu a dose adequada é de 139 mg/kg de vitamina C (Martins, 1995; 1998). Segundo Fracalossi et al. (1998), a dose de 25 mg/kg de vitamina C foi suficiente na prevenção da redução no crescimento e nos sinais clássicos de deficiência desta vitamina em acará-çu. Para o pintado, Fujimoto et al. (2000) observaram que a dose de 500 mg/kg de vitamina C evita a ocorrência de deformidades no sistema ósseo nos peixes.

O'Keefe (2001), baseado na combinação dos resultados experimentais e nos dados de campo, pesquisadores e indústrias de ração, recomenda os seguintes níveis de atividade de vitamina C para a ração de peixes no momento em que é consumida, como podemos ver na Tabela 9.

Segundo O'Keefe (2001), algumas companhias de suplementos vitamínicos recomendam a dose de 1.000 mg de vitamina C por kg de ração sempre que o sistema imune dos peixes for posto a prova, como ocorre nos manejos de transferência, pesagem, seleção e vacinação. A recomendação é alimentar o

peixe com este nível de suplementação por 2 a 4 semanas antes da ocorrência do estresse e por no mínimo mais duas semanas após a ocorrência do mesmo.

Tabela 9. Recomendações dos níveis de vitamina C na dieta para diferentes fases/situações de cultivo de peixes.

<i>Condições de Cultivo</i>	<i>Dose (mg de vitamina C/kg de ração)</i>
Primeira alimentação	250-500
Crescimento	75-125
Condições de estresse	150-300
Reprodutores	> 500

Fonte: Adaptado de O'Keefe (2001).

Quanto às rações comerciais atualmente vendidas no mercado nacional, os níveis utilizados para as diversas fases de crescimento e para os diferentes hábitos alimentares dos peixes podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10. Níveis de ácido ascórbico nas rações comerciais em função da fase de desenvolvimento e do hábito alimentar.

<i>Fase</i>	<i>Onívoro</i>	<i>Carnívoro</i>
	<i>Dose (mg de vitamina C*/kg de ração)</i>	
Inicial (pós-larva)	350 a 600	350 a 600
Crescimento (alevino)	200 a 350	300 a 550
Crescimento (juvenil)	200 a 350	300 a 500
Terminação (adulto)	100 a 300	200 a 500

* Segundo os fabricantes, todas as formas de vitamina C utilizadas são estabilizadas.

Considerações Finais

Os peixes têm mostrado alta sensibilidade à dietas deficientes em ácido ascórbico (vitamina C), especialmente nos estágios iniciais de crescimento. Muitos sinais, como crescimento reduzido, deformidades esqueléticas (lordose, cifose e escoliose), anemia, demora ou diminuição da cicatrização de feridas, redução do desempenho reprodutivo e diminuição da eclodibilidade têm sido encontrados em muitas espécies de peixes que consomem dietas deficientes nessa vitamina. O estado nutricional do embrião dos peixes, muito importante para o seu desenvolvimento após a fecundação, depende da transferência dos nutrientes dos reprodutores para os gametas durante a vitelogênese, inclusive o ácido ascórbico. Da mesma forma tem sido demonstrado que o desempenho reprodutivo das fêmeas diminui quando são fornecidas dietas isentas ou com baixa suplementação de ácido ascórbico na ração.

Dessa forma, fica evidente o envolvimento do ácido ascórbico em várias funções biológicas que, além do crescimento e reprodução, pode-se citar a resposta ao estresse, a resistência a doenças e a oxidação e metabolismo dos lipídios. Estas funções ocorrem normalmente quando o peixe é alimentado com um nível dietético básico de 50-100 mg/kg, enquanto que o potencial para a utilização de níveis maiores ou megadoses continua incerto.

A maioria dos estudos que utilizaram megadoses de vitamina C (> 1.000 mg/kg) compararam seus resultados com aqueles obtidos pelas dietas isentas dessa vitamina e não aos obtidos pelas dietas contendo níveis adequados. Portanto, é muito difícil estabelecer o benefício gerado pela utilização de altos níveis de suplementação de vitamina C em dietas para a aquicultura. Além disso, os mecanismos pelos quais o ácido ascórbico acelera as funções biológicas dos peixes ainda não estão completamente compreendidos. O período de alimentação com dietas ricas em vitamina C para a saturação dos níveis teciduais dessa vitamina não está estabelecido para os peixes. A suplementação de ácido ascórbico deve ser considerada como uma medida preventiva contra a disfunção biológica e não como um método curativo para doenças ou estresse. Considerações devem ser cuidadosamente realizadas pelas indústrias de ração e pelos aqüicultores no intuito de avaliar racional e economicamente a utilização de megadoses de ácido ascórbico.

A importância de suplementações adequadas para os peixes, que não são capazes de sintetizar esta vitamina, resultou no desenvolvimento de diferentes fontes de vitamina C com vários níveis de bioatividade. O ácido ascórbico na sua forma pura é bastante instável, sendo facilmente destruído por temperaturas elevadas, luz, umidade, micro elementos e lipídios oxidados. Estes fatores também contribuem para as perdas de ácido ascórbico da ração durante o processo de industrialização (peletização e extrusão) e posterior armazenamento. Existem outras formas de ácido ascórbico e a estabilidade das

mesmas tem sido testada nas rações industrializadas para peixes. As formas estabilizadas (ácido ascórbico-2-sulfato, ácido ascórbico-2-monofosfato, ácido ascórbico-2-difosfato, ácido ascórbico-2-trifosfato) são mais resistentes ao processo de industrialização e armazenamento e, portanto, são incorporadas em menores quantidades na ração, diminuindo, assim, o seu custo. O ácido ascórbico polifosfatado tem se destacado como uma alternativa satisfatória nas rações para peixes devido a sua alta biodisponibilidade, como também devido a sua estabilidade, baixa perda durante o processo de industrialização e armazenamento da ração e menor custo, quando comparado a outras formas protegidas.

A bioatividade das diferentes formas do ácido ascórbico não são tão críticas quanto ao custo por unidade de ácido ascórbico disponível na dieta após o processamento. Como estes custos são similares, as formas protegidas ou estáveis dessa vitamina são recomendadas devido as suas quantidades serem mais previsíveis e consistentes na dieta a ser consumida pelos peixes.

Finalizando, um dos objetivos desta publicação foi de fornecer uma revisão sobre a utilização do ácido ascórbico nos peixes, constituindo-se em uma fonte de referências sobre os estudos sobre a vitamina C na aquicultura. As comparações dos estudos mencionados nesta publicação são difíceis de serem realizados devido a variabilidade das condições experimentais, fato que deve ser levado em conta na interpretação deste trabalho.

Anexos

Anexo A. Relação dos nomes comuns dos peixes citados no texto e seus respectivos nomes científicos.

<i>Nome Comum</i>	<i>Nome Científico</i>
Acará-açú	<i>Astronotus ocellatus</i>
Bagre-de-canal	<i>Ictalurus punctatus</i>
Carpas chinesas	<i>Aristichthys nobilis</i> , <i>Ctenopharyngodon idella</i> , <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>
Carpa comum	<i>Cyprinus carpio</i>
Douradinho	<i>Carassius auratus</i>
Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Peixe papagaio	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
Piaçu	<i>Leporinus obtusidens</i>
Pintado	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>
Robalo híbrido	<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>
Salmão do Atlântico	<i>Salmo salar</i>
Salmão do Pacífico	<i>Oncorhynchus</i> spp.
Salmão prateado	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>
Tilápia	<i>Oreochromis</i> sp.
Tilápia áurea	<i>Oreochromis aureus</i>
Tilápia híbrida	<i>Oreochromis niloticus</i> X <i>O. aureus</i>
Tilápia mossâmbica	<i>Oreochromis mossambicus</i>
Tilápia nilótica	<i>Oreochromis niloticus</i>
Truta arco-íris	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>Salmo gairdneri</i>)
Truta-de-riacho	<i>Salvelinus fontinalis</i>

Referências Bibliográficas

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

BALDISSEROTTO, B. Digestão. In: BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. p.19-39.

BENITEZ, L. V.; HALVER, J. E. Ascorbic acid sulfate sulfohydrolase (C₂ sulfatase): the modulator of cellular levels of L ascorbic acid in rainbow trout. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.5445-5440, 1982.

BLAZER, V. S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.309-323, 1992.

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

BLOM, J. H.; DABROWSKI, K. Reproductive success of female rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.52, n.5, p.1073-1080, may, 1995.

BRANDT, T. M.; DEYOE, C. W.; SEIB, P. A. Alternative sources of vitamin C for channel catfish. **Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.47, p.55-59, 1985. (Research and development communications).

CAVICHIOLO, F.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; NATALI, M. R. M.; MOREIRA, H. L. M.; LEONARDO, J. M. L. O.; SILVA, L. C. R. Influência da vitamina C e vitamina E sobre a histologia de brânquias de larvas de tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP-ESALQ, 2001. 1 CD-ROM.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.3, p.397-402, mar. 2003.

DABROWSKI, K.; BLOM, J. H. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.108A, p.129-135, 1994.

DABROWSKI, K.; EL-FIKY, N.; KOCK, G. ; GRIGG, M.; WIESER, W. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v.91, p.317-337, 1990.

DABROWSKI, K.; HINTERLEITNER, S.; STURMBAUER, C.; EL-FIKY, N.; WIESER, W. Do carp larvae require vitamin C? **Aquaculture**, Amsterdam, v.72, p.295-306, 1988.

DABROWSKI, K.; MATUSIEWICZ, M.; BLOM, J. H. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.124, n.1-4, p.169-192, 1994.

EL NAGGAR, G. O.; LOVELL, R. T. Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentrations of ascorbic acid in channel catfish. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.22, p.201-206, 1991a.

EL NAGGAR, G. O.; LOVELL, R. T. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.121, p.1622-1626, 1991b.

FLETCHER, T. C. Dietary effects on stress and health. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.223-246. (Seminar Series, 62).

FRACALOSSO, D. M. Doenças nutricionais em peixes. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNA, 1998. p.97-122.

FRACALOSSO, D. M.; ALLEN, M. E.; NICHOLS, D. K.; OFTEDAL, O. T. Oscars, *Atrionotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.10, p.1745-1751, 1998.

FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, D. J.; GONÇALVES, E. G.; MALHEIROS, E. B. Deformidades do sistema ósseo em alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) alimentados com dietas práticas com diferentes

- níveis de ascorbil polifosfato, usado como fonte de vitamina C. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 11., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAQ/ACAq/ABCC/BMLP/MAA, 2000. CD-ROM.
- GRANT, B. F.; SEIB, P. A.; LIAO, M.-L.; CORPRON, K. E. Polyphosphorylated L-ascorbic acid: a stable form of vitamin C for aquaculture feeds. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.20, n.3, p.143-157, 1989.
- HAJJI, N.; SUGITA, H.; ISHII, S.; DEGUCHI, Y. Serum bactericidal activity of carp (*Cyprinus carpio*) under supposed stressful rearing conditions. **Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine**, v.47, p.50-54, 1990.
- HALVER, J. E. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.38, p.79-92, 1972.
- HALVER, J. E.; ASHLEY, L. M.; SMITH, R. R. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.98, p.762-771, 1969.
- HALVER, J. E.; SMITH, R. R.; TOLBERT, B. M.; BAKER, E. M. Utilization of ascorbic acid in fish. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.258, p.70-71, 1975.
- HARDIE, L. J.; FLETCHER, T. C.; SECOMBES, C. J. The effect of vitamin E in the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.87, n.1, p.1-13, 1990.
- HARDY, R. W. Practical feeding - salmon and trout. In: LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. p.185-203
- HILTON, J. W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.79, n.1-4, p.303-312, 1989.
- HILTON, J. W.; CHO, C. Y.; SLINGER, S. J. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.35, p.431-436, 1978.
- HOLFORD, P. **Vitamin C: how much is enough?** Megascorbate Therapies: Vitamin C in Medicine. v.1, n.1, 1997. 34p. (The Vitamin C Foundation)
Disponível em: < http://www.vitaminfoundation.org/mega_1_1.html > . Acesso em: 21 abr. 2003.
- ISHIBASHI, Y; KATO, K.; IDEKA, S.; MURATA, O.; NASU, T.; KUMAI, H. Effects of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v.52, p.2147-2152, 1992.

IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 278 p. (Seminar Series, 62).

JAUNCEY, K. The nutrient requirements of tilapia. In: JAUNCEY, K. **Tilapia feeds and feeding**. Stirling: Pisces Press, 1998. p.9-48.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994. 300 p. Cap.2: Nutritional requirements.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 907 p. Cap. 24: The vitamins.

KITABCHI, A. E. Ascorbic acid in steroidogenesis. **Nature**, London, v.215, p.1385-1386, 1967.

KITAMURA, S.; SUWA, T.; OHARA, S.; NAKAMURA, K. Studies of vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. I. on the ascorbic acid. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.33, p.1120-1125, 1965.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. 3. ed. rev. e ampl. Jundiaí: F. Kubitza, 1999. 123 p. il.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; DHERT, P.; DEVRESSE, B. Larval foods. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Eds.) **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p.277-320. cap.15.

LI, M. H.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v.117, n.3-4, p.303-312, 1993.

LI, Y. P.; LOVELL, R. T. Elevated Levels of Dietary Ascorbic Acid Increase Immune Responses in Channel Catfish. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.115, p.123-131, 1985.

LIAO, M.-L.; SEIB, P. A. A table form of vitamin C: *L*-ascorbate 2-triphosphate. Synthesis, isolation, and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, p.355-366, 1990.

LIM, C. Practical feeding – tilapias. In: LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 260 p.

LIM, C.; LOVELL, R. T. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.108, p.1137-1146, 1978.

LIU, P. R.; PLUMB, J. A.; GUERIN, M.; LOVELL, R.T. Effects of megadose levels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish, *Ictalurus*

punctatus in ponds. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v.7, p.191-194, 1989.

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

MAAGE, A.; WAAGBØ, R.; OLSSON, P. E.; JULSHAMN, K.; SANDNES, K. Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*Salmo salar*): 2. effects of dietary levels and immunization on the metabolism of trace elements. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amstelveen, v.8, p. 429-436, 1990.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basical medical biochemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 806 p.

MARTINS, M. L. Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.31, n.5, p.655-658, may, 1995.

MARTINS, M. L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.31, n.5, p.655-658, may, 1998.

MASUMOTO, T.; HOSOKAWA, H.; SHIMENO, S. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. In: AQUACULTURE FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, 1991, Thailand and Indonesia. **Proceedings...** Singapore: Americam Soybean Association, 1991. Editado por D. M. Akiyama, R. K. H. Tan.

MATUSIEWICZ, M.; DABROWSKI, K.; VOLKER, L.; MATUSIEWICZ, K. Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n.12, p.3055-3061, 1995.

MAYER, F. L.; MEHRLE, P. M. Interactions of toxaphene and vitamin C in channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.107, p.326-333, 1978.

McCLUSKEY, E. S. Which vertebrates make vitamin c. **Origins**, v.12, n.2, p.96-100, 1985. Disponível em: < <http://www.grisda.org/origins/12096.htm> > . Acesso em: 16 abr. 2003.

McLAREN, B. A.; KELLER, E.; O'DONNELL, D. J.; ELVEHJEM, C. A. The nutrition of rainbow trout: 1. studies of vitamin requirements. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.15, p.169-178, 1947.

MEHRLE, P.M.; HAINES, T. A.; HAMILTON, S.; LUDKE, L.; MAYER, F. L.; RIBICK, M.A. Relationship between body contaminants and bone development in east-coast striped bass. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.111, p.231-241, 1982.

MELLO, R. F. de; MOURA, M. A. M. de; VIEIRA, I.; CYRINO, J. E. P. Suplementação da dieta de alevinos de piauçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.4, p.1223-1231, out./dez., 1999.

MURAI, T.; ANDREWS, J. W.; BAUERNFEIND, J. C. Use of L ascorbic acid, ethocel coated ascorbic acid and ascorbate 2 sulfate in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.108, p.1761-1766, 1978.

MURTY, A. S. Sublethal effects of pesticides on fish. In: MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. 3.ed. Boca Raton: CRC, 1988. v.2, cap.6, p.55-100.

MUSTIN, W. G.; LOVELL, R. T. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.105, n.1, p.95-100, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Fishes**. Washington DC: National Academy of Sciences, 1993.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER: principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152 p.

O'KEEFE, T. **Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds**. 2001. Singapore: American Soybean Association - United Soybean Board, 2001. 8 p. (ASA Technical Bulletin Vol. AQ48-2001). Disponível em: < <http://www.asasea.com/technical/aq48-2001.html> > . Acesso em: 16 abr. 2003.

O'KEEFE, T.; GRANT, B. F. **Stable form of vitamin C: essentiality, stability, and bioavailability**. Singapore: American Soybean Association - United Soybean Board, 1991. 8 p. (ASA Technical Bulletin Vol. AQ29-1991). Disponível em: < <http://www.asasea.com/technical/aq29-1991.html> > . Acesso em: 16 abr. 2003.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. da C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2.ed. Maringá: EDUEM, 2002. 305 p.

ROBINSON, E. H.; BRENT, J. R.; CRABTREE, J. T. AsPP, an ascorbic acid resists oxidation in fish feed. **Feedstuffs**, Minneapolis, v.61, n.44, p.64-66, 1989.

ROSE, R. C.; CHOI, J. L. Intestinal-absorption and metabolism of ascorbic-acid in rainbow-trout. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.258, n.5, p.R1238-R1241, part 2, may, 1990.

SANDNES, K.; ULGENS, Y; BRAEKKAN, O. R.; UTNE, F. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.43, n.1-3, p.167-177, 1984.

SANDNES, K; OINES, S.; BARGARD, S.; WAAGBØ, R. Different sources of vitamin C in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEEDING AND NUTRITION IN FISH, 3., 1989, Toba. **Proceedings...** Toba: [s.n.], 1989. p.101.

SANDNES, K; WAAGBØ, R. Effects of dietary vitamin C and physical stress on head kidney and liver ascorbic acid, serum cortisol, glucose and haematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fiskeridirektoratets Skrifter**, v.4, p.41-49, 1991. (Serie Ernæring).

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

SATO, M.; KONDO, R.; YOSHINAKA, R.; IKEDA, S. Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid-deficient rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.49, p.443-446, 1983.

SATYABUDHY, A. M. A.; GRANT, B. F.; HALVER, J. E. Effects of L ascorbyl phosphates (AsPP) on growth and immunoresistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEEDING AND NUTRITION IN FISH, 3., 1989, Toba. **Proceedings...** Toba: [s.n.], 1989. p.411-426.

SEALEY, W. M.; GATLIN III, D. M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.132, p.748-755, 2002.

SECOMBES, C. J.; CHUNG, S.; JEFFRIES, A. H. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by reduction of ferricytochrome C. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v.12, p.201-206, 1988.

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

SHIAU, S.-Y.; JAN, F.-L. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.58, p.671-675, 1992.

SKELBAEK, T.; ANDERSEN, N. G.; WINNING, M.; WESTERGAARD, S. Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. **Aquaculture**, Amsterdam, v.84, n.3-4, p.335-343, 1990.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R. et al. **Principles of biochemistry: mammalian biochemistry**. 7.ed. New York: McGraw-Hill, 1983. 689 p. Cap. 22: The water-soluble vitamins.

SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture**, Amsterdam, v.59, n.3-4, p.197-208, 1986b.

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**, Amsterdam, v.52, n.1, p.1-10, 1986a.

STEDMAN Dicionário Médico. 25.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1657 p. il. Traduzido por C. L. C. de Araújo, I. R. Vanzellotti, J. I. Lemos e M. de F. Azevedo.

STICKNEY, R. R.; McGEACHIN, R. B.; LEWIS, D. H.; MARKS, J.; RIGGS, A.; SIS, R. F.; ROBINSON, E. H.; WURTS, W. Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin C. **Journal of the World Macriculture Society**, v.14, p.179-185, 1984.

STONE, I. **Vitamin C against disease: from fishes to mammals**. Megascorbate Therapies: Vitamin C in Medicine. v.1, n.1, 1997. 2p. (The Vitamin C Foudation) Disponível em: < http://www.vitamincfoundation.org/mega_1_1.html > . Acesso em: 21 abr. 2003.

TACON, A. G. J. **Ictiopatologia nutricional**: signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. Roma: FAO, 1995. 77p. Cap. Transtornos nutricionales relacionadso con las vitaminas.

TACON, A. G. J. **The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual**: 1. the essential nutrients. Brasília: FAO, 1987. 117 p. (Field Document, 2)

TACON, A. G. J. Vitamin nutrition in shrimp and fish. In: AQUACULTURE FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, 1991, Thailand and Indonesia. **Proceedings** ... Singapore: Americam Soybean Association, 1991. Editado por D. M. Akiyama e R. K. H. Tan.

THOMPSON, I.; WHITE, A.; FLETCHER, T. C.; HOULIHAN, D. F.; SECOMBES, C. J. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo*

salar) fed diets containing different amounts of vitamin C. **Aquaculture**, Amsterdam, v.114, n.1-2, p.1-18, 1993.

TOLBERT, B. M.; DOWNING, M.; CARLSON, R. W.; KNIGHT, M. K.; BAKER, E. M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbic acid sulfate. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.258, p.48-69, 1975.

TUCKER, B. W.; HALVER, J. E. Ascorbate 2 sulfate metabolism in fish. **Nutrition Reviews**, New York, v.41, n.5, p.173-179, 1984.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.143, n.2, p.123-133, 1996.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; **The effect of vitamin C on fish health**. Saint-Louis Cedex: Roche, [1998?]. 30 p. Disponível em: < <http://www.roche-vitamins.com/home/what/what-anh/what-anh-vitamins/what-anh-vitamin-c.htm> >. Acesso em: 21 abr. 2003.

VÖLKER, L.; FENSTER, R. Efficacy of ascorbyl-2-polyphosphate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.124, n.1-4, p.213-217, 1994.

WAAGBØ, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: a review. **Aquaculture and Fisheries Management**, Oxford, v.25, p.175-197, 1994.

WAAGBØ, R.; THORSEN, T.; SANDNES, K. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.80, p.301-314, 1989.

WALTER, G. M.; LOVELL, R. T. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.105, n.1, p.95-100, 1992.

WEDEMEYER, G. A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.35-72. (Seminar Series, 62).

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

WHITE, A.; FLETCHER, T. C.; SECOMBES, C. J.; HOULIHAN, D. F. The effect of different dietary levels of vitamins C and E on their tissue levels in the Atlantic salmon *Salmo salar* L. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FISH NUTRITION AND FEEDING, 4., 1991, Biarritz. **Fish nutrition in practice**:

proceedings. Paris: INRA, 1993. p.203-207. Editado por S. J. Kaushik, P. Luquet.

WILSON, R. P.; POE, W. E. Impaired collagen formation in scorbutic channel catfish. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.103, p.1359-1364, 1973.

WILSON, R. P.; POE, W. E.; ROBINSON, E. H. Evaluation of *L*-ascorbyl-2-polyphosphatase (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.81, n.2, p.129-136, 1989.

YAMAMOTO, Y.; INOUE, M. Effects of dietary ascorbic acid and dehydroascorbic acid on the acute cadmium toxicity in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.51, p.1299-1303, 1985.

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



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento***

Rua 21 de setembro, 1880 - Caixa Postal 109

CEP 79320-900 Corumbá-MS

Telefone: (67)233-2430 Fax: (67) 233-1011

<http://www.cpap.embrapa.br>

email: sac@cpap.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento