

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DE
VITAMINA C NA REPRODUÇÃO E QUALIDADE DE OVOS
E LARVAS DE TILÁPIA DO NILO**

Nilda Loiola de Almeida Franco e Sarmiento

**BELO HORIZONTE-MG
2015**

NILDA LOIOLA DE ALMEIDA FRANCO E SARMENTO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DE
VITAMINA C NA REPRODUÇÃO E QUALIDADE DE OVOS
E LARVAS DE TILÁPIA DO NILO**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutora
em Zootecnia.*

Área de Concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Belo Horizonte

2015

S246e Sarmiento, Nilda Loiola de Almeida Franco e, 1972-
Efeito da suplementação de diferentes níveis de vitamina C na
reprodução, qualidade de ovos e larvas de Tilápia do Nilo / Nilda Loiola de Almeida
Franco e Sarmiento. – 2015.
105 p.: il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária.

Inclui bibliografia

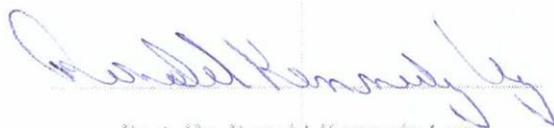
Tese 1. Tilápia (Peixe) – Alimentação e rações – Teses. 2. Vitamina C
na nutrição animal – Teses. 3. Tilápia (Peixe) – Reprodução – Teses. 4. Peixe –
Fecundidade –

Teses. 5. Sêmen – Teses. I. Luz, Ronald Kennedy. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.31

TESE defendida e aprovada em 27/02/2015 pela Comissão Examinadora

composta pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz



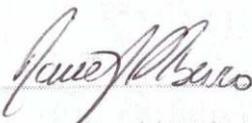
Profa. Dra. Ana Lúcia Salato



Prof. Dr. Hamilton Hisano



Prof. Dr. Nilo Buzzoli



Profa. Dra. Paulu Adriane Perez Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a ADONAI, Cientista Universal, por Quem me apaixono mais e mais cada vez que me dedico à ciência;

A Universidade Federal de Minas Gerais, pela nobre oportunidade de ampliação dos conhecimentos científicos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Um agradecimento muito especial ao Professor Doutor Ronald Kennedy Luz, meu orientador e mestre, por quem nutro uma profunda gratidão e admiração. Pela sua sabedoria, exigência e profissionalismo incomparável e pelo papel inestimável que desempenhou, me conduzindo, com uma paciência inusitada e firmeza necessária que me impulsionou a chegar até aqui;

A TODA equipe do laboratório de larvicultura, Pela partilha dos objetivos e junção das forças que se traduziu em superação das dificuldades, fazendo de cada momento um motivo para se tornarem inesquecíveis: Wallisson Souza (... como um filho, sendo assim, indescritível), Deliane Costa (ajudadora insuperável! Quantas história vivenciada!); Cristiano Mattioli (mãos laboriosas, insubstituíveis); Edelnice Martins (indispensável);

Ao LAQUA pela colaboração e ao selete LAQUA, pelos momentos preciosos de reflexão e diversão: Karen (irmãzinha de longas dadas),

Ao Alex Franco (promotor de sonhos) e aos meus por filhos Arthur, Eduardo e Bernardo por me permitirem tamanha ousadia. Para vocês o meu abraço mais forte e o meu beijo mais doce;

E, finalmente e especialmente ao meus pais, Orácio e Tina (In memoriam), uma vez que todas os motivos para agradecer são frutos da benção proferida ao deitar e ao levantar, todos os dias de suas vidas.

Obrigada!

*“... e com 2 peixinhos ELE alimentou uma multidão. ”
(João 6:9)
Seria uma tilápia?*

Aos meus pais,

*Orácio e Tina (in memoriam),
cujas orações me cobriram com a armadura de
DEUS e me fizeram chegar até aqui e me levarão
para onde está o meu sonho.*

Ofereço!

Aos meus amores:

Alex Sandro Franco de Almeida

Arthur Sarmento de Almeida

Eduardo Sarmento de Almeida

Bernardo Sarmento de Almeida,

Por quem eu vivo, por quem eu faço, a quem eu amo, a quem eu devo!

Dedico!

SUMÁRIO

		Página
	Resumo.....	14
	Abstract.....	16
1	Introdução geral.....	18
2	Referencial teórico.....	19
2.1	A tilápia do Nilo.....	19
2.2	Biologia reprodutiva da tilápia do Nilo.....	20
2.3	Nutrição dos reprodutores de tilápia do Nilo.....	21
2.4	Vitamina C e qualidade de ovos e larvas ovos.....	22
3	Referências bibliográficas.....	25
4	Objetivos	30
4.1	Objetivo geral.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
ARTIGO 1:	Efeitos da suplementação dietética de vitamina C em reprodutores machos <i>Oreochromis niloticus</i>.....	31
	Resumo.....	31
	Abstract.....	32
1	Introdução.....	33
2	Material e métodos.....	34
2.1	Material biológico, instalações e delineamento experimental.....	34
2.2	Dietas experimentais e manejos.....	34
2.3	Coleta do sêmen.....	36
2.4	Avaliação seminal.....	36
2.5	Análises das gônadas e fígado.....	37
2.6	Análise do sangue.....	37
2.7	Estatística	38
3	Resultados.....	38
4	Discussão.....	45
5	Conclusões.....	49
6	Referências bibliográficas.....	50

ARTIGO 2.	Motilidade, cinética e morfologia do sêmen de tilápia do Nilo	56
	alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.....	
	Resumo.....	56
	Abstract.....	57
1	Introdução.....	58
2	Material e métodos.....	59
3	Resultados.....	62
4	Discussão.....	66
5	Conclusões.....	68
6	Referência Bibliográfica.....	69
ARTIGO 3.	Diferentes níveis de vitamina c na reprodução de fêmeas e qualidade	
	dos ovos e larvas de tilápia do Nilo.....	74
	Resumo.....	74
	Abstract.....	76
1	Introdução.....	77
2	Material e métodos.....	78
2.1	Material biológico e instalações.....	78
2.2	Manejo experimental.....	78
2.3	Reprodução.....	79
2.4	Análise das gônadas, fígado e sangue.....	81
2.5	Testes para avaliar a qualidade das larvas nos diferentes tratamentos.....	82
2.5.1	Incubação durante o período lecitotrófico em diferentes salinidades da água.....	82
2.5.2	Teste de exposição ao ar.....	83
2.6	Estatística.....	83
3	Resultados.....	84
4	Discussão.....	93
5	Conclusões.....	97
6	Referências Bibliográfica.....	98
	Considerações Finais.....	105

LISTAS DE TABELA

ARTIGO 1: Efeitos da suplementação dietética de vitamina c em reprodutores machos *Oreochromis niloticus*

Tabela 1.	Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	35
Tabela 2.	Composição analisada da ração de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	36
Tabela 3.	Médias (\pm desvios padrão) do peso e comprimento total de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.....	39
Tabela 4.	Médias (\pm desvio padrão) da motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração espermática do sêmen de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), alimentados com diferentes níveis de Vitamina C.....	41

ARTIGO 2: Motilidade, cinética e morfologia do sêmen de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina c

Tabela 1.	Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	61
Tabela 2.	Composição da ração de reprodutores de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	61
Tabela 3.	Médias (\pm desvio padrão) da motilidade do sêmen (%) de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), alimentados com diferentes níveis de vitamina C.....	63
Tabela 4.	Médias (\pm desvio padrão) da Retilinearidade (STR), Amplitude de Deslocamento Lateral (ALH) e Batimento flagelar (BCF) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentada com diferentes níveis e Vitamina C.....	63

Tabela 5.	Médias (\pm desvio padrão) da morfologia espermática (%) sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta.....	65
-----------	---	----

ARTIGO 3. Diferentes níveis de vitamina c na reprodução de fêmeas e qualidade dos ovos e larvas de tilápia do Nilo

Tabela 1.	Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	79
Tabela 2.	Composição analisada da ração de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	80
Tabela 3.	Peso, índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS) de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.....	85
Tabela 4.	Fecundidade total (FT), fecundidade relativa (FR), diâmetro maior (DM), diâmetro menor (Dm), peso de ovos; comprimento total (CT), comprimento parcial (CP), comprimento de cabeça (CC) e comprimento do tronco (CTR) de larvas recém eclodidas de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.....	87
Tabela 5.	Variáveis sanguíneas de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, antes (45 dias) e após (76 dias) manejos reprodutivos.....	91
Tabela 6.	Sobrevivência (S) de larvas de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> incubadas em diferentes salinidades da água, ao final o período lecitotrófico (120 horas) e taxa de resistência ao estresse (R) de larvas recém-eclodidas, submetidas ao teste de exposição ao ar dos diferentes tratamentos.....	92

LISTAS DE FIGURAS

ARTIGO 1:	Efeitos da suplementação dietética de vitamina c em reprodutores machos <i>Oreochromis niloticus</i>	
Figura 1.	Índice gonadosomático (IGS) (n= 20 animais por tratamento) (Fig.a) das quatro coletas e volume do sêmen realizado na quarta coleta (n= 20 animais por tratamento) (Fig. b) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta	43
Figura 2.	Variáveis hematológicas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) (n = oito animais por tratamento) realizadas após a quarta coleta de sêmen, nos diferentes tratamentos com níveis de vitamina C. Hematócrito (Fig. a); Eritrócito (Fig. b); Leucócitos (Fig. c); Proteína plasmática (Fig. d)	44
ARTIGO 2	Motilidade, cinética e morfologia do sêmen de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina c	
Figura 1.	Cinética espermática de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta. a - VCL (velocidade da trajetória real); b - LIN (linearidade); c - VSL (velocidade da trajetória linear); d - velocidade da trajetória média (VAP)	64
ARTIGO 3	Diferentes níveis de vitamina c na reprodução de fêmeas e qualidade dos ovos e larvas de tilápia do Nilo	
Figura 1.	Taxa de eclosão (a); Produção média de ovos/fêmea (b); Produção Média de larvas/fêmea (c); sobrevivência de Larvas 120 horas após a eclosão (d)	89

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
BCF	Batimento flagelar
°C	Graus Celsius
CASA	Sistema computadorizado de análise de sêmen
CC	Comprimento de cabeça
cm	Centímetro
CP	Comprimento padrão
CSPZ	Número total de espermatozóides
CT	Comprimento total
CTR	Comprimento de tronco
dL	Decilitro
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
hpe	Horas pós exposição
IGS	Índice gonadossomático
IHS	Índice hepatossomático
Kg	Quilogramas
Kcal	Quilocalorias
L	Litros
LAQUA	Laboratório de Aquicultura da UFMG
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
mg	Miligramas
ml	Mililitros
μl	Microlitros

mm	Milímetros
q.c.	Quadrículos contados
q.t.	Quadrículos totais
R	Taxa de resistência ao estresse
RPM	Rotações por minutos
S	Sobrevivência
SPZ	Espermatozóide
STR	Retilinearidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VAP	Velocidade da trajetória média
Vit	Vitamina
VCL	Velocidade da trajetória real
VSL	Velocidade da trajetória linear
W	Massa do animal
Wf	Massa do fígado
Wg	Massa da gônada

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C NA REPRODUÇÃO E QUALIDADE DE OVOS E LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da vitamina C no desempenho, parâmetros reprodutivos e qualidade de ovos e larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidos em sistema de recirculação de água. Foram testadas quatro dietas isoproteicas e isoenergéticas, com diferentes níveis de inclusão de vitamina C (0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração) para os machos e fêmeas. Os machos foram extrusados durante quatro semanas consecutivas. Para as fêmeas, empregaram-se os mesmos níveis de vitamina C. Após 45 dias, foi realizada a reprodução durante quatro semanas. Para avaliar a qualidade das larvas, foram realizados testes de exposição ao ar de 40 e 50 minutos e de incubação das larvas durante o período lecitotrófico em diferentes salinidades (entre 0 a 6 g de sal/L). Para os machos, as variáveis espermáticas, motilidade, vigor e concentração espermática, foram maiores nos tratamentos com 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração, apresentando. O índice gonadossomático, volume de sêmen realizado na quarta coleta e proteína plasmática apresentaram relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. Não foram observadas alterações no índice hepatossomático e glicose sanguínea. O hematócrito e eritrócito apresentaram melhores valores estimados pela derivada das equações a 850 e 638 mg de vitamina C/kg de ração, respectivamente. O leucócito apresentou relação inversamente proporcional ao aumento dos níveis de vitamina C na ração. O batimento flagelar apresentou melhores resultados para os reprodutores alimentados com as dietas contendo 942 e 599 mg de vitamina C/kg de ração. Para as variáveis linearidade, velocidade da trajetória real, velocidade da trajetória linear, velocidade da trajetória média dos espermatozoides observou-se maiores valores com o maior nível de vitamina C na dieta. Para as fêmeas, os maiores índice gonadossomático, peso dos ovos e medidas das larvas no momento da eclosão foram registrados para o uso de 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. O índice hepatossomático, fecundidade total e relativa foram superiores para as fêmeas que receberam 599 mg de vitamina C/Kg de ração. Em relação ao diâmetro maior e diâmetro menor dos ovos e medidas das larvas 120 horas pós eclosão, os menores

valores foram para os que procederam das fêmeas alimentadas sem vitamina C. A taxa de eclosão, produção média de ovos por fêmea e produção média de larvas por fêmea apresentaram relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. O hematócrito, eritrócitos leucócitos e proteína plasmática total foram piores nas fêmeas que não receberam vitamina C na dieta. A glicose, após o período reprodutivo foi menor para o tratamento com 942 mg de vitamina C/kg de ração, e superior para o tratamento sem vitamina C na ração. Quando os ovos foram incubados em diferentes salinidades, a pior sobrevivência foi para o tratamento sem vitamina C ao final de 120 horas de incubação. Para o teste de exposição ao ar por 40 e 50 minutos, a resistência ao estresse das larvas recém eclodidas foi superior para as larvas provenientes de fêmeas que receberam 942, intermediário para 599 mg de vitamina C/kg de ração e inferiores para os demais tratamentos. Conclui-se que, a adição de 599 e 942 mg de vitamina C otimizou os parâmetros reprodutivos, variáveis sanguíneas dos reprodutores e qualidade dos ovos e larvas de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Sêmen, hematologia, CASA, qualidade de ovos e larvas, fecundidade

EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF DIFFERENT LEVELS OF VITAMIN C ON THE REPRODUCTION AND QUALITY OF EGGS AND LARVAE OF THE NILE TILAPIA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of vitamin C on the performance, reproductive parameters and quality of eggs and larvae of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) kept in a water recirculation system. Four isonitrogenous and isoenergetic diets with different levels of vitamin C (0, 261, 599 and 942 mg/kg of food) were tested for males and females. Males were extruded for four consecutive weeks. For females, the same levels of Vitamin C were used. After 45 days, reproduction was carried out for four weeks. In order to assess the quality of the larvae, 40 and 50 minute air exposure as well as larvae incubation tests were performed during the lecithotrophic period at different salinity levels (from 0 to 6 g salt /L). Sperm variables, motility, vigour and sperm concentration were higher in fish fed diets containing 599 and 942 mg vitamin C/kg. The gonadosomatic index, semen volume performed on the fourth collection and plasma protein showed direct relationship with the increase of vitamin C levels in the diet. No changes were observed in the hepatosomatic index and blood glucose. The hematocrit and erythrocyte showed better values estimated by the equations derivative at 850 and 638 mg vitamin C/kg of food, respectively. The leukocytes presented an inversely proportional relation to the increase of vitamin C levels in the food. Flagellar beating showed better results for breeders fed with diets containing 942 and 599 mg vitamin C/kg of food. For the variables: linearity, actual trajectory speed, linear trajectory speed, and sperm average trajectory speed, higher values were observed with the highest level of vitamin C in the diet. For females, the highest gonadosomatic indexes, egg weight and hatching larvae measures were recorded in fish fed with diets containing 599 and 942 mg vitamin C/kg of food. Hepatosomatic index, total and relative fecundity were higher for females that received 599 mg of vitamin C/kg of food. Regarding the largest diameter and smallest diameter of the eggs, and the measures of larvae 120 hours after hatching, the lowest values were observed for those

from females fed without vitamin C. The hatching rate, average egg production per female and average production of larvae per female showed direct relationship with the increase of vitamin C levels on the diet. The hematocrit, leukocytes, erythrocytes and total plasma protein were worse in females that did not receive vitamin C in the diet. Glucose, after the reproductive period, was lower for the 942 mg vitamin C/kg diet treatment, and higher with no vitamin C in the diet. When the eggs were incubated in different salinity levels, the worst survival rate was for the treatment with no vitamin C at the end of 120 hours of incubation. For the 40 and 50-minute exposure to air test, resistance to stress of newly hatched larvae was higher for larvae from females who received 942 mg vitamin C/kg of food, intermediate for the 599 mg vitamin C/kg food and lower for other treatments. In conclusion, the addition of 599 and 942 mg of vitamin C optimised the reproductive parameters, blood variables of breeders and quality of eggs and larvae of Nile tilapia.

Key words: semen quality, haematology, CASA (Computer-assisted sperm analyser), reproduction, larvae and egg quality, fecundity

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é o setor da produção animal de maior crescimento no mundo nos últimos cinco anos. Desde então, a produção de pescado no Brasil vem apresentando altas taxas de crescimento anuais. Este crescimento deve-se à percepção de que o ambiente aquático é um sistema de produção e sua utilização tem por estímulo o aumento da população e a crescente demanda por alimento.

Dentre as espécies de peixes cultivados no Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tornou-se uma das mais versáteis por reunir características como: rusticidade, rápido crescimento e adaptação ao cativeiro. Seu hábito alimentar onívoro permite a aceitação de rações artificiais e a utilização com eficiência de alimentos de origem vegetal, desde a fase de alevinos sem prejuízo ao seu desempenho (Boscolo et al., 2001).

A produção economicamente viável depende, em grande parte, de um fornecimento de alevinos de qualidade gerados por meios de reprodutores mantidos em condições de regimes nutricionais adequados. Portanto, é imprescindível que se encontrem formas de melhorar a nutrição dos reprodutores de peixes para obtenção de melhores índices reprodutivos e, com isso, aumentar a produção e oferta de alevinos de qualidade, que atualmente, é o fator limitante para o desenvolvimento da piscicultura (De Oliveira et al., 2012).

A alimentação influencia a fertilidade, por meio do fornecimento de nutrientes específicos que são necessários para a qualidade do sêmen (Mataveli et al., 2007), desenvolvimento do folículo, ovulação, maturação oocitária, fertilização e sobrevivência larval (Soliman et al., 1986). Com a intensificação do cultivo de tilápias em diversos países, inclusive no Brasil, houve um aumento na incidência de desordens nutricionais, pois nos sistemas intensivos de produção tem-se utilizado rações de qualidade, porém, com níveis vitamínicos que não estão de acordo a necessidade dos animais (Kubitza, 2000).

A vitamina C ou ácido ascórbico assume importância considerável no metabolismo animal, atuando como antioxidante, co-fator enzimático e na formação de colágeno (Smirnoff, 2000). Entretanto, a tilápia do Nilo não tem capacidade de biossintetizar esta vitamina (Lovell, 1998), sendo necessário acrescentá-la em sua dieta.

Quanto a sua essencialidade na reprodução, a vitamina C atua diminuindo a peroxidação lipídica da membrana seminal, mantendo a fluidez e auxiliando na proteção do sêmen (Sönmez et al., 2005). Exerce efeito na manutenção dos níveis de testosterona, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) o qual aumenta a espermatogênese e a concentração de sêmen (Sönmez, et al., 2005). Também protege o espermatozoide de danos genéticos e tende a evitar os defeitos congênitos (Sitios, 2001). Influencia também na qualidade de ovos e larvas, protegendo-os da ação dos radicais livres, aumentando a quantidade e qualidade de ovos viáveis e, por consequência, a sobrevivência das larvas (Lee e Dabrowski, 2004). Portanto, é necessária para o desenvolvimento de gametas de qualidade e resistentes ao estresse (Dabrowski e Moreau, 1996).

Apesar da notória influência da vitamina C sobre aspectos reprodutivos de diferentes espécies de peixes como em *Oreochromis mossambicus* (Soliman et al., 1986), *Striped jack* (Vassallo-Agius et al., 2001); *Salmo salar* (Hardie et al., 1991); e *Etheosto malepidum* (Woodhead, 1960), ainda é desconhecida a influência dessa vitamina sobre o desempenho dos reprodutores e seus efeitos em ovos e larvas de tilápia do Nilo. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis de vitamina C na reprodução e qualidades de ovos e larvas de *Oreochromis niloticus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A TILÁPIA DO NILO

O Brasil, apesar de ser o portador do maior número de espécies de peixes de água doce do mundo, tem sua piscicultura constituída, principalmente, pela criação de espécies exóticas, como as carpas e os ciclídeos da sub-família Tilapiinae. Ressalta-se que o termo tilápia é designado para três gêneros de peixes da família Cichlidae: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (Morrison et al., 2001). Entretanto, com maior representatividade produtiva, destaca-se o gênero *Oreochromis*, onde estão inclusas as espécies *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis mossambicus* (Morrison et al., 2001).

Com expressiva produtividade em todo o mundo, tilápia é cultivada em 135 países (FAO, 2014), e teve uma produção mundial em 2011 de 3.585 milhões de

toneladas, sendo os maiores produtores a China, Egito, Indonésia, Filipinas, Tailândia e o Brasil (FAO Globefish, 2013).

No cenário nacional, a produção aquícola em 2010 foi de 394.340,0 toneladas, sendo a espécie mais cultivada a tilápia com produção de 155.450,8 toneladas (MPA, 2012). Entre os pólos produtores desta espécie destacam-se o Nordeste, Noroeste Paulista e Oeste Paranaense (Sussel, 2013).

O destaque da produção de tilápia está associado à sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de criação e boa aceitação pelo consumidor (Lund e Figueira, 1989). É aquela que melhor resiste a altas temperaturas, baixa concentração de oxigênio dissolvido, alta concentração de amônia na água, condições ambientais adversas, altas densidades, tem rápido crescimento, é capaz de utilizar a produtividade primária dos viveiros e pode ser manipulada geneticamente (Popma e Lovshin, 1996). A estas características somam-se, ainda, a rusticidade e resistência a doenças e ao superpovoamento, além de oferecer disponibilidade de alevinos durante todo o ano nas regiões mais quentes do país (Boscolo et al., 2002). Possui características reprodutivas favoráveis aos programas de melhoramento genético, como alta prolificidade, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada e desova frequente (parcelada), fazendo com que o controle reprodutivo seja um dos maiores desafios na tilapicultura (Hulata et al., 1993).

Além disso, é apreciada em “pesque-pagues” e pela indústria de filetagem, graças à qualidade organoléptica e à ausência de espinhos em “Y” no seu filé (Kubitza, 2000).

2.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DA TILÁPIA DO NILO

Os machos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) estabelecem hierarquia de dominância, constroem ninho e atraem as fêmeas para acasalar (Lowe-McConnell, 1958). Gonçalves-de-Freitas e Ferreira (2004) observaram que as fêmeas acasalam com os animais dominantes. A princípio, isso pode indicar que as fêmeas reconhecem a habilidade competitiva dos machos. Porém, é possível que os machos dominantes monopolizem as fêmeas (Cotton et al., 2006).

Nessa espécie, os machos disputam intensamente os territórios e o acesso às fêmeas e têm prioridade na reprodução (Baerends e Baerends van Roon, 1950; Lowe-McConnell, 1958; Wong, 2004). Segundo Gonçalves-de-Freitas e Nishida (1998), para

atrair a fêmea, o macho dominante prepara o ninho e a genitora cuida sozinha da prole, incubando os ovos na boca.

Lund e Figueira (1989) descreveram que, em cativeiro, a tilápia pode atingir a maturidade sexual com quatro a cinco meses, 10 a 17 cm de comprimento e peso em torno de 150 a 250 gramas. Porém, trabalhos mostram tilápias com peso médio de 30 gramas aptas à reprodução (De Graaf et al., 1999). Uma fêmea pode pôr de 100 a 3000 ovócitos por vez. Em locais de clima quente reproduzem-se o ano todo, e, se a temperatura ultrapassar 24°C, o intervalo entre duas desovas consecutivas pode ser de 28 dias (Lund e Figueira, 1989).

Após a desova, a recrudescência do ovário é rápida, onde os ovócitos pré-vitelogênicos são recrutados, tornando-se maduros, pronto para serem liberados (El-Sayed, 2003). Segundo os autores, isso exige do organismo elevadas taxas metabólicas para suportar a rápida formação do ovócito, garantindo a produção de ovos e larvas de qualidade com bom desempenho produtivo. Estima-se que todo esse processo ocorra em uma semana (Coward e Bromage, 2000). Estudos têm indicado que a remoção de ovos e larvas da boca das fêmeas, em intervalo de quatro dias, acelera a vitelogênese e diminuem em 37,5% o período entre as desovas quando comparados a fêmeas que permaneciam com os ovos na boca (Tacon et al., 1996). Essas características da tilápia a torna uma espécie com potencial produtivo e, portanto, de interesse tanto para a produção, quanto para a pesquisa como modelo biológico.

2.3 NUTRIÇÃO DOS REPRODUTORES DE TILÁPIA DO NILO

O estado nutricional dos reprodutores é um dos fatores determinantes para o sucesso da reprodução de tilápia do Nilo (Castagnolli, 1992). Os ingredientes que compõem as dietas podem influenciar a fisiologia reprodutiva dos peixes, com o desenvolvimento do folículo, capacidade de ovulação, maturação oocitária, fertilidade e a sobrevivência embrionária (Gunasekera et al., 1996), além de acarretar alterações no funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução (Maggioni et al., 2008).

Estudos referentes à influência da dieta sobre o desempenho reprodutivo dos peixes permite a escolha de ingredientes que promovam um aumento no desempenho reprodutivo (Gunasekera e Lam, 1997). Embora estudos tenham sido conduzidos nessa linha para melhorar o aproveitamento do potencial da piscicultura (Luquet e Watanabe,

1986; Gunasekera et al., 1995; Gunasekera e Lam, 1997), ainda existe a necessidade de mais estudos para diferentes espécies e em diferentes sistemas de produção.

Para o sucesso da produção de alevinos, a qualidade dos ovos e o número de desovas é fator chave, pois resultarão em altas taxas de fertilização, eclosão e maior sobrevivência das larvas após a absorção do saco vitelino (Einum e Fleming, 2002). O fornecimento e utilização dos nutrientes durante o desenvolvimento inicial começam com a dieta materna, e ainda dependem da eficácia de deposição dos mesmos nos ovos (Nascimento et al., 2014).

Assim, a dieta não deve atender somente as exigências nutricionais do reprodutor para o desenvolvimento gonadal, mas também para o desenvolvimento embrionário após a desova (Masumoto et al., 1991). Apesar do fato de que os ovos absorvem alguns nutrientes diretamente da água para formação do vitelo, uma maior fonte de nutrientes é necessária para um bom desenvolvimento embrionário (El-Sayed, 2006). Para o crescimento e desenvolvimento embrionário normal de peixes, todos os componentes nutricionais necessários devem estar presentes no interior do ovócito (Nascimento et al., 2014).

É do conhecimento geral o impacto negativo de deficiências em vitaminas, minerais e ácidos graxos na eficiência reprodutiva de diversas espécies de peixes (Navarro et al., 2010). As vitaminas são necessárias em pequenas quantidades para os peixes apresentem crescimento normal, saúde e metabolismo adequado (Pezzato, 1999) promovendo o sucesso na reprodução. Sabe-se que, para o desenvolvimento de embriões de peixes, é necessária transferência de nutrientes dos reprodutores para os gametas. Segundo Soliman et al. (1986), a transferência de nutrientes como a vitamina C pode influenciar a qualidade das gônadas, a fecundidade, a qualidade de ovos, a eclosão e a sobrevivência de larvas. Um suplemento dietético de ácido ascórbico tem efeitos positivos sobre o desempenho reprodutivo em várias espécies de peixes (Rotta, 2003).

2.4 VITAMINA C E QUALIDADE DE OVOS E LARVAS

Um dos grandes desafios dos produtores é o fornecimento contínuo de ovos, larvas e alevinos/juvenis em quantidade suficiente e de boa qualidade, com altas taxas de sobrevivência, formação adequada, tamanho uniforme e bom potencial genético para favorecer o rápido crescimento (Bhujel et al., 2001).

As vitaminas são compostos orgânicos presentes em pequenas quantidades nos alimentos naturais e são essenciais para a manutenção das funções fisiológicas e sua deficiência compromete funções específicas (Lovell, 1998). A vitamina C é uma das vitaminas essenciais para os peixes; no entanto, esses animais não conseguem sintetizá-la em razão da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase que possibilita a síntese dessa vitamina a partir da glicose (Touhata et al., 1995).

O efeito positivo da vitamina C na reprodução parece estar na vitelogênese e na embriogênese (Masumoto et al., 1991) e se estende até o período da nutrição endógena (Dabrowski et al., 1994). 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 e Blom, 1994).

Soliman et al. (1986) observaram que a quantidade total de ácido ascórbico nos ovos coletados das fêmeas de tilápia mossambica (*O. mossambicus*) alimentada com dieta contendo vitamina C representou somente 47% do conteúdo ovariano de ácido ascórbico do peixe, devido, provavelmente, a transferência desta vitamina do ovário para os ovos. Esse mecanismo é importante para as larvas, pois fornece um estoque de ácido ascórbico a para ser utilizado após a eclosão, fase mais crítica para a sobrevivência das larvas (Rotta, 2003). Segundo o mesmo autor, nesta fase a vitamina C participa na formação do tecido ósseo e cartilaginoso, e é responsável pelo desenvolvimento da larva. Sua carência ocasiona deformações ósseas, hemorragia, anorexia e aumento dos efeitos negativos do estresse (Halver, 1995), além de deformações na cauda (Leibovitz et al., 1982), na cartilagem de suporte dos filamentos branquiais, como também atrofia nas fibras musculares (Fracalossi et al., 1998).

Em sistemas intensivos de produção, os peixes são constantemente expostos a agentes estressores promovendo alterações metabólicas que geram maior demanda por vitamina C (Wedemeyer, 1969). Logo tem sido recomendada a suplementação em níveis superiores ao necessário para proporcionar aos peixes desempenho normal visando maior resistência (Li e Lovell, 1985). Desta forma, o uso da vitamina C pode ser considerado uma medida preventiva contra a disfunção biológica e não como um método curativo em situações de estresse (Rotta, 2003). De acordo Cyrino (2000), tal estratégia se aplica, sobretudo, na larvicultura onde ocorre rápida depleção das reservas de vitamina C durante o desenvolvimento e metabolismo das larvas. Os mesmos autores

sugerem que as exigências dessa vitamina nos estágios larvais sejam maiores e que, níveis de exigência de vitamina C que garantam uma taxa de crescimento adequada podem ser insuficientes para reações imunológicas e resposta ao estresse ambiental. Logo, a vitamina C é um nutriente essencial para a maximização da qualidade dos ovos e lavas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAERENDS, G.P.; BAERENDS VAN ROON, J.M. An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. *Behav. Suppl.*, v.92, p.53-243, 1950.
- BHUJEL, R.; TURNER, W.A.; YAKUPITIYAGE, A.; LITTLE, D.C. Impacts of environmental manipulation on the reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Aquacult. Tropics*, v.16, n.3, 179-209, 2001.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ver. Bras. Zootecn.*, v.31, n.2, p.539-545, 2002.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; SOARES, C.M. Farinhas de peixe, carne e ossos, vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ver. Bras. Zootecn.*, v.30, n.5, p.1397-1402, 2001.
- CASTAGNOLLI, N. *Criação de peixes de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, p.18. 1992.
- COTTON, S.; SMALL, J.; POMIANKOWSKI, A. Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Curr. Biol.*, v.16, p.755-765, 2006.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, v.10, p.1- 25, 2000.
- CYRINO, J.E.P. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Agric.*, v.57, n.2, p.221-228, 2000.
- DABROWSKI, K.; MOREAU, R. Do all fish need ascorbic acid? *Aquac. Magazine*, v.22, n.5, p.96-98, 1996.
- DABROWSKI, K.; BLOM, J.H. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.108A, p.129-135, 1994.
- DABROWSKI, K.; MATUSIEWICZ, M.; BLOM, J. H. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture*, v.124, n.1-4, p.169-192, 1994.
- DE GRAAF, G.J.; GALEMONI, F.; HUISMAN, E.A. Reproductive biology of pond-reared Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.*, v.30, p.25-33, 1999.

- EINUM, S.; FLEMING, I.A. Does within-population variation in fish egg size reflect maternal influences on optimal values? *Americ. Naturalist*, v.160, n.6, p.756-765, 2002.
- EL-SAYED, A.-F.M. Effects of fermentation methods on the nutritive value of water hyacinth for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture* v.218, p.471-478, 2003.
- EL-SAYED, A.-F.M. *Tilapia Culture*. CABI Publishing, Massachusetts, USA. 2006.
- FAO GLOBEFISH, 2013. Market Report. Tilapia - June 2013. Retrieved from www.globefish.org/tilapia-june-2013.html
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. Fishery and aquaculture statistics, 2014.
- FRACALOSSO, D.M.; ALLEN, M.E.; NICHOLS, D.K.; OFTEDAL, O.T. Oscar, *Atrionotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, v.128, n.10, p.1745-1751, 1998.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; NISHIDA, S.M. Snea king behaviour of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA*, v.11, p.71-79, 1998.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; FERREIRA, A.C. Female social dominance does not establish mating priority in Nile tilapia. *Rev. Etol.*, v.6, n.1, p.33-37, 2004.
- GUNASEKERA, R. M.; SHIM, K. F.; LAM, T. J. Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, v.152, n.1, p.205-221, 1997.
- GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.146, n.2, p.121-134, 1996.
- GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, v.134, p.169-183, 1995.
- HARDIE, L. J.; T. C. FLETCHER; C. J. SECOMBES. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, v.95, n.3, p.201-214, 1991.
- HALVER, J. E. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, v.38, p.79-92, 1995.

- HULATA, G.; WOHLFARTH, G.W.; KARPLUS, I.; SCHROEDER, G.L.; HARPAZ, S.; HALEVY, A.; ROTHBARD, S.; COHEN, S.; ISRAEL, I.; KAVESSA, M. Evaluation of *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* hybrid progeny of different geographical isolates, reared under varying management regimes. *Aquaculture*, v.115, p.253-271, 1993.
- KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí. p.289, 2000.
- LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, v.230, p.377-389, 2004.
- LEIBOVITZ, H.E.; DUDLEY, D.; CULLEY, J.; GEAGHAN, P. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively cultured bullfrog larvae *Rana catesbeiana* reared at two pH levels. *J. World Maricult Soc.*, v.13, p.322-328, 1982.
- LI, Y.P.; LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in *Channel Catfish*. *J. Nutr.*, v.115, p.123-131, 1985.
- LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. 2.ed. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, p. 267, 1998.
- LOWE-MCCONNELL, M. Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). *Proceedings of the Zoological Society of London*, v.132, p.1-31, 1958.
- LUND, V. X.; FIGUEIRA, M.L.O.A. *Criação de tilápias*. São Paulo: Livraria Nobel. p.63, 1989.
- LUQUET, P.Y.; WATANABE, T. Interaction nutrition-reproduction in fish, *Fish Physiol. Biochem. Zool.*, v.2, p.121-129, 1986.
- MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; ITO, R.H.; MARQUES, J.A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R.M.; PRADO, I.N. Influência da proteína sobre a reprodução animal. *Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.2, p.105-110, 2008.
- 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: American Soybean Association. Editado por D. M. Akiyama, R. K. H. Tan. 1991.

- MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT JUNIOR, D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAKAGUTI, E.S.; TONIATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *Bol. Inst. Pesca*, v.33, p.1-7, 2007.
- MPA. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010, Brasília, DF, p.129, 2012.
- MORRISON, C.M.; MIYAKE, T.; WRIGHT, J. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.*, v.247, p.172-195, 2001.
- NASCIMENTO, T.S.R.; STÉFANI, M.V.; MALHEIROS, E.B.; KOBERSTEIN, T.C.D. High levels of dietary vitamin E improve the reproductive performance of female. *Acta Scient. Biol. Sci.*, v.36, n.1, p.19-26, 2014.
- NAVARRO, R.D.; FERREIRA, W.M.; RIBEIRO FILHO, O.P.; VELOSO, D.P.; Fontes, D.O.; Silva, R.F. Desempenho de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada com vitamina E. *Arch. Zootec.*, v.59, n.226, p.185-194, 2010.
- DE OLIVEIRA, A. M.; DE ALMEIDA VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Caracterização da atividade de piscicultura nas mesorregiões do Estado do Amazonas, Amazônia Brasileira. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.*, v.4, n.1, p.154-162, 2012.
- PEZZATO, L.E. Alimentação de peixes-relação custo e benefício. In: Reunião Anual Sociedade Brasileira de Zootecnia, 36, 1999, Porto Alegre, RS. *Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Porto Alegre: SBZ, p.109-118, 1999.
- POPMA, T.J.; LOVSHIN, L. World wide prospects for commercial production of Tilápia, International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, n.41, p. 23,1996.
- ROTTA, M. A. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelo peixes. *Embrapa Pantanal*, 2003.
- SITIOS. Protecciôn a la semilla. 2001- Disponível em: <http://www.lacuarta.cl/sitios/vas/2001/01/14/sexil.html>. Acesso em: 18/maio/2014.
- SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v.3, n.3, p.229-235, 2000.

- SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.52, p.1-10, 1986.
- SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, v.63, n.7, p.2063-2072, 2005.
- SUSSEL, F.R. Tilapicultura no Brasil e entraves na produção. Instituto de pesca do Estado de São Paulo, jun 2013. Retrieved from http://www.pesca.sp.gov.br/textos_tecnicos.php
- TACON, P.; NDIAYE, P.; CAUTY, C.; LE MENN, F.; JALABERT, F. Relationships between the expression of maternal behavior and ovarian development in the mouth brooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.146, p.261–275, 1996.
- TOUHATA, K.; TOYOHARA, H.; MITANI, T.; KINOSHITA, M.; SATOU, M.; SAKAGUCHI, M. Distribution of L-gulonolactone oxidase among fishes. *Fisheries Sci.*, v.61, n.4, p.729-730, 1995.
- VASSALLO-AGIUS, R.; IMAZUMI, H.; WATANABE, T.; YAMAZAKI, T.; SATOH, S.; KIRON, V. The Influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of *striped jack*. *Fisheries Sci.*, v.67, p.260-270, 2001.
- WEDEMEYER, G.A. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comp. Biochem Physiol.*, v.29, p.1247-1251, 1969.
- WONG, B.B.M. Superior fighters make mediocre fathers in the Pacific blue-eye fish. *Anim. Behav.*, v.67, p.583-590, 2004.
- WOODHEAD, A.D. Nutrition and reproductive capacity. *P. Nutr. Soc.*, v.19, p.23-27, 1960.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da vitamina C na dieta no desempenho reprodutivo de tilápia do Nilo e na qualidade de ovos e larvas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da vitamina C no ganho de peso, variáveis hematológicas e índices gonadossomático e hepatossomático de reprodutores (machos e fêmeas) de tilápia do Nilo;

- Analisar os efeitos da vitamina C na qualidade espermática, motilidade e velocidade do sêmen de machos de tilápia do Nilo;

- Avaliar os efeitos da vitamina C no desempenho reprodutivo e qualidade dos ovos de fêmeas de tilápia do Nilo

- Avaliar a qualidade das larvas recém eclodidas através de teste de exposição ao ar e sobrevivência em diferentes salinidades nos tratamentos com diferentes níveis de vitamina C na dieta dos reprodutores.

ARTIGO 1

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VITAMINA C EM REPRODUTORES MACHOS DE *Oreochromis niloticus*

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da vitamina C no crescimento e qualidade do sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Cento e sessenta reprodutores foram alimentados por 45 dias com dietas isoproteicas e isoenergéticas (37% de PB e 4000 Kcal de energia) com diferentes níveis de suplementação de vitamina C (0, 261, 599 e 942mg/kg de ração), totalizando 40 animais por tratamento. Após esse período, os peixes foram medidos e extrusados por quatro semanas consecutivas. Os maiores valores de peso, ao final do experimento, foram registrados para as dietas contendo 599 (166 g) e 942 (175 g) mg de vitamina C/kg de ração. O maior comprimento foi verificado para os peixes alimentados com 942 mg de vitamina C (24,1 cm). Quanto às variáveis espermiáticas, motilidade, vigor e concentração espermiática, foram maiores nos tratamentos com 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração, apresentando valores médios de 90, 6,7 e 3,7, respectivamente. Para o índice gonadossomático, volume de sêmen realizado na quarta coleta e proteína plasmática foram verificadas relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. Não foram observadas alterações no índice hepatossomático e glicose sanguínea. O hematócrito e eritrócito apresentaram melhores valores estimados pela derivada das equações a 850 e 638 mg de vitamina C/kg de ração, respectivamente. O leucócito apresentou relação inversamente proporcional ao aumento dos níveis de vitamina C na ração. Para machos de tilápia mantidos em condições intensivas de criação e manejo, níveis de vitamina C entre 599 e 942 mg podem ser utilizados para melhor desempenho e qualidade do sêmen.

Palavras-chave: Sêmen, hematologia, desempenho, vitamina C.

EFFECTS OF VITAMIN C SUPPLEMENT ON THE DIET OF *Oreochromis niloticus* MALES

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of vitamin C on semen quality and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish. One hundred and sixty fish were fed for 45 days with isoenergetic and isoproteic diets (37% CP and 4000 Kcal of energy) with different supplemental dietary levels of vitamin C (0, 261, 599 and 942mg/kg diet), totalling 40 animals per treatment. After this period, the fish was measured and extruded for four consecutive weeks. At the end of the experiment, fish with diets containing 599 (166 g) and 942 (175g) mg of vitamin C/kg presented the heaviest weights. Fish fed with 942 mg of vitamin C were largest in length (24.1 cm). As for sperm variables, motility, vigour and sperm concentration were higher in the 599 and 942 mg vitamin C/kg diet, with average values of 90, 6.7 and 3.7, respectively. For the gonadosomatic index, semen volume from the fourth collection and plasma protein were directly related to the vitamin C increase in the diet. No changes were observed in the hepatosomatic index and blood glucose. The hematocrit and erythrocyte showed better values estimated by the equations derivative at 850 and 638 mg vitamin C/kg of food, respectively. The leukocytes were inversely proportional to increased levels of vitamin C in the food. For males kept on intensive rearing and handling conditions, vitamin C levels between 599 and 942 mg can be used for better semen quality and performance.

Key words: Semen, hematology, performance, vitamin C.

1. INTRODUÇÃO

A produção de pescado pela aquicultura tem aumentado nos últimos anos, principalmente para atender à demanda crescente do mercado consumidor (Bosma e Verdegem, 2011). As tilápia *Oreochromis* sp., estão entre as espécies mais cultivadas do mundo, sendo o segundo grupo de peixes de maior importância na aquicultura mundial (FAO, 2012). Este fato se deve aos elevados índices produtivos que estão atrelados a características intrínsecas da espécie, como alta taxa de crescimento, facilidade de adaptação a diversas condições de criação, tolerância a flutuações nos parâmetros físicos e químicos da água, tornando-se aptos a reproduzir-se em ambientes com diferentes características limnológicas (Righettiet al., 2011), além de ciclos reprodutivos curtos e resistência a doenças (Coward e Bromage, 2000).

O desenvolvimento e a intensificação da criação são dependentes do sucesso no controle e manipulação de algumas funções fisiológicas e, dentre elas, a reprodução. Estudos nutricionais vêm sendo realizados na reprodução de peixes para melhorar as características reprodutivas (Izquierdo et al., 2001; Gunasekera et al., 1995; Gunasekera e Lam, 1997; Bombardelli et al., 2010). As características nutricionais das dietas podem afetar diretamente o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de acarretar alterações no funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução (Maggioni et al., 2008). Estudos demonstram que a deficiência vitamínica influencia negativamente na eficiência reprodutiva de peixes, sendo que o suplemento dietético de ácido ascórbico pode ter efeitos positivos sobre o desempenho reprodutivo (Wang et al., 2002; Lee e Dabrowski, 2004). A vitamina C é essencial para a síntese, desenvolvimento e manutenção do sêmen normal, reduzindo as aglutinações dos espermatozoides (Chinoyet al., 1986), aumentando a motilidade e reduzindo a infertilidade nos machos (Aguiar et al., 2005). Para Sönmez et al. (2005) e Ciereszko e Dabrowski (2000), dietas sem a suplementação de vitamina C resultam na diminuição da concentração espermática, motilidade espermática progressiva e de fertilização. Os estudos de nutrição dos reprodutores são limitados e relativamente caros devido à necessidade de instalações de grandes dimensões para manter grandes grupos de peixes adultos e aos custos de produção elevados para conduzir experimentos de alimentação prolongada. No entanto, é imprescindível o aprimoramento do avanço tecnológico na

nutrição e na alimentação para o desenvolvimento reprodutivo dos peixes, a fim de garantir a excelência na maior produção dos gametas.

Assim, com o presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação dietética de vitamina C no desempenho e qualidade do sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO, INSTALAÇÕES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de Minas Gerais (LAQUA) por um período de 75 dias e tiveram seus procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo CEUA 396/2012).

Foram alocados em um delineamento em blocos casualizado 160 machos de tilápia, microchipados, com peso médio de 45 g (biomassa inicial de $1,8 \pm 0,04$ kg de peixe) em quatro tanques de 1000L (volume útil de 800 L), com densidade de 40 peixes/tratamento, sendo cada animal considerado uma repetição. Cada tanque possuía um sistema individual de recirculação de água composto por filtro mecânico e biológico e aeração suplementar. O fotoperíodo foi controlado, com 10 horas de luz e 14 horas de escuro.

Diariamente foram monitorados a temperatura da água, pH e condutividade elétrica por meio de aparelho portátil da Yellow Spring Incorporation modelo 6920V2 cujo valores médios foram $27,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $7,8 \pm 0,3$ e 190 ± 20 $\mu\text{S/cm}$, respectivamente. A amônia foi mensurada diariamente utilizando-se Kit comercial Alcon Amônia e permaneceu com valores inferiores a 0,1 mg/L. O oxigênio dissolvido foi de $6,5 \pm 0,5$ mg e foi mensurado com o oxímetro Hanna HI 9146.

Os tanques eram sifonados pela manhã e à tarde antes do arraçoamento, havendo uma troca de aproximadamente 30% do total da água para remoção de fezes.

2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E MANEJOS

Os tratamentos experimentais consistiram em quatro dietas isoenergéticas e isoproteicas, com 37% de proteína bruta (Gunesequera et al., 1995) com diferentes níveis de suplementação de vitamina C na dieta: 0, 300, 600 e 900 mg/kg de ração (Níveis calculados) (Tabela 1). Como fonte de vitamina C foi utilizado ascorbil monofosfatado (35% do princípio ativo). Para confecção das dietas, os ingredientes foram moídos, pesados, homogeneizados e posteriormente extrusados. Realizou-se análise da composição bromatológica das dietas e dos ingredientes (Silva e Queiroz, 2002) e quantificou-se a vitamina C por meio de HPLC (cromatográfica líquida de alta eficiência), o que correspondeu a níveis analisados de vitamina C de 0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração (Tabela 2).

A alimentação consistiu no fornecimento de ração extrusada, sete dias na semana, na proporção de 2% da biomassa total de cada tanque dividida em duas vezes ao dia às 8:00 e 16:00h. A cada semana foram realizadas biometrias para ajuste da ração a ser ofertada. O fotoperíodo foi mantido em 10 horas de luz, 14 de escuro.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingrediente	Quantidade (%)
Farelo de soja	40,000
Quirela de arroz	16,723
Glúten de milho 60%	13,432
Farelo de trigo	12,000
Farinha de vísceras de aves	10,000
Fosfato bicálcio	2,4163
DL-metionina	0,0400
L-Lisina	0,5000
² Complexo mineral e vitamínico	0,500
³ BHT	0,015
Sal comum	0,500
Inerte + vit. C	3,873

¹Valores expressos em 100% de matéria seca. ²Complexo mineral e vitamínico (mg/kg ou UI/kg premix): Ácido fólico : 2500; Ácido pantotênico: 3750; BHT: 2500; Biotina: 125; Zinco: 20; Cobre: 2000; Colina: 125; Ferro: 15; Iodo: 125; Vit K₃: 1000; Manganês: 3700; Niacina: 7800; Selênio: 75; Vit A: 2000.000; Vit E: 15000; Vit B₁:

2500; Vit B₁₂: 5000 mg/kg; Vit B₂: 2500 ; Vit B₆: 2000; Vit D₃: 500.000; Etoxiqum : 2500.³Butilhidroxitolueno.

Tabela 2. Composição analisada da ração de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

	Tratamentos (mg de vitamina C/kg de ração)			
	0	300	600	900
Proteína Bruta (%)	37,10	37,58	37,14	37,73
Energia Bruta (kcal/kg)	4000,04	3900,93	3900,85	3900,73
Vitamina C analisada (mg/kg)	0	261	599	942

2.3 COLETA DO SÊMEN

A primeira coleta de sêmen ocorreu após 45 dias de alimentação. Foram realizadas quatro coletas, com intervalo de uma semana. Em cada coleta, foram utilizados todos os animais de cada tanque. Porém, a cada coleta que se seguiu, houve um decréscimo de cinco animais, os quais foram sacrificados para a análise do índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS), antes da extrusão. Para as coletas do sêmen, após jejum de 12 horas, cada peixe foi retirado do tanque com puçá e enrolado em uma toalha úmida. Em seguida, a região genital e a nadadeira anal foram enxutas com toalha de papel e realizada a extrusão, comprimindo-se a região abdominal no sentido céfalo-caudal. O sêmen foi coletado com pipeta e depositado em ependorff de 2 ml, devidamente identificado para a avaliação seminal.

2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL

Imediatamente após a coleta, foram determinados: motilidade espermática progressiva (0-100%) e vigor espermático (0-5). Para a concentração espermática (n. espermatozoides/mL), o sêmen foi acondicionado em temperatura de aproximadamente 12 °C para posterior avaliação. Para as avaliações foram adotados os procedimentos de Sørensen Jr. (1979), adaptados para peixes (Mataveli et al., 2007), descritos como segue:

Concentração espermática: Utilizou-se uma amostra de 5µL de sêmen, que foi diluída em 5.000 µL de formol salina tamponado (Streit Junior et al., 2004), resultando na diluição de 1:1000. Com o material diluído, realizou-se a contagem de células espermáticas presentes em dez campos da câmara hematimétrica de Neubauer. A

concentração espermática foi calculada de forma semelhante ao recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução animal (1998) para mamíferos, segundo a equação:

$$CSPZ \text{ (SPZ/mL)} = \left(\frac{\sum spz}{10q.c} \right) \times \frac{25 q.t. \times \text{diluição} \times 1000}{\text{profundidade da câmara (mm)}} \text{ em que:}$$

SPZ = espermatozoides; CSPZ = número total de espermatozoides contados; q.c. = quadrículas contadas; q.t. = quadrículas totais; profundidade da câmara = 0,10 mm e diluição = fator de diluição do sêmen pelo fixador.

Motilidade espermática progressiva e vigor espermático: Realizou-se a diluição de 5 µL de sêmen em 10 µL de água destilada e, deste diluído, foi colocada uma gota (0,03 µL - pipeta de Shalli) entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio de contraste de fase em aumento de 400x e avaliadas, subjetivamente, ambas as variáveis. Para a motilidade espermática progressiva foi utilizado um escore de 0 a 100% e para vigor espermático um escore de 0 a 5 pontos.

Na última coleta realizada, foi aferido também o volume do sêmen coletado individualmente em eppendorf graduado.

2.5 ANÁLISES DAS GÔNADAS E FÍGADO

A cada semana, cinco peixes de cada tratamento, os quais não foram submetidos à extrusão, foram eutanasiados em solução de eugenol 285 mg/L. Foram realizadas biometrias dos animais, peso das gônadas e fígados. Com estes dados foram determinados o índice gonadossomático (IGS) para cada animal, a partir da expressão $IGS = 100(W_G/W)$, na qual W representa a massa total do animal e W_G representa a massa da gônada, e índice hepatossomático a partir da expressão $IHS = 100(W_f/W)$ na qual W representa a massa total do animal e W_f representa a massa do fígado.

2.6 ANÁLISE DO SANGUE

No dia posterior a quarta coleta de sêmen, realizou-se a coleta de sangue. Para tal, oito animais de cada tratamento, foram contidos utilizando-se pano úmido. A coleta foi realizada por punção cardíaca. Foram coletados cerca de 500 µL de sangue, utilizando heparina sódica (0,1 - 0,2 % mg/mL de sangue) como anticoagulante. Destas amostras foram determinados valores de hematócrito por meio de microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971). O sangue foi centrifugado durante 10 min. a 10000 rpm. A glicose sanguínea foi determinada por meio do glicosímetro digital Accu-Chec Active Roche Diagnosis®. Para a mensuração da proteína plasmática empregou-se

refratômetro óptico Goldenberg. A contagem total de leucócitos e eritrócitos foi realizada manualmente, utilizando solução Natt-Herrick, em hemocitômetro.

2.7 ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Variáveis de sangue, volume de sêmen e IGS foram submetidos a análise de regressão para definição do melhor modelo a ser utilizado. As variáveis glicose sanguínea, IHS, peso e comprimento foram submetidas a ANOVA de duas vias e posterior teste de Tukey a 5%. A motilidade, vigor espermático e concentração espermática foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Na tabela 3 estão apresentados os dados de peso e comprimento total de machos de tilápia, nos diferentes tratamentos, durante as quatro coletas de sêmen. Dentro de cada coleta, tanto para peso, quanto comprimento não houve diferença significativa nas três primeiras coletas. No entanto, na quarta coleta ($p < 0,05$) o melhor peso foi para os tratamentos de 599 e 942mg de vitamina C/kg de ração, sendo superior ao tratamento sem inclusão de vitamina C. Para o comprimento, os maiores valores foram para o tratamento de 942 mg de vitamina C, seguido pelos demais tratamentos, os quais não apresentaram diferenças entre si. Dentro de cada tratamento, entre coletas, apesar do manuseio semanal, os peixes de maneira geral continuaram a apresentar crescimento em peso e comprimento.

Tabela 3. Médias (\pm desvios padrão) do peso e comprimento total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.

Coletas	Níveis calculados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				Número de animais/tratamento
	0	261	599	942	
Peso (g)					
1	70,0 \pm 71,7 ^{Ac}	71,5 \pm 19,5 ^{Ad}	73,3 \pm 20,8 ^{Ac}	72,9 \pm 23,0 ^{Ad}	40
2	81,1 \pm 19,7 ^{Ac}	87,4 \pm 23,9 ^{Ac}	85,1 \pm 29,9 ^{Ac}	89,9 \pm 27,4 ^{Ac}	35
3	108,0 \pm 29,9 ^{Ab}	107,3 \pm 27,2 ^{Ab}	121,6 \pm 34,1 ^{Ab}	126,7 \pm 33,9 ^{Ab}	30
4	131,1 \pm 39,8 ^{Ca}	142,0 \pm 35,1 ^{Ba}	166,2 \pm 43,3 ^{Aba}	175,0 \pm 46,6 ^{Aa}	25
Comprimento total (cm)					
1	15,7 \pm 1,4 ^{Ad}	15,8 \pm 1,4 ^{Ad}	15,5 \pm 1,8 ^{Ad}	15,9 \pm 1,9 ^{Ac}	40
2	16,8 \pm 1,4 ^{Ac}	16,8 \pm 1,7 ^{Ac}	16,8 \pm 1,6 ^{Ac}	17,4 \pm 1,7 ^{Ab}	35
3	18,3 \pm 1,2 ^{Ab}	18,5 \pm 1,3 ^{Ab}	18,2 \pm 1,3 ^{Ab}	18,0 \pm 1,7 ^{Ab}	30
4	20,2 \pm 1,5 ^{Ba}	20,2 \pm 1,5 ^{Ba}	21,2 \pm 2,2 ^{Ba}	24,1 \pm 2,0 ^{Aa}	25

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na tabela 4 estão apresentados os dados de motilidade, vigor, concentração espermática, índice hepatossomático e glicose sanguínea de machos de tilápia nos diferentes tratamentos. Dentro de cada tratamento, nas quatro coletas, a motilidade se manteve constante, entretanto ocorreram variações conforme cada tratamento ($p < 0,05$), apresentando motilidade inferior o tratamento sem a inclusão da vitamina C e superiores tratamentos com 599 e 942mg de vitamina C/kg de ração. O vigor espermático se manteve constante entre as coletas para os tratamentos 0 e 261 mg de vitamina C/kg de ração ($p > 0,05$). Entre as coletas, na primeira, o vigor espermático foi semelhante entre todos os tratamentos ($p > 0,05$). Na segunda, terceira e quarta coleta, o vigor foi maior ($p < 0,05$) para os tratamentos com 599 e 942mg de vitamina C/kg de ração. Para a concentração espermática, nos tratamentos 0, 261, e 599mg de vitamina C/kg de ração, não foi verificado diferença entre as coletas ($p > 0,05$). Porém, para 942mg de vitamina c/kg de ração a maiores concentrações foram registradas na segunda e quarta coleta ($p < 0,05$). Nas diferentes coletas, de maneira geral, os menores valores de vigor espermático foram para o tratamento sem vitamina C, com valores intermediários para o nível de 261mg de vitamina C/kg de ração e superiores e semelhantes entre si para 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração.

Não foi verificada influência da vitamina C na glicose sanguínea e no IHS (Tabela 4).

Tabela 4. Médias (\pm desvio padrão) da motilidade espermática progressiva, vigor espermático e concentração espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentados com diferentes níveis de Vitamina C.

Coletas	Níveis calculados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				Número de animais
	0	261	599	942	
Motilidade espermática progressiva (%)					
1	60,0 \pm 21,5 ^{Ca}	74,1 \pm 11,3 ^{Ba}	88,0 \pm 12,0 ^{Aa}	91,7 \pm 9,3 ^{Aa}	35
2	58,0 \pm 23,0 ^{Ca}	77,4 \pm 15,0 ^{Ba}	82,7 \pm 16,0 ^{ABa}	89,7 \pm 12,0 ^{Aa}	30
3	55,3 \pm 21,7 ^{Ca}	72,6 \pm 15,2 ^{Ba}	84,2 \pm 15,6 ^{Aa}	93,3 \pm 13,2 ^{Aa}	25
4	60,0 \pm 23,3 ^{Ca}	74,0 \pm 14,1 ^{Ba}	89,2 \pm 12,5 ^{Aa}	90,8 \pm 11,8 ^{Aa}	20
Vigor espermático (0 – 5 pontos)					
1	2,2 \pm 0,8 ^{Aa}	2,5 \pm 0,6 ^{Aa}	2,7 \pm 1,2 ^{Ab}	2,5 \pm 1,4 ^{Ab}	35
2	2,0 \pm 0,8 ^{Ba}	2,6 \pm 1,4 ^{Ab}	3,8 \pm 1,2 ^{Aa}	3,7 \pm 1,4 ^{Aa}	30
3	2,2 \pm 1,4 ^{Ba}	2,5 \pm 0,8 ^{Ba}	2,7 \pm 1,5 ^{Aab}	4,4 \pm 0,9 ^{Aa}	25
4	1,9 \pm 1,0 ^{Ba}	2,0 \pm 1,4 ^{Ba}	3,3 \pm 1,5 ^{Aa}	3,4 \pm 1,7 ^{Aa}	20
Concentração espermática (espermatozoides/mL x 10⁶)					
1	2,5 \pm 1,6 ^{Ca}	2,6 \pm 1,9 ^{Ba}	3,3 \pm 2,0 ^{Aa}	3,3 \pm 2,2 ^{Ab}	35
2	2,6 \pm 1,6 ^{Ba}	2,6 \pm 2,4 ^{Ba}	4,0 \pm 2,2 ^{Aa}	3,8 \pm 2,0 ^{Aa}	30
3	2,2 \pm 1,0 ^{Ca}	2,7 \pm 2,0 ^{Ba}	3,9 \pm 2,4 ^{Aa}	3,3 \pm 1,6 ^{Aab}	25
4	2,2 \pm 1,2 ^{Ca}	2,4 \pm 1,9 ^{Ba}	3,9 \pm 2,2 ^{Aa}	3,5 \pm 2,5 ^{Aa}	20
*Índice hepatossômico					
1	1,3 \pm 0,5 ^{Aa}	0,9 \pm 0,2 ^{Aa}	1,1 \pm 0,4 ^{Aa}	1,5 \pm 0,4 ^{Aa}	5
2	1,2 \pm 0,7 ^{Aa}	0,8 \pm 0,1 ^{Aa}	1,2 \pm 0,5 ^{Aa}	1,4 \pm 0,5 ^{Aa}	5
3	1,1 \pm 1,9 ^{Aa}	0,9 \pm 0,8 ^{Aa}	1,2 \pm 0,8 ^{Aa}	1,3 \pm 0,5 ^{Aa}	5
4	1,1 \pm 0,9 ^{Aa}	0,7 \pm 0,1 ^{Aa}	1,2 \pm 0,4 ^{Aa}	1,3 \pm 0,6 ^{Aa}	5
*Glicose(mg/dL)					
Após a coleta 4	52,9 \pm 16,2 ^A	44,6 \pm 10,8 ^A	54 \pm 9,6 ^A	50,9 \pm 7,0 ^A	8

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Para o IGS (Figura 1a) foi verificada relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. O volume de sêmen realizado na quarta coleta, após três semanas de coleta consecutivas, também apresentou relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta (Figura 1b).

As variáveis hematológicas estão apresentadas na Figura 2. O hematócrito (Figura 2a) e eritrócito (Figura 2b) apresentaram resposta quadrática com ponto de inflexão nas concentrações de 850 e 638 mg de vitamina C/kg de ração, respectivamente. O leucócito apresentou relação inversamente proporcional ao aumento dos níveis de vitamina C na ração (Figura 2c), enquanto a proteína plasmática total apresentou relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta (Figura 2d).

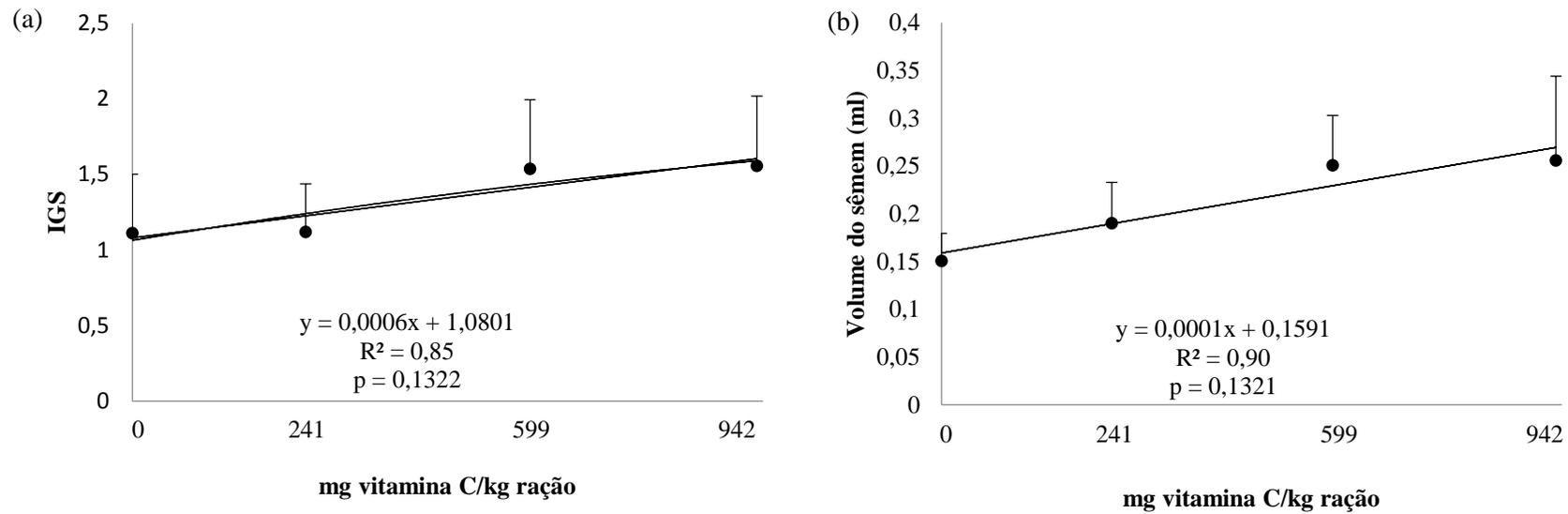


Figura 1. Índice gonadosomático (IGS) (n= 20 animais por tratamento) (Fig.a) das quatro coletas e volume do sêmen realizado na quarta coleta (n= 20 animais por tratamento) (Fig. b) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta

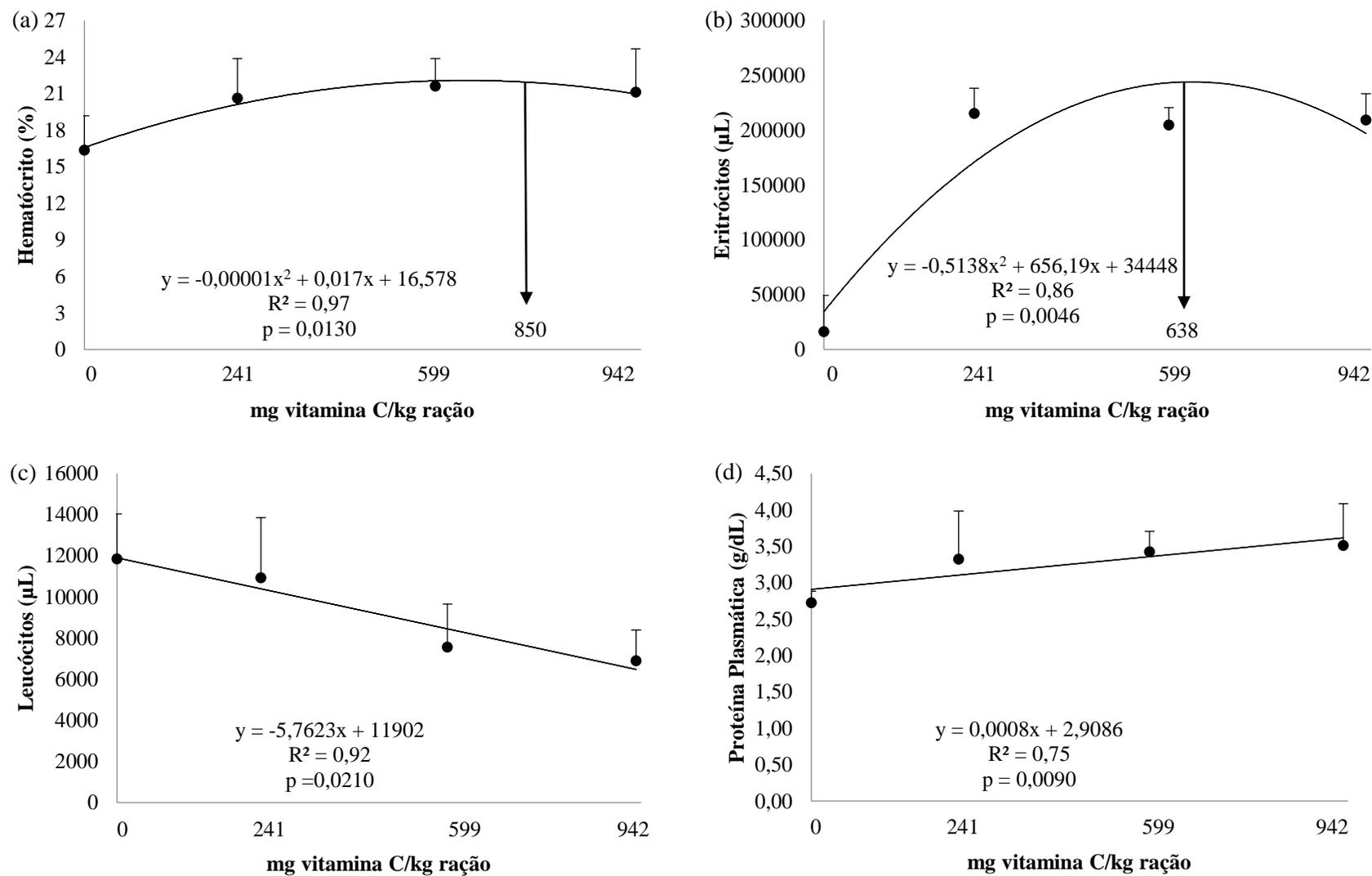


Figura 2. Variáveis hematológicas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (n = oito animais por tratamento) realizadas após a quarta coleta de sêmen, nos diferentes tratamentos com níveis de vitamina C. Hematócrito (Fig. a); Eritrócito (Fig. b); Leucócitos (Fig. c); Proteína plasmática (Fig. d).

4. DISCUSSÃO

Independente do nível de vitamina C na dieta e dos manejos semanais de biometria e extrusão, os reprodutores continuaram a apresentar crescimento, fato que corrobora a rusticidade desta espécie. As maiores diferenças apareceram somente na quarta coleta com melhores valores de desempenho dos animais para os maiores níveis de vitamina C na dieta, sugerindo melhor adaptação aos manejos. Este fato pode ser explicado, uma vez que a vitamina C influencia diretamente no crescimento dos peixes, atuando como coenzima na formação do colágeno, e reduzindo o estresse, por meio da moderação na produção de corticosteroides (Barnes, 1975; Nsonga et al., 2009). Os menores pesos observados nos peixes alimentados sem a inclusão de vitamina C na dieta pode estar relacionado ao sinergismo do estresse agudo e deficiência dessa vitamina (Wedemeyer, 1997), aumentando aos danos a membrana celular por meio da peroxidação lipídica (Alvarez e Moraes, 2006). Efeito positivo da vitamina C no desempenho de tilápias já foi verificado na larvicultura, com melhor ganho de peso para os peixes alimentados com dietas contendo 859,5 mg de vitamina C/ Kg de ração (Toyama et al., 2000). Para juvenis resultados satisfatórios foram observados com os peixes alimentados com dietas contendo 125 mg de vitamina C/100g da dieta (Soliman et al., 1986). Ainda, segundo Soliman et al. (1986), a deficiência em ácido ascórbico deprime a absorção de iodo pela tireoide com aumento da concentração plasmática deste mineral, sugerindo a hipo atividade tireoidiana, podendo assim, o menor crescimento ser atribuído à redução dos níveis plasmáticos de hormônios tireoidianos reguladores do crescimento.

O nível de vitamina C teve influência direta na motilidade, vigor e concentração espermática de machos nos diferentes tratamentos, com melhores valores para os peixes alimentados com 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. Esses resultados discordam com os registrados por Mataveli et al. (2007) utilizando tilápias de 300g de peso alimentadas com até 261 mg de vitamina C/kg de ração, onde estes não sofreram influência na qualidade espermática. Mataveli et al. (2010) verificaram que a concentração, vigor e volume do sêmen de tilápias, pesando $301,46 \pm 80,93$ g, alimentadas com dietas suplementadas com 0, 75, 150 e 225 mg de vitamina C/kg de ração também não foram influenciados pela suplementação da vitamina. Uma possível

explicação para as diferenças entre a literatura e os resultados do presente estudo pode ser a faixa de peso dos animais como sugerido em outros trabalhos (Gjerd, 1984; Suquet et al., 1992; Cacot et al., 2003; Viveiros et al., 2003). Quanto à motilidade espermática, Mataveli et al. (2010) verificaram relação direta com adição de vitamina C. Estes resultados sugerem que baixos níveis de vitamina C podem melhorar a motilidade do sêmen, e que comparados com o do presente estudo mostram a necessidade de maiores níveis desta vitamina para melhor motilidade do sêmen. Ciereszko e Dabrowski (1995), trabalhando com truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), confirmaram que a deficiência de vitamina C reduz a motilidade e concentração espermática e, conseqüentemente, a fertilidade. Com relação à concentração espermática, Sönmez et al. (2005) sugeriram que o aumento desta pode ser explicado pela estimulação da gametogênese por meios dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Karanth et al. (2001), afirmaram que a vitamina C possui um efeito na estimulação das gonadotrofinas por meio da ação do óxido nítrico na hipófise, que ativa enzima guanilato-ciclase, gerando monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ativando a proteína quinase C, tendo como consequência a exocitose de FSH e LH. Esse mesmo mecanismo pode estar sendo utilizado pelos reprodutores alimentados com as dietas contendo as maiores concentrações de vitamina C (599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração).

Segundo Dawson et al. (1987) a vitamina C tem a propriedade de reduzir a aglutinação dos espermatozoides e é necessária para o desenvolvimento de gametas de qualidade e resistentes ao estresse. Porém, apesar de melhorar com o aumento da vitamina C, quando verificado dentro de cada tratamento, após os manejos e extrusões consecutivas no presente estudo, as variáveis analisadas foram semelhantes à da primeira coleta. Sabe-se que uma dieta sem suplementação de vitamina C promove graves danos aos tecidos reprodutivos, bem como uma diminuição na concentração e motilidade espermática (Chinoy et al., 1986; Dawson et al., 1992), como registrado no presente estudo. Este fato se deve a que a vitamina C é considerada excelente antioxidante, capaz de sequestrar os radicais livres com grande eficiência, promovendo a proteção contra a alta produção de oxigênios reativos e a prevenção de danos celulares aferida pela ação de antioxidantes encontrados nos espermatozoides ou no plasma seminal (Guerra et al., 2004), confirmando assim, a importância dessa vitamina na qualidade do sêmen de tilápia.

O volume de sêmen coletado após três semanas consecutivas de extrusão, na quarta coleta, apresentou relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta e variou de 0,15 a 0,25 mL. Mataveli et al. (2007) e Mataveli et al. (2010) não observaram a influência da vitamina C no volume de sêmen de tilápias do Nilo, empregando até 300 mg de vitamina C na ração utilizando reprodutores com peso médio de 301,46 g. A produção seminal é influenciada por diversos fatores, como o método de coleta a partir da extrusão, o que não garante a liberação do volume total de sêmen presente nas gônadas (Ferreira et al., 2001) e o tamanho do indivíduo (Luz et al., 2001), o que, possivelmente justifica a diferença entre esses resultados. O volume de sêmen do presente estudo foi inferior ao encontrado por Mataveli et al. (2007), que encontraram 1mL em tilápias de 300g e Bombardelli et al. (2010), que encontraram valores de 0,4 mL para a mesma espécie com peso 146,06 g. O aumento do volume de sêmen pode assegurar maior possibilidade de fertilização dos ovócitos, embora isto também esteja relacionado com o número de células (Billard et al., 1995). Em tilápias, Linhart et al. (1999) observaram um acréscimo na concentração espermática, inversamente proporcional ao volume. Pesquisas relacionadas com a nutrição dos reprodutores de tilápia demonstram que a qualidade espermática é influenciada pela composição da dieta, como energia (Bombardelli et al., 2010), proteína (Gunasekera et al., 1995) e vitamina E (Nascimento et al., 2014). Resultados semelhantes também são relatados para mamíferos (Yousef, 2005; Salem et al., 2001; Dawson et al., 1992) e humanos (Dawson et. al., 1990) quanto a utilização de vitamina C.

Para o IGS também foi verificada relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta, o que pode ser explicado pela função antioxidante que esta vitamina exerce sobre as células espermátogênicas. Esta resposta do IGS também pode estar diretamente relacionada ao volume de sêmen produzido pelas tilápias, nos diferentes tratamentos, como apresentado anteriormente. De acordo França e Russell (1998), o peso das gônadas está diretamente relacionado com a produção espermática e, assim sendo, quanto maior a gônada, maior a produção de espermatozoides. Isto também sugere alterações morfológicas em resposta às rações, como por exemplo, maior atividade dos órgãos reprodutivos como verificado por Bombardelli et al. (2010), o que é bastante compreensível, uma vez que estes se encontravam em plena atividade reprodutiva.

Os resultados para IHS foram semelhantes entre os tratamentos e estão de acordo com os resultados encontrados por Navarro et al. (2010), onde a vitamina C não teve influência para reprodutores de tilápia sobre esta variável.

O hematócrito e eritrócito apresentaram melhores valores estimados pela derivada das equações a 850 e 638mg de vitamina C/kg de ração, respectivamente. Barros et al. (2002) registraram aumento no hematócrito e eritrócitos em dietas de alevinos de tilápia suplementadas com 125; 375 e 1115 mg de vitamina C/kg de ração. O menor hematócrito na ausência de suplementação de vitamina C e/ou na deficiência desta vitamina também foi verificada em bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (Andrews e Murai, 1975). Além disso, Adham et al. (2000) e Barros et al. (2002) demonstraram que dietas deficientes em vitamina C causam anemia em peixes, caracterizadas por uma redução do hematócrito e do número de eritrócitos. Quanto à proteína plasmática total, valores médios de referência para tilápias saudáveis foram obtidos por Hrubec et al. (2000) em tilápias híbridas (*O. niloticus* x híbrido entre *O. mossambicus* x *O. aureus*), por Chen et al. (2003) em tilápias do Nilo e por Mauel et al. (2007) em tilápias híbridas (*O. aureus* x *O. niloticus*) com médias de 3,0 a 7,7 g/dL. Esse fato mostra que no presente estudo, os animais alimentados com vitamina C (valores entre 3,33 a 3,51 g/dL) estavam saudáveis, apesar das condições de manejo intensivo. Estes dados corroboram a melhora no desempenho e na qualidade do sêmen na presença de níveis superiores a 599 mg de vitamina C na dieta.

O leucócito apresentou relação inversamente proporcional ao aumento dos níveis de vitamina C na ração. De acordo com Chagas et al. (2012), em início de estresse, elevado número de leucócitos pode ser observado na maioria das espécies de peixes. Essa leucocitose foi registrada no presente estudo à medida que diminuiu o nível de vitamina C na dieta, o que pode ser uma tentativa de recuperação do equilíbrio fisiológico, reafirmando a importância desta vitamina em contrapor aos efeitos do estresse.

A glicose não apresentou diferenças entre os tratamentos indicando que os animais não estavam sobre efeito do estresse que acarretaria no aumento da glicogenólise no fígado, promovendo maiores níveis sanguíneos de glicose (Morgan e Iwama, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Wells e Pankhurst, 1999). Resultados semelhantes quanto a concentração de glicose foi observada por Hrubec et al. (2000) (52,0 mg/dL) e Martins et al. (2008) (54,2 mg/dL), para tilápias em condições estressantes. Mariano et al. (2011) relataram que, embora a concentração de glicose se

eleve logo após o início do período estressante, os níveis são passageiros, e podem não se manter altos por muito tempo.

5. CONCLUSÕES

A suplementação de dieta de reprodutores de tilápia do Nilo ao nível de 599 mg/Kg de ração influenciou positivamente na qualidade do sêmen, além de proporcionar melhor ganho de peso e alterar positivamente as variáveis hematológicas, proteína plasmáticas, eritrócito e hematócrito.

Reprodutores machos de tilápia devem ser alimentados com níveis superiores a 599 mg de vitamina C/kg de ração em condições de manejos intensivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHAM, K.G.; HASHEM, H.O.; ABU-SHABANA; M.B.; KAMEL, A.H. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquacult. Nutr.*, v.6, p.129-139, 2000.
- AGUIAR, D.H.; BARROS, M.M.; PADOVANI, C.R.; PEZZATO, L.E.; DAL, P.S.M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J. Fish Biol.*, v.67, p.1287-1298, 2005.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. EFEITOS DA SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE O SÊMEN. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v.1, n.1, 2006.
- ANDREWS, J.W.; MURAI, T. Studies on vitamin C requirements of channel catfish. *J. Nutr.*, v.105, p.557-561, 1975.
- BARNES, M. J. Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.258, n.1, p.264-277, 1975.
- BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEE M.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de vitamina C e ferro em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootecn.*, v.31, n.6, p.2149-2156, 2002.
- BOSMA, R.H; VERDEGEM, M.C.J. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livest. Sci.*, v. 39, p.58-68, 2011.
- BOMBARDELLI, R.; HAYASHI, C.; NATALI, M. R.M.; SANCHES, E.A.; PIANA, P.A. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.39, n.5, p.941-949, 2010.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R.J. (Ed.). *Brood stock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science*, p.25-52, 1995.
- CACOT, P.; EECKHOUTTE, P.; MUON, D.T.; TRIEU, N.V.; LEGENDRE, M.; MARIOJOLS, C.; LAZARD, J. Induced spermiation and milt management in *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880). *Aquaculture*, v.215, p.67-77, 2003.

- CHAGAS, E.C.L.D.; ARAÚJO, C.H.; BOIJINK, L.A.;INOUE, L.C.; GOMES, F. E.; MORAES, R. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com β -glucano. *Biotemas*, v.25, p.221-227, 2012.
- CHEN, C.Y.; WOOSTER, G.A.; GETCHELL, R.G.; BOWSER, P.R.; TIMMONS, M.B. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, v.218, p.89-102, 2003.
- CHINOY, N.J.; MEHTA, R.R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J.D.; CHINOY, M.R. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *Int. J. Fertil.*, v.31, n.3, p.232-239, 1986.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol. Reprod.*, v.52, n.5, p.982-988, 1995.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Effect of ascorbic acid supplement in vitro on Rainbow trout sperm viability. *Aquacult. Int.*, v.8, n.1, p.1-8, 2000.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, p.49, 1998.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R. Reproductive physiology of female tilapia brood stock. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, v.10, p.1-12, 2000.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C.; PWELL, L.C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. *Fertil. Steril.*, v.58, n.5, p.1034-1039, 1992.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; POWELL, L.C. Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Rev. Nutr. Diet.*, v.62, p.1-26, 1990.
- DAWSON, E. B.; HARRIS, W. A.; RANKIN, W.E.; CHARPENTIER, L.A.; MCGANITY, W.J. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann. NY. Acad. Sci.*, v.498, n.1, p.312-323, 1987.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, 2012.
- FERREIRA, C.E.L.; GONÇALVES, J.E.A.; COUTINHO, R. Community structure of fishes and habitat complexity on a tropical rocky shore. *Environ. Biol. Fish.*, v.61, p.353-369, 2001.

- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F. (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219, 1998.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, v.29, p.7- 2. 2000.
- GJERD, B. Variation in semen production of farmed atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, v 40, p.109-114, 1984.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the micro hematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.56, p.35-39, 1971.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.28, n.4, p.187-195, 2004.
- GUNASEKERA, R.M.; LAM, T.J. Influence of protein level on ovarian recrudescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, v.149, p.57-69, 1997.
- GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, v.134, p.169-183, 1995.
- IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALÁCIO, H.; TACON, A.G.J. Effect of brood stock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, v.197, p.25-42, 2001.
- KARANTH, S.; WEN, H.Y.; WALCZEWSKA, A.; MASTRONARDI, C.A.; MCCANN, S.M. Ascorbic acid stimulates gonadotropin release by autocrine action by means of NO. *P. Natl. A. Sci.*, v.98, n.20, p.11783-11788, 2001.
- LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, v.230, p.377-389, 2004.
- LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi (*Steindachneridion scripta*). *Bol. Inst. Pesca*, v.27, n.1, p.39-42, 2001.
- MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; ITO, R.H.; MARQUES, J.A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R.M.; PRADO, I.N. Influência da proteína sobre a reprodução animal. *Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.2, p.105-110, 2008.

- MARIANO, W.S.; SORIA, S.F.P.; GARCIA, R.G.; FÉLIX, M.Z.; LOPES, F.; TOLEDO, J.R.S. Metabolismo e fisiologia de tuvira, *Gymnotus carapo* (LINNAEUS, 1758) submetidos à exposição ao ar atmosférico. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v.15, n.1, p.9-18, 2011.
- MARTINS, M.L.; MIYAZAKY, D.M.Y.; MORAES, F.R.; GHIRALDELI, L.; ADAMANTE, W.B.; MOURINO, J.L.P. Ração suplementada com vitaminas C e E influência a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciênc. Rural*, v.38, p.213-218, 2008.
- MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT JUNIOR, D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAKAGUTI, E.S.; TONIATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *Bol. Inst. Pesca*, v.33, p.1-7, 2007.
- MATAVELI, M.R.; MORAES, V.G.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; GASPARINO, E. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.32, p.345-349, 2010.
- MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.; MERRILL, A.L. Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. *J. Zoo Wildlife Med.*, v.38, p.420-424, 2007.
- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 247-270. 1997.
- NAVARRO, R.D.; RIBEIRO FILHO, O.P.; BOTION, L.M.; PEREIRA, F.K.S.; SILVA, R.F.; MACIEL, T.E.F. Desempenho de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada com vitamina C. *Arch. zootec.*, v.59, n.228, p.589-596, 2010.
- NASCIMENTO, T.S.R.; STÉFANI, M.V.; MALHEIROS, E.B.; KOBERSTEIN, T.C.D. High levels of dietary vitamin E improve the reproductive performance of female. *Biol. Sci.*, v.36, n.1, p.19-26. 2014.
- NSONGA, A.R.; KANG'OMBE, J.; MFITILODZE, W.; SOKO, C.K.; MTETHIWA, A.H. Effect of varying levels of dietary vitamin C (ascorbic acid) on growth,

- survival and hematology of juvenile tilapia, *Oreochromis karongae*. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, v.13, n.2, p.17-23, 2009.
- RIGHETTI, J.S.; FURUYA, W.M.; CONEJERO, C.I.; GRACIANO, T.S.; VIDAL, L.V.O.; MICHELLATO, M. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-Nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. *Ver. Bras. Zootecn.*, v.40, p.469-476, 2011.
- SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I.; HASSAN, G.A.; EL-NOUITY, F.D. Protective role ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sub lethal doses of aflatoxin B1. *Toxicol.*, v.162, n.3, p.209-218, 2001.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análises de alimentos* (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p.235. 2002.
- SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.52, p.1-10, 1986.
- SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, v.63, n.7, p.2063-2072, 2005.
- STREIT JUNIOR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, v.7, n.2, p.157-162, 2004.
- SUQUET, M.; OMNES, H.; NORMAND, Y.; FAUVEL, C. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of female on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus*. L. *Aquaculture and Fishery Management*, v.23, p.217-225, 1992.
- TOYAMA, G.N.; CORRENTE, J. E.; CYRINO, J.E.P. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. *Sci. Agri.*, v.57, n.2, p.221-228, 2000.
- VIVEIROS, A.T.M.; JATZKOWSKI, A.; KOMEN, J. Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, v.59 n.9, p.1905-1917, 2003.
- WANG, X.; KIM, K.; BAÍ, S.C. Effects of different dietary levels of L- ascorbyl -2- polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, v.33, p.261-267, 2002.

- WELLS, R.M.G.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *J. World Aquacult. Soc.*, v.30, p.276-284, 1999.
- WEDEMEYER, G.A. Effect 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. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 35-71. 1997.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, v.77, p.591-625, 1997.
- YOUSEF, M.I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. *Toxicology*, v.207, n.1, p.81-89, 2005.

ARTIGO 2

MOTILIDADE, CINÉTICA E MORFOLOGIA DO SÊMEN DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da suplementação dietética de vitamina C na motilidade espermática e nas variáveis cinéticas e morfológicas do sêmen de *Oreochromis niloticus*. Reprodutores foram alimentados com quatro dietas contendo diferentes níveis de vitamina C (0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração). Após 100 dias de alimentação, foram coletados os sêmens de 10 animais de cada tratamento para as análises de motilidade, morfologia por meio do sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Os animais alimentados com as dietas contendo 942 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram maior motilidade espermática ($P < 0,05$). Quanto ao valor de batimento flagelar, os melhores resultados foram para os reprodutores alimentados com as dietas contendo 942 e 599 mg de vitamina C/kg de ração, não diferindo entre si. Os níveis de suplementação dietética de vitamina C não provocaram diferenças estatísticas na morfologia espermática e nos valores de amplitude de deslocamento lateral e retilinearidade. Para as variáveis linearidade, velocidade da trajetória real, velocidade da trajetória linear, velocidade da trajetória média dos espermatozoides observou-se maiores valores com o maior nível de vitamina C na dieta. Desta forma, recomenda-se a suplementação de 942 mg de vitamina C em dietas de reprodutores de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, vitamina C, CASA (Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen), qualidade do sêmen.

MOTILITY, KINETICS, AND MORPHOLOGY OF SEMEN FROM NILE TILAPIA FED WITH DIFFERENT LEVELS OF VITAMIN C

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of supplemental dietary vitamin C on the motility, kinetics, and morphology of semen from *Oreochromis niloticus*. Broodfish were fed four diets containing different levels of vitamin C (0, 261, 599, and 942 mg/kg diet). After 100 days of feeding, the semen of 10 animals from each treatment was collected for motility and kinetics analysis, by a computer-assisted analysis system (CASA), as well as to morphology analysis. Animals fed the diet containing 942 mg vitamin C/kg diet had higher sperm motility ($p < 0.05$). Higher values of beat cross frequency were observed in broodfish fed diets containing 942 and 599 mg vitamin C/kg, without significant differences. For linearity, curvilinear velocity, straight line velocity, and average path velocity, higher values were detected with the highest level being in the highest dietary level of vitamin C. The different supplementary dietary levels of vitamin C did not cause significant differences in straightness, lateral head displacement, and sperm morphology. Thus, a supplement of 942 mg vitamin C/kg is recommended to be added to the diet of Nile tilapia broodfish.

Key words: *Oreochromis niloticus*, vitamin C, CASA (computer-assisted sperm analyser), sperm quality.

1. INTRODUÇÃO

Alterações morfológicas dos espermatozoides podem ter influência direta na fertilidade do reprodutor (Toniolli, 1999; Rurangwa et al., 2004) e tais alterações podem atingir as estruturas das células espermáticas, como cabeça, peça intermediária e cauda (Mies-Filho, 1987; Batista et al., 2011). Para peixes ainda não há padrão de classificação de anormalidades espermáticas e sua relação com a fertilidade do reprodutor. Todavia, alguns autores vêm buscando classificar as anormalidades espermáticas de peixes (Herman et al., 1994; Mataveli et al., 2007).

Outra forma de se avaliar a qualidade do sêmen em peixes é através de métodos subjetivos (Viveiros et al., 2010) pela avaliação visual das células sob microscopia óptica. Contudo, estes métodos têm levantado dúvidas referentes à sua validação, pois dependem de critérios subjetivos e da prática do avaliador, apresentando variações dos valores obtidos (Davis e Katz, 1993).

Como alternativa, diferentes sistemas de análise assistida por computador têm sido empregados e apresentando níveis de precisão e confiança (Kime et al., 2001), possibilitando uma análise objetiva. O Sistema computadorizado de análise de sêmen (método CASA) é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar e digitalizar imagens sucessivas, processando e fornecendo informações precisas sobre a cinemática de células individuais e resumos estatísticos da população espermática analisada (Amann e Katz, 2004). Segundo Sanches et al. (2010), o CASA apresenta resultados confiáveis tornando sua utilização eficiente e precisa na avaliação da qualidade de sêmen de peixes. Desta forma, análises de sêmen em sistemas computadorizados vêm sendo cada vez mais utilizados e podem contribuir de forma positiva para a padronização, entendimento e avaliação da qualidade seminal como verificado para jundiá (*Rhamdia quelen*) (Sanches et al., 2010), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ingermann et al., 2010), surubim-do-iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) (Bombardelli et al., 2011), peixe zebra (*Danio rerio*) (Ingermann et al., 2011), “fathead minnow” (*Pimephales promelas*) (Murack et al., 2011) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Gennotte et al., 2012). A avaliação computadorizada da motilidade espermática também pode auxiliar na seleção de reprodutores, possibilitando assim, a redução dos custos na piscicultura (Ravinder et al., 1997; Rurangwa et al.,

1998; Rurangwa et al., 2001). Além disso, a utilização de softwares indica parâmetros que visualmente não são observados (Kime et al., 2001) como movimentos progressivos, ou não-progressivos, velocidade espermática, linearidade, retilinearidade, oscilação, progressão e frequência de batimentos (Ravinder et al., 1997; Rurangwa et al., 2001; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007).

Entre os nutrientes importantes para a reprodução de machos está a vitamina C. Segundo Lerner (1998), esta vitamina tem a propriedade de reduzir a aglutinação dos espermatozoides, promovendo o aumento da motilidade e, por consequente, a otimização da fertilidade dos machos. Além disso, esta vitamina protege os espermatozoides de danos, como a peroxidação lipídica da membrana (Martínez-Páramo et al., 2012).

Objetivou-se com este estudo avaliar a motilidade, cinética e morfologia de espermatozoides de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes níveis de vitamina C na ração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquacultura da Universidade Federal de Minas Gerais (LAQUA) por um período de 100 dias e tiveram seus procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo CEUA 396/2012).

Foram utilizados 160 machos de tilápia, com peso médio de 45 g, estocados em quatro tanques de 1000 L, volume útil de 800 L, com densidade de 40 animais por tanque em um sistema individual de recirculação de água e aeração suplementar. Cada tanque recebeu biomassa inicial de $1,8 \pm 0,04$ kg de peixe ($n= 40$ animais por tanque). Os tratamentos experimentais consistiram em quatro dietas isoenergéticas e isoproteicas, com 37% de proteína bruta (Gunesequera et al., 1995) com diferentes níveis de suplementação de vitamina C na dieta: 0, 300, 600 e 900 mg/kg de ração (Níveis calculados) (Tabela 1). Como fonte de vitamina C foi utilizado ascorbil monofosfatado (35% do princípio ativo). Para confecção das dietas, os ingredientes foram moídos, pesados, homogeneizados e, posteriormente, extrusados. Realizou-se análise da composição bromatológica das dietas (Silva e Queiroz, 2002) e quantificou-se a vitamina C por meio de HPLC (cromatográfica líquida de alta eficiência), o que

correspondeu a níveis analisados de vitamina C de 0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração (Tabela 2).

A alimentação consistiu no fornecimento de ração sete dias na semana, na proporção de 2% da biomassa total de cada tanque dividida em duas vezes ao dia às 8:00 e 16:00h. A cada semana foram realizadas biometrias para ajuste da ração a ser ofertada. O fotoperíodo foi mantido em 10 horas de luz, 14 de escuro.

Diariamente foram monitorados a temperatura da água, pH e condutividade elétrica por meio de aparelho portátil da Yellow Spring Incorporation modelo 6920 V2, apresentando valores de $27,9\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $7,8\pm 0,3$ e 190 ± 20 $\mu\text{S/cm}$, respectivamente. A amônia foi mensurada utilizando-se Kit comercial Alcon Amônia e permaneceu com valores inferiores a 0,1 mg/L. O oxigênio dissolvido foi de $6,5\pm 0,5$ mg/L e foi mensurado com o oxímetro Hanna HI 9146.

Após tomada dos dados de qualidade de água, os tanques foram sifonados pela manhã e à tarde antes do arraçoamento, com troca de aproximadamente 30% do total da água para remoção de fezes e eventuais sobras de ração.

Após 100 dias de alimentação, o sêmen foi coletado de 10 animais de cada tratamento, sendo cada animal considerado uma réplica. Previamente a coleta do sêmen, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. Após contenção individual, a papila urogenital foi cuidadosamente seca e realizou-se pressão abdominal no sentido céfalo-caudal, evitando possíveis contaminações do sêmen com água, sangue, urina, fezes e muco. O sêmen foi coletado e depositado em tubos de polipropileno de 1,5 ml, devidamente identificado e mantido refrigerado a $4-6^{\circ}\text{C}$ em, em caixa de isopor contendo gelo em escama.

A análise da morfologia espermática foi realizada através da confecção de esfregaços do sêmen, após fixação em formol salina tamponada, sendo então corados com rosa bengala, segundo metodologia descrita por Streit Junior et al. (2004). Após secagem do esfregado o mesmo foi avaliado em microscópio de contraste de fase acoplado a uma câmera de captura de imagem da linha INFINITY 1, Sensor CMOS, padrão C-mount, com opções colorida ou monocromática, utilizando o software Infinity Analyze para captura e correções de imagens, Infinity 1-1C/M: 1.3Mpixel (1280 x 1024) mono/color. Foram avaliados cem espermatozoides de cada animal e classificados em normais ou anormais, As anormalidades foram classificadas em patologias primárias e secundárias de acordo com Herman et al. (1994).

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingrediente	Quantidade (%)
Farelo de soja	40,000
Quirela de arroz	16,723
Glúten de milho 60%	13,432
Farelo de trigo	12,000
Farinha de vísceras de aves	10,000
Fosfato bicálcio	2,4163
DL-metionina	0,0400
L-Lisina	0,5000
² Complexo mineral e vitamínico	0,500
³ BHT	0,015
Sal comum	0,500
Inerte + vit. C	3,873

¹Valores expressos em 100% de matéria seca. ²Complexo mineral e vitamínico (mg/kg ou UI/kg premix): Ácido fólico : 2500; Ácido pantotênico: 3750; BHT: 2500; Biotina: 125; Zinco: 20; Cobre: 2000; Colina: 125; Ferro: 15; Iodo: 125; Vit K3: 1000; Manganês: 3700; Niacina: 7800; Selênio: 75; Vit A: 2000.000; Vit E: 15000; Vit B₁: 2500; Vit B₁₂: 5000 mg/kg; Vit B₂: 2500 ; Vit B₆: 2000; Vit D₃: 500.000; Etoxiqum : 2500. ³Butilhidroxitolueno.

Tabela 2. Composição da ração de reprodutores de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

	Tratamentos (mg de vitamina C/kg de ração)			
	0	300	600	900
Proteína Bruta (%)	37,10	37,58	37,14	37,73
Energia Bruta (kcal/kg)	4000,04	3900,93	3900,85	3900,73
Vitamina C analisada (mg/kg)	0	261	599	942

Para a análise da motilidade e cinética do sêmen, as amostras refrigeradas foram transportadas para o Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Sêmen localizado na Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo–MG, Brasil. O tempo decorrido entre as coletas e início das análises foi de três horas. Para a análise pelo método CASA, o aparelho

utilizado foi o *Sperm Class Analyzer* (SCA[®] v.4.0) e os parâmetros para calibração do sistema (setup) foram: área de partícula de 40 microns²; VCL: 10 < SLOW < 25 < MEDIUM < 45 < RAPID; Progressividade: > 25% STR; Circular: < 80% LIN; Pontos para o VAP: 5; Conectividade: 14 field; 10 amostras, com um intervalo entre imagens de 5 segundos. Para a análise de cada amostra foi utilizado 1 µL de sêmen e 5 µL de água destilada como solução ativadora, diretamente depositado em lâmina previamente aquecida a 27°C e coberta por lamínula (24x24 mm) em microscópio trilocular previamente focado na objetiva 40x. Para a análise de cada amostra foram capturados cinco campos homogêneos, com um mínimo de 500 células espermáticas em cada campo. Seguindo metodologia proposta por Farrell et al. (1998) foram utilizados, para as ponderações sobre a eficácia da vitamina C, os parâmetros cinéticos do CASA: batimento flagelar (BCF), linearidade (LIN), velocidade da trajetória real (VCL), velocidade da trajetória linear (VSL), velocidade da trajetória média (VAP), da retilinearidade (STR) e amplitude de deslocamento lateral (ALH).

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov para as variáveis respostas. Posteriormente, foi feita ANOVA, seguido pela análise de regressão para se determinar o melhor modelo a ser utilizado. As variáveis BCF, STR e ALH foram submetidas posterior teste de Tukey a 5% de probabilidade. Variáveis que não apresentaram normalidade dos dados foram analisadas através do Teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

3. RESULTADOS

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 3, observa-se que os animais do tratamento com 942 mg vitamina C/kg de ração apresentaram maior motilidade (P<0,05) em relação dos demais grupos, os quais não diferiram entre si.

Variáveis de cinética espermática estão apresentadas na figura 1 e tabela 4. Para a VCL (Figura 1a) e LIN (Figura 1b) foi verificada relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. A VSL (Figura 1c) e VAP (Figura 1d) apresentaram resposta quadrática com valores mínimos estimados pela derivada das equações a 300 e 281 mg de vitamina c/kg de ração, respectivamente. A vitamina C não influenciou o

comportamento da STR e ALH (Tabela 4). Para o BCF resultados foram intermediários para 599 e superiores para 942 mg de vitamina C na ração.

Os dados da morfologia espermática são apresentados na Tabela 5, não sendo verificadas diferenças significativas pela adição de vitamina C na ração.

Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) da motilidade do sêmen (%) de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentados com diferentes níveis de vitamina C.

Níveis calculados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				N por tratamento
0	261	599	942	
22,3 \pm 19,4 ^b	21,8 \pm 15,5 ^b	33,9 \pm 11,0 ^b	54,9 \pm 8,9 ^a	10

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Tabela 4. Médias (\pm desvio padrão) da Retilinearidade (STR), Amplitude de Deslocamento Lateral (ALH) e Batimento flagelar (BCF) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com diferentes níveis e Vitamina C

Níveis calculados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				Número Anim./trat.
0	261	599	942	
STR (%)				
71,4 \pm 15,7 ^a	71,6 \pm 9,6 ^a	73,5 \pm 12,8 ^a	82,5 \pm 5,8 ^a	10
ALH (mm/s)				
1,5 \pm 0,3 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	1,4 \pm 0,2 ^a	1,4 \pm 0,1 ^a	10
BCF (Hz)				
11,5 \pm 3,6 ^b	13,6 \pm 2,6 ^b	14,0 \pm 3,2 ^{ab}	17,1 \pm 0,9 ^a	10

Médias seguidas de mesma letra em linha não diferem Teste de Tukey (P<0,05)

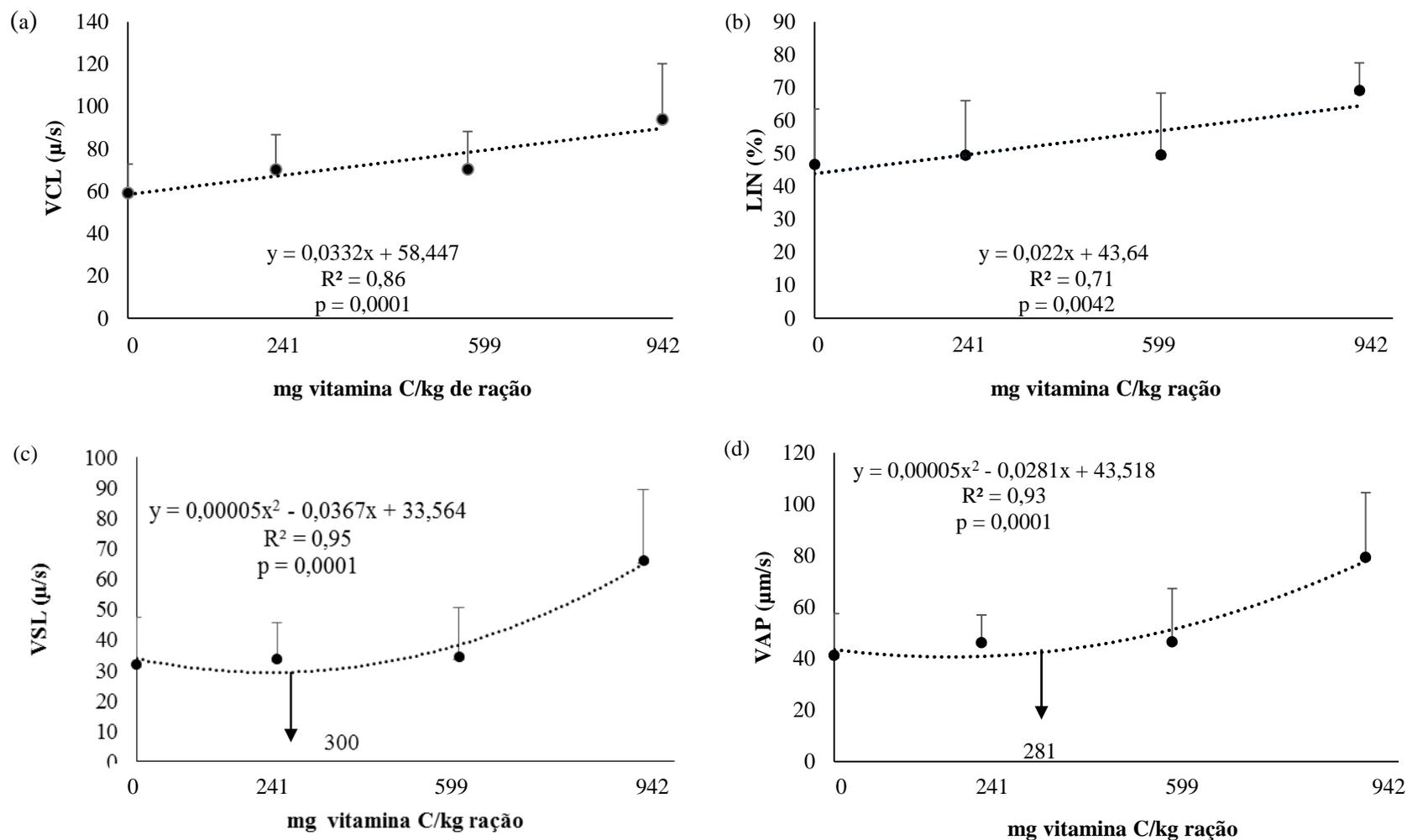


Figura 1. Cinética espermática de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta. a- VCL (velocidade da trajetória real); b - LIN (linearidade); c - VSL (velocidade da trajetória linear); d - velocidade da trajetória média (VAP)

Tabela 5. Médias (\pm desvio padrão) da morfologia espermática (%) sêmen de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com diferentes níveis de vitamina C na dieta

Níveis calculados de vitamina C na dieta					
(mg/kg de ração)					
Espermatozoides	0	261	599	942	p
Normais (%)	80,7 \pm 31,6 ^a	82,4 \pm 31,3 ^a	87,2 \pm 27,1 ^a	86,0 \pm 26,6 ^a	0,2521
Anormais (%)	10,8 \pm 19,8 ^a	5,4 \pm 4,4 ^a	4,3 \pm 3,9 ^a	5,65 \pm 3,56 ^a	0,2749
Anormalidades (%)					
Cabeça solta	2,8 \pm 2,5 ^a	2,4 \pm 2,2 ^a	2,2 \pm 1,9 ^a	2,4 \pm 1,8 ^a	0,9069
Cauda solta	0,1 \pm 0,3 ^a	0,3 \pm 1,3 ^a	0,2 \pm 0,6 ^a	0,3 \pm 0,5 ^a	0,2145
Cauda enrolada	0,5 \pm 1,0 ^a	0,3 \pm 0,7 ^a	0,5 \pm 0,8 ^a	0,5 \pm 0,7 ^a	0,6866
Cauda dobrada	0,7 \pm 1,3 ^a	0,5 \pm 1,1 ^a	0,3 \pm 0,5 ^a	0,2 \pm 0,6 ^a	0,5257
Cauda quebrada	1,2 \pm 1,4 ^a	0,7 \pm 1,0 ^a	0,4 \pm 0,9 ^a	0,8 \pm 1,2 ^a	0,0882
Cauda curta	0,5 \pm 1,0 ^a	0,7 \pm 1,0 ^a	0,5 \pm 1,1 ^a	1,1 \pm 1,3 ^a	0,1181

Médias seguidas de mesma letra em linha não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A vitamina C tem papel importante na motilidade e na cinética de espermatozoides de tilápia do Nilo, sem alterar a morfologia destes.

Os espermatozoides podem ser avaliados por meio de características que podem estar relacionadas às taxas de fertilização (Fogli et al., 1988; Billard et al., 1995), sendo as características de motilidade comumente utilizadas na determinação da viabilidade espermática (Billard e Cosson, 1992; Rurangwa et al., 2004). A motilidade foi superior para o maior nível de vitamina C na dieta. Porém, foram registrados valores baixos de motilidade comparado a de outros trabalhos como de Mataveli et al. (2007), cujo valores ficaram entre 77,9 e 81,0%. Esta baixa motilidade pode está relacionada ao tempo entre a coleta e a análise que demorou cerca de três horas. Chao et al. (1987) encontraram um decréscimo superior a 9% de motilidade a cada hora entre a coleta e as análises seminais. Provavelmente, esse decréscimo é decorrente da degeneração da qualidade seminal ao longo do tempo. A deterioração das proteínas plasmáticas, associado ao consumo de oxigênio do plasma, causa a redução do pH, o que é prejudicial para as células, especialmente para as estruturas mais frágeis como os flagelos, que tem uma função crucial na motilidade (Linhart et al., 1999; Ravinder et al., 1997; Inaba et al., 1998).

O método CASA reduz o tempo de avaliação, diminui a variação entre avaliadores e possibilita a avaliar um número maior de espermatozoides, melhorando a acurácia dos resultados (Rurangwa et al., 2004; Viveiros et al., 2010). Neste estudo, VCL, VSL, VAP, LIN e BCF espermáticas apresentaram maiores valores nos animais alimentados com 942 mg de vitamina C/kg de ração. Este fato indica que, esse nível de vitamina C proporciona melhor qualidade do sêmen para esta espécie. Logo, espera-se que animais alimentados com estes níveis apresentem melhor desempenho reprodutivo, possibilitando melhora na taxa de fertilização. Segundo Rurangwa (2001), a motilidade e a velocidade espermática estão associadas ao sucesso da reprodução de peixes. Além disso, há correlação positiva entre velocidade espermática e fertilização dos ovócitos (Nascimento et al., 2014; Viveiros et al., 2010).

O incremento da velocidade espermática nas amostras seminais de peixes alimentados com maiores níveis de vitamina C ocorreu, provavelmente, por meio da elevação intracelular dos mensageiros fisiológicos AMPc e da guanosinamonofosfato

cíclica (GMPc), como sugerido por Goulart et al. (2004). A influência do AMPc na motilidade espermática está relacionada com a fosforilação proteica que libera energia para iniciar a atividade da dineína ATPase (Bunge, 1973; Yovich et al., 1988). Além disso, os parâmetros de cinética espermática podem ser afetados pela ação das espécies reativas do oxigênio (ROS), pois essas moléculas desencadeiam a peroxidação lipídica, o qual reduz os níveis de ATP, culminando na diminuição da motilidade espermática (Armstrong et al., 1999). Outras alterações também podem ser observadas devido a ação dos ROS como danos às proteínas e modificação do citoesqueleto, causando alterações, já que o citoesqueleto proporciona o suporte para as estruturas celulares móveis especializadas, como cílios e flagelos, promovendo sua ativação (Sharma e Agarwal, 1996; Aitken e Baker, 2002). Por isso, a adição de substâncias antioxidantes na alimentação, como a vitamina C, capaz de neutralizar a ação das ROS, pode influenciar positivamente na manutenção ou elevação da motilidade espermática, bem como a VCL, VSL, VAP, LIN e BCF, fato observado no presente trabalho. Ainda, segundo Billard e Cosson (1992), em teleósteos, o aumento do BCF tem sido positivamente correlacionado com a capacidade de fertilização dos espermatozoides. A mitocôndria tem papel primordial na cinética de movimentações dos espermatozoides, pois nessa organela são produzidos os ATPs por fosforilação oxidativa e a redução desta fonte de energia acarreta na perda da capacidade de natação dos espermatozoides (Marques e Godinho 2004; Cosson, 2004). Diante disso, é provável que a vitamina C tenha atuado na proteção das mitocôndrias, evitando prejuízos na produção de ATP e o fornecimento de energia para o movimento flagelar, melhorando a qualidade dos espermatozoides.

A vitamina C não apresentou efeito significativo sobre a STR. Em mamíferos, maiores valores de STR poderiam refletir melhor capacidade de movimentação retilínea das células espermáticas, o que poderia vir a favorecer o trânsito espermático ao longo do útero e ovidutos, e a capacidade de fecundação (Arruda et al., 2003). No entanto, em peixes, a função desta variável é pouca conhecida e seus efeitos devem ser mais estudados (Sanches et al., 2011). De acordo com Rurangwa et al. (2004) os espermatozoides de teleósteos, geralmente se movimentam em uma trajetória em linha reta ou ligeiramente curvada, sendo que, em condições de final do movimento do espermatozoide, a presença de toxinas ou diluidor de sêmen inapropriado tornam os movimentos mais curvos ou mesmo circulares (Lahnsteiner et al., 2004). É possível que a movimentação em linha reta ou ligeiramente curvada ou mesmo curva seja mais importante para espermatozoides de teleósteos, já que estes precisam percorrer curta distância para fertilizar o ovócito e realizar

movimentos circulares ao redor do mesmo, a procura da micrópila a ser penetrada (Rurangwa et al., 2004). Este fato já foi discutido onde o VCL foi melhor para o maior nível de vitamina C, o que confirma os resultados já abordados. A ALH também foi semelhante entre os tratamentos. De acordo Arruda et al. (2009), quanto maior o ALH, pior a qualidade espermática. Isso se deve a alterações na progressão da célula (Celeghini et al., 2007).

A morfologia espermática também não foi influenciada pela suplementação de vitamina C. Esses resultados corroboram aqueles apresentados por Mataveli et al. (2007), nos quais a adição de até 300 mg de vitamina C/kg de ração não influenciaram na porcentagem de espermatozoides normais. Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos, no processo de espermatogênese. Uma série de fatores, substâncias e mecanismos agem nos testículos para determinar seu perfeito funcionamento (Moles et al., 2007). Dentre estes fatores, a vitamina C é um agente com ação antioxidante, capaz de minimizar o estresse oxidativo no espermatozoide, favorecendo a formação de células espermáticas normais (Moles et al., 2007). No caso das tilápias no presente estudo, a ausência de vitamina C não foi um fator determinante para levar a problemas morfológicos. A baixa incidência de patologias espermáticas é um indicativo de que não ocorreu estresse oxidativo nas amostras analisadas.

5. CONCLUSÕES

A adição de 942 mg de vitamina C/kg de ração de reprodutores de tilápia do Nilo otimizou a motilidade espermática e promoveu melhoria na cinética, melhorando a qualidade do sêmen.

Reprodutores de tilápia do Nilo devem ser alimentados com 961 mg de vitamina C/kg de ração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.; BAER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int. J. Androl.*, v.25, p.191-194, 2002.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Int. J. Androl.*, v.3, p.317-325, 2004.
- ARMSTRONG, J.A.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTORM, W.J.; SIKKS, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Bio. Med.*, v.26, n.7/8, p.869-880, 1999.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. *Acta Sci. Vet.*, v.31, p.228-229, 2003.
- ARRUDA, R.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHIN, E.C.C. Avaliação dos efeitos dos diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Sci. Vet.*, v.31, p.228-229, 2009.
- BATISTA, M.A.; MURGAS, S.L.D.; ROSA, P.V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, M.G.J.; COSTA, V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquac. Res.*, v.42, p.177-187, 2011.
- BILLARD, R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *J. Exp. Zool.*, v.261, p.122-131, 1992.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, v.12, p.95-112, 1995.
- BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBACHER, E.F.; GOMES, E.; MARCOS, R.M.; TOLEDO, C.R.; TESSARO, R.; MERTENZ, F.; SANCHES, E.A. Milt cryopreservations protocols to iguaçu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*). *World Aquac.*, p.157. 2011.
- BUNGE, R.G. Caffeine stimulation of ejaculated human spermatozoa. *Urology*, v.1, p.371-376, 1973.

- CHAO, N.H.; CHAO, W.C.; LIU, K.C.; LIAO, I.C. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.*, v.30, p.107-118, 1987.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.479-488, 2007.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquacult. Int.*, v.12, n.1, p.69-85, 2004.
- DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *Int. J. Androl.*, v.14, p.385-395, 1993.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.
- FOGLI, S.W.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G.; TABATA, Y.A.O. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. *Bol. Inst. Pesca*, v.15, n.1, p.51-54, 1988.
- GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; MACMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5 °C. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.33, n.1, p.112-122, 2004.
- GENNOTTE, V.; FRANÇOIS, E.; ROUGEOT, C.; PONTHER, J.; DELEUZE, S.; MÉLARD C. Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Theriogenology*, v.78, p.210-217, 2012.
- HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. *Illinois: Interstate Publisher*, p.392, 1994.
- INABA, K; MORISAWA, S.; MORISAWA, M. Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *J. Cell Sci.*, v.111, n.8, p.1105-1115, 1998.
- INGERMANN, R.L.; KANUGA, M.K.; WILSON-LEEDY, J.G. Effect of blood plasma on motility of steelhead sperm. *Aquac. Res.*, v.41, p.1107- 1112, 2010.
- INGERMANN, R.L.; SCHULTZ, C.L.F.; KANUGA, M.K.; WILSON-LEEDY, J.G. Metabolism of motile zebra fish sperm. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.158, p.461-467, 2011.

- KIME, D.E.; VAN LOOK. K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physi. C.*, v.130, p.425-433, 2001.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, v.65, p.1283-1297, 2004.
- LERNER, J. Melhorando la calidad del semen. 1998. Disponível em: <http://www.unifertes.com/titulares23.php3> Access: 18/sept./2014.
- LINHART, O.; WALFORD, J.; SIVALOGANATHAN, B.; LAM, T.J. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.*, v.55. n.6, p.1344-1358, 1999.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, 2012
- MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical *Characiformes* fishes. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, v.47, n.5, p.799-804, 2004.
- MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT JUNIOR, D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAKAGUTI, E.S.; TONIATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *Bol. Inst. Pesca*, v.33, p.1-7, 2007.
- MIES-FILHO, A. Inseminação artificial. Sulina, Porto Alegre. 1987.
- MOLES, G.; CARRILLO.M.; MANANOS, E.; MYLONAS, C.C.; ZANUY, S. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocr.*, v.150, p.76-86, 2007.
- MURACK, P.J.; PARRISH, J.; BARRY, T.P. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, v.104, p.121-125, 2011.
- NASCIMENTO, T.S.R.; STÉFANI, M.V.; MALHEIROS, E.B.; KOBERSTEIN, T.C.D. High levels of dietary vitamin E improve the reproductive performance of female. *Biol. Sci.*, v.36, n.1, p.19-26, 2014.

- RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K.C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *J. Fish Biol.*, v.50, p.1309-1328, 1997.
- RURANGWA, E.; ROCLANTS, I.; HUYSKENS, G.; EBRAHIMIT, M.; KIMET, D.E.; OLLEVIER, E. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in (*Clarias gariepinus*). *J. Fish Biol.*, v.53, p.402-413, 1998.
- RURANGWA, E.D.E.; KIME, F.O.; NASH, J.P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, p.1-28, 2004.
- RURANGWA, E.; ROELANTANTS, I.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OTLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (casa), viable staining standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, v.55, p.751-769, 2001.
- SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; MARCOS, R. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquac. Res.*, v. 42, n. 1, p. 153-156, 2010.
- SANCHES, E.A.; MARCOS, R.M.; BAGGIO, D.M.; TESSARO, L.; BALEN, R.E.; BOMBARDELLI, R.A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.40, n.6, p.1163-1167, 2011.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *J. Urol.*, v.48, p.835-850, 1996.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV. p235., 2002
- SITIOS. Protecciûn a la semilla. 2001- Disponível em:
<http://www.lacuarta.cl/sitios/vas/2001/01/14/sexil.html> Access: 18/maio/2014.
- STREIT JUNIOR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arq. Cien. Vet. Zool.*, v.7, n.2, p.157-162, 2004.
- TONIOLLI, R. Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluídos no diluidor de Beltsville (Bts) adicionados do ácido 3-indol acético. *Cien. Anim.*, v.9, n.2, p.61-65, 1999.
- VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H.; ISAU, Z.A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*)

sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, v.74, p.551-556, 2010.

WILSON-LEEDY, J.G.; INGERMANN, R.L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, v.67, p.661-672, 2007.

YOVICH, J.M.; EDIRISHINGHE, W.R.; CUMMINS, J.M.; YOVICH, J.L. Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertil. Steril.*, v.50, p.179-181, 1988.

ARTIGO 3

DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS E QUALIDADE DOS OVOS E LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

Resumo – Objetivou-se com este estudo avaliar a suplementação dietética de níveis da vitamina C (0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração) na eficiência reprodutiva de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e na qualidade de ovos e larvas através de medidas morfométricas e testes de exposição ao ar por 40 e 50 minutos em larvas recém eclodidas e de incubação das larvas durante o período lecitotrófico em diferentes salinidades (entre 0 a 6 g de sal/L). Os maiores índices gonadossomáticos, peso dos ovos e medidas das larvas no momento da eclosão foram registrados para o uso dos níveis de 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. O índice hepatossomático, fecundidade total e relativa foram superiores para as fêmeas que receberam 599 mg de vitamina C/Kg de ração. Em relação ao diâmetro maior e diâmetro menor dos ovos e medidas das larvas 120 horas pós eclosão, os menores valores foram para os que procederam das fêmeas alimentadas sem vitamina C. A taxa de eclosão, produção média de ovos por fêmea e produção média de larvas por fêmea apresentaram relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. O hematócrito, eritrócitos, leucócitos e proteína plasmática total foram piores nas fêmeas que não receberam vitamina C na dieta. A glicose, após o período reprodutivo, foi menor para o tratamento com 942 mg de vitamina C/kg de ração e superior para o tratamento sem vitamina C na ração. Quando os ovos foram incubados em diferentes salinidades, a pior sobrevivência foi para o tratamento sem vitamina C ao final de 120 horas de incubação. Para o teste de exposição ao ar por 40 e 50 minutos, a resistência ao estresse das larvas recém eclodidas foi superior para as larvas provenientes de fêmeas que receberam 942, intermediário para 599 mg de vitamina C/kg de ração e inferiores para os demais tratamentos. Conclui-se que, a adição de 599 e 942 mg de vitamina C otimizou os parâmetros reprodutivos, variáveis sanguíneas dos reprodutores e qualidade dos ovos e larvas de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: reprodução, fertilidade, hematologia, estresse.

DIFFERENT LEVELS OF VITAMIN C ON REPRODUCTION AND QUALITY OF EGG AND LARVAE IN FEMALE NILE TILAPIA

The objective of this study was to evaluate the dietary supplement of vitamin C (0, 261, 599 and 942 mg/kg diet) on the reproductive efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the quality of eggs and larvae through morphometric measurements and 40 and 50 minute exposure to air tests of newly hatched larvae and larvae during the lecithotrophic period in different salinity levels (from 0 to 6 g salt/L). Higher gonadosomatic indexes, egg weight and larvae measures at hatching were recorded for 599 and 942 mg vitamin C/kg diets. The hepatosomatic index, as well as total and relative fecundity were higher for females who received 599 mg vitamin C/kg of food. Regarding the largest diameter and smallest diameter of the eggs and larvae measures 120 hours after hatching, the lowest values were observed for those from females fed without vitamin C. The hatching rate, average egg production per female and average production of larvae per female showed direct relationship with the increase of vitamin C levels on the diet. Haematocrit, erythrocytes, leukocytes and serum total protein were worse in females that did not receive vitamin C on the diet. Glucose, after the reproduction period, was lower for the 942 mg of vitamin C/kg diet and higher for the diet with no vitamin C. When the eggs were incubated in different salinity levels, the worse survival rate was with the treatment without vitamin C at the end of 120 hours of incubation. Regarding the 40 and 50 minute air exposure test, resistance to stress of newly hatched larvae was higher for larvae from females who received 942 mg vitamin C/kg of food, intermediate for the ones receiving 599 mg vitamin C/kg food and lower for other treatments. In conclusion, the addition of 599 and 942 mg of vitamin C optimized the reproductive parameters, the blood variables of breeders and quality of eggs and larvae of the Nile tilapia.

Key words: reproduction, fertility, hematology, stress.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de tilápia do Nilo está difundido no mundo e vem aumentando de forma exponencial nos últimos anos em razão do rápido crescimento, tolerância a ampla faixa de condições ambientais, grande resistência a estresse e doenças, habilidade de reprodução, entre outros (El-Sayed et al., 2005). Contudo, ainda são necessários estudos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie associado à nutrição na reprodução e qualidade de ovos e larvas.

Os ingredientes que compõem as dietas podem influenciar a fisiologia reprodutiva como desenvolvimento do folículo ovariano, capacidade de ovulação, maturação oocitária, fertilidade e a sobrevivência embrionária (Gunasekera et al., 1996; Robinson et al., 2006; Fernández-Palacios et al., 1997). As vitaminas são nutrientes vitais ao desenvolvimento dos animais e participam de inúmeros processos metabólicos (Halver e Hardy, 2002). O ácido ascórbico tem efeitos positivos sobre o desempenho reprodutivo em várias espécies de peixes e suas exigências nutricionais são influenciadas por fatores como idade, tamanho, estresse, estado reprodutivo, entre outros (Toyama et al., 2000). A vitamina C participa da síntese de colágeno, atuando como cofator enzimático (Barnes, 1975). Assim, confere maior resistência à fibra muscular e pode minimizar a ação de radicais livres, evitando a desestabilização da membrana lipídica (Lehninger et al., 1995; Chien e Hwang, 2001). Em fêmeas, a vitamina C atua nos ovários realizando atividade metabólica e antioxidante tanto na formação dos ovócitos, como na maturação dos folículos ovarianos, providenciando a ovulação pela ação da enzima glutathione peroxidase (Pasa, 2010). Segundo Barbosa e Souza (2006), essa enzima é vital para a proteção da membrana lipídica dos ovócitos, para que não sofram peroxidação pelos radicais livres, que causariam a ruptura da membrana e danos graves irreversíveis. Além disso, é sabido que, para o crescimento normal dos embriões de peixes, é primordial a transposição de nutrientes dos reprodutores para os gametas (Navarro et al., 2010).

Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de diferentes níveis da vitamina C na dieta sobre a eficiência reprodutiva de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e na qualidade de ovos e larvas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de Minas Gerais (LAQUA), de acordo com o Comitê de Ética em Uso de Animais da UFMG (Protocolo CETEA 396/2012). Cento e sessenta reprodutores fêmeas de tilápia do Nilo, pesando $70,0 \pm 4,1$ g, foram estocados em quatro tanques de 1000 L, com volume útil de 800 L, em sistema individual de recirculação de água, dotado de filtro mecânico e biológico e aeração suplementar. Cada tanque recebeu 40 fêmeas microchipadas, com biomassa inicial de $2,8 \pm 0,14$ kg de peixe. Vinte e cinco machos, com peso de $153,0 \pm 2,4$ g, foram estocados em um tanque com volume útil de 800 L e mantidos nas mesmas condições descritas para as fêmeas.

Diariamente foram monitorados a temperatura da água, pH e condutividade elétrica, por meio de aparelho portátil da Yellow Spring Incorporation modelo 6920 V2 apresentando valores de $27,5 \pm 0,4$ °C; $7,6 \pm 0,4$ e 190 ± 20 μ S/cm, respectivamente. A amônia foi monitorada utilizando-se Kit comercial Alcon e permaneceu com valores inferiores a 0,1 mg/L. O oxigênio dissolvido foi de $6,2 \pm 0,6$ mg/L e foi mensurado com o oxímetro Hanna HI 9146.

Após a tomada dos dados de qualidade de água, os tanques eram sifonados pela manhã e à tarde, antes do arraçoamento, com troca de aproximadamente 30% do total da água, para remoção de fezes e eventuais sobras de ração.

2.2 MANEJO EXPERIMENTAL

As fêmeas foram alimentadas com quatro dietas isoenergéticas e isoproteicas, com 37% de proteína bruta (Tabela 1) (Gunesequera et al., 1995) com diferentes níveis de suplementação de vitamina C na dieta: 0, 300, 600 e 900 mg/kg de ração (níveis calculados). Como fonte de vitamina C foi utilizado ascorbil monofosfatado (35% do princípio ativo). Para confecção das dietas, os ingredientes foram moídos, pesados, homogeneizados e posteriormente extrusados. Realizou-se análise da composição bromatológica das dietas e dos ingredientes (Silva e Queiroz, 2002) e quantificou-se a vitamina C por meio de HPLC (cromatográfica líquida de alta eficiência), o que

correspondeu a níveis analisados de vitamina C de 0, 261, 599 e 942 mg/kg de ração (Tabela 2).

O manejo alimentar consistiu na alimentação durante sete dias na semana, na proporção de 2% da biomassa total de cada tanque, dividida em duas vezes ao dia às 8:00 e 16:00h. A cada 15 dias foram realizadas biometrias para ajuste da ração a ser ofertada. A fim de se avaliar o efeito das dietas nas fêmeas, os machos foram alimentados com mesma dieta (37% de Proteína Bruta) sem variações nos níveis de vitamina C.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração de reprodutores machos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Ingrediente	Quantidade (%)
Farelo de soja	40,000
Quirela de arroz	16,723
Glúten de milho 60%	13,432
Farelo de trigo	12,000
Farinha de vísceras de aves	10,000
Fosfato bicálcio	2,4163
DL-metionina	0,0400
L-Lisina	0,5000
² Complexo mineral e vitamínico	0,500
³ BHT	0,015
Sal comum	0,500
Inerte + vit. C	3,873

¹Valores expressos em 100% de matéria seca.²Complexo mineral e vitamínico (mg/kg ou UI/kg premix): Ácido fólico : 2500; Ácido pantotênico: 3750; BHT: 2500; Biotina: 125; Zinco: 20; Cobre: 2000; Colina: 125; Ferro: 15; Iodo: 125; Vit K3: 1000; Manganês: 3700; Niacina: 7800; Selênio: 75; Vit A: 2000.000; Vit E: 15000; Vit B1: 2500; Vit B12: 5000; Vit B2: 2500 ; Vit B6: 2000; Vit D3: 500.000; Etoxiquim : 2500.³Butilhidroxitolueno.

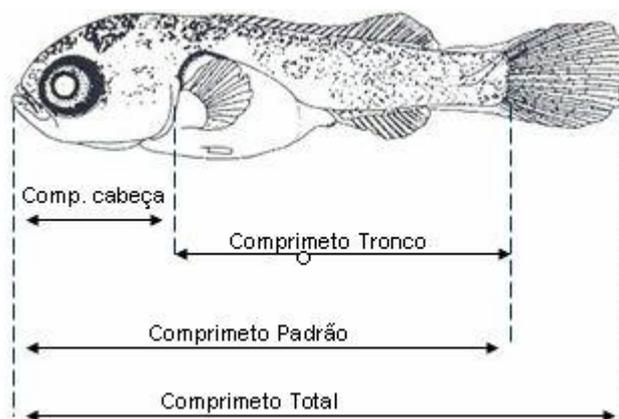
Tabela 2. Composição analisada da ração de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

	Tratamentos (mg de vitamina C/kg de ração)			
	0	300	600	900
Proteína Bruta (%)	37,10	37,58	37,14	37,73
Energia Bruta (kcal/kg)	4000,04	3900,93	3900,85	3900,73
Vitamina C analisada (mg/kg)	0	261	599	942

2.3 REPRODUÇÃO

A reprodução foi realizada durante quatro semanas. A cada sete dias, todas as fêmeas foram inspecionadas. Fêmeas com a papila urogenital avermelhada foram transferidas do tanque de manutenção para outros quatro tanques de reprodução, um para cada nível de vitamina C, nas mesmas condições de manejo e alimentação descritas anteriormente. De cada tratamento, a cada semana foram selecionadas seis fêmeas. Cada tanque recebeu três machos. Após cinco dias, foi feita a retirada das fêmeas e verificada a presença de ovos na boca. Os ovos foram retirados através do contra fluxo da orofaringe das mesmas e colocados em baldes previamente identificados. As fêmeas desovantes foram pesadas devolvidas ao tanque de manutenção. Os ovos foram quantificados por contagem direta. Após quantificação, foram incubados em peneira mantida em suspensão em tanques brancos, circulares, com seis litros de volume útil. Cada desova foi acondicionada em tanque individual identificado. Os tanques foram mantidos em sistema de banho termostático, com água a $27,2 \pm 0,3$ °C. Cada tanque teve aeração suplementar, por meio de pedra porosa, que manteve o oxigênio acima de 4 mg/L. Para a determinação do diâmetro, 15 ovos de cada desova, foram colhidos, fixados em Bouin e, posteriormente, medidos em microscópio estereoscópico, dotado de ocular micrométrica, conforme metodologia adaptada de Ballestrazzi et al. (2003). Devido ao formato dos ovos da tilápia, foram medidos o maior e menor diâmetro. Após eclosão, foi realizada quantificação das larvas para a determinação da taxa de eclosão. Amostras de 15 larvas foram fixadas em Bouin para posterior medida peso,

comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), comprimento de cabeça (CC) e comprimento do tronco (CTR), como ilustrado na figura 1.



Medidas do tamanho da larva (Pereira et al., 2009)

O restante das larvas foi mantido até o final do período lecitotrófico, 120 horas, quando novamente foram realizadas as mesmas medidas descritas anteriormente e a contagem dos indivíduos.

O desempenho e variáveis reprodutivas foram avaliados através das metodologias usadas por Coward e Bromage (2000).

- $Fecundidade\ relativa = \frac{Número\ de\ ovos\ da\ fêmea}{peso\ da\ fêmea\ (g)}$
- $Fecundidade\ total = n^{\circ}\ total\ de\ ovos\ da\ desova$
- $Produção\ média\ de\ ovos\ por\ fêmea = \frac{Número\ de\ ovos\ total\ do\ lote}{Fêmeas\ desovantes}$
- $Taxa\ de\ eclosão\ (\%) = \frac{Número\ de\ larvas\ recém\ eclodidas}{Número\ de\ ovos\ da\ fêmea} \times 100$
- $Sobrevivência\ durante\ a\ fase\ lecitotrófica\ (\%) = \frac{Número\ final\ de\ larvas\ após\ 120\ horas}{Número\ de\ larvas\ após\ eclosão} \times 100$
- Ao final do período reprodutivo, todas as fêmeas foram pesadas.

2.4 ANÁLISE DAS GÔNADAS, FÍGADO E SANGUE

Após 45 e 76 dias de alimentação, antes e após manejos reprodutivos, respectivamente, realizou-se a coleta de sangue de seis fêmeas de cada tratamento. Para tal, os animais foram contidos utilizando-se pano úmido. A coleta foi realizada por punção cardíaca. Foram coletados cerca de 500 µL de sangue, utilizando heparina sódica (0,1 - 0,2 % mg/mL de sangue) como anticoagulante. Destas amostras foram determinados valores de hematócrito, a partir de tubos capilares, preenchidos com

aproximadamente 2/3 de sangue, previamente homogeneizados e centrifugados durante 10 min. a 10000 rpm. A leitura foi realizada no cartão apropriado, igualando o menisco do plasma com a linha superior da régua (linha 100) e igualada a extremidade inferior da porção eritrocitária com a linha inferior da régua (linha 0), de modo que o resultado indicasse o valor da linha, baseada na técnica do microhematócrito, validada por Goldenfarb et al. (1971). A glicose sanguínea foi determinada imediatamente após a coleta de sangue, por meio de um glicosímetro digital Accu-Chec Active Roche Diagnosis®. Para a mensuração da proteína plasmática empregou-se refratômetro óptico Goldenberg. As análises de leucócito e eritrócito foram mensuradas a partir do seu diferencial de células em um esfregaço sanguíneo, que é analisado em conjunto com a contagem de plaquetas. A contagem das células hemáticas foi realizada manualmente utilizando, solução Natt-Herrick em hemocítmetro.

Posteriormente, estes animais foram eutanasiados em solução de eugenol (285 mg/L). Foram realizadas a pesagem dos animais, peso da gônada e fígado. Com estes dados foram determinados o índice gonadossomático (IGS), a partir da expressão $IGS=100(W_G/W)$, na qual W representa a massa total do animal e W_G representa a massa da gônada e índice hepatossomático a partir da expressão $IHS=100(W_f/W)$ na qual W representa a massa total do animal e W_f representa a massa do fígado.

Desta forma nesta etapa do trabalho, foram considerados quatro tratamentos (0, 261, 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração), com seis repetições e dois tempos de coleta.

2.5 TESTES PARA AVALIAR A QUALIDADE DAS LARVAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Após as quatro semanas de reprodução (76 dias de alimentação), os animais foram mantidos nas mesmas condições e colocados para reproduzir por mais duas semanas, como descrito anteriormente.

2.5.1 INCUBAÇÃO DURANTE O PERÍODO LECITOTRÓFICO EM DIFERENTES SALINIDADES DA ÁGUA

Para este teste foram utilizadas 480 larvas, 120 de cada tratamento nível de vitamina C. As larvas recém eclodidas foram contadas individualmente e transferidas para 48 beckers com 10 larvas/L, nas diferentes salinidades: água doce e água salinizada a 2, 4, e 6 g de sal/L, com três repetições para cada tratamento. Estes foram montados

em sistema de banho-termostatizado, com temperatura da água em $27,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e aeração suplementar, que manteve o oxigênio acima de 4mg/L. Durante a fase de alimentação endógena (cinco dias), a água dos beckeres foi renovada em aproximadamente 80% do seu volume total, com água com mesma salinidade e temperatura. Ao final da incubação, foi determinada a sobrevivência por contagem direta dos animais. Desta forma, foram considerados quatro níveis de vitmanina C e quatro salinidades, com três repetições cada.

2.5.2 TESTE DE EXPOSIÇÃO AO AR

Foram utilizadas 240 larvas, 60 de cada tratamento, com cinco dias pós-eclosão. As larvas foram estocadas em 24 beckers de 1 L de volume útil, mantidos em sistema de banho termostatizado, a uma temperatura de 27°C , na densidade de 10 larvas/L. As larvas permaneceram nessas condições por 24 horas, previamente ao teste. Em seguida, foram submetidas aos seguintes tempos de exposição ao ar em peneira: R₄₀: 40 minutos e R₅₀: 50 minutos de exposição ao ar (adaptado de Luz et al., 2012). Depois de coletadas as larvas, a peneira (diâmetro de malha de 0,5 mm) foi colocada rapidamente sobre papel secante, para a retirada do excesso de umidade. Após o tempo dos testes, as larvas retornaram para os recipientes, onde permaneceram por mais 24 horas. Depois desse período, foi determinada a sobrevivência por contagem direta dos animais e determinada a taxa de resistência ao estresse. Desta forma, foram considerados quatro níveis de vitmanina C e dois tempos de exposição ao ar, com três repetições cada.

2.6 ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As variáveis de fecundidade total, fecundidade relativa, dados de ovos e larvas e medidas morfométricas do saco vitelino e larvas incubadas a diferentes temperaturas foram submetidas à ANOVA e posterior teste de Tukey, a 5%. Variáveis de peso (inicial e final), IGS, IHS e sanguíneas (antes e após os manejos reprodutivos das fêmeas), foram submetidas à ANOVA de duas vias e posterior teste de Tukey, a 5%. Variáveis de taxa de eclosão, produção média de ovos por fêmea, produção média de larvas por fêmea, sobrevivência das larvas 120 horas pós exposição (hpe) foram submetidas a análise de regressão, para definição do melhor modelo a ser utilizado. Os testes de incubação em diferentes salinidades e exposição ao ar foram analisados pelo método não paramétrico Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Durante o experimento não foi verificada morte de fêmeas. O peso das fêmeas (no início do experimento e ao final, após 76 dias), IGS e IHS (antes e após os manejos reprodutivos, 45 e 76 dias respectivamente), estão apresentados na tabela 3. Foi verificado que o peso inicial foi semelhante entre os tratamentos. No entanto, após 76 dias, os maiores pesos foram registrados para os animais que receberam 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. Dentro de cada tratamento, os animais apresentaram maior peso ao final de 76 dias de alimentação com as diferentes dietas. Para o IGS e IHS dentro de cada tratamento, os valores foram semelhantes antes e após os manejos reprodutivos. Contudo, para IGS antes dos manejos reprodutivos, o melhor valor foi para 942, intermediários para 261 e 599 mg de vitamina C/kg de ração e inferiores para o tratamento sem vitamina C. Após os manejos reprodutivos, os maiores valores foram para 942 e 599, intermediários para 261 mg de vitamina C/kg de ração e inferiores para o tratamento sem a vitamina. O IHS antes dos manejos reprodutivos foi superior para 599 e 942, intermediário para 261 mg de vitamina C/kg e inferior para o tratamento sem vitamina C. Após os manejos reprodutivos, o IHS foi superior para 599, intermediário para 261 e 942 mg de vitamina C/kg de ração e inferior para o tratamento sem vitamina C.

Tabela 3. Peso, índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS) de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.

Níveis analisados de vitamina C na dieta					
(mg/kg de ração)					
	0	261	599	942	Animais por tratamento
Peso (g)					
Inicial	71,8 ± 2,0 ^{Ab}	74,2 ± 1,7 ^{Ab}	73,5 ± 8,4 ^{Ab}	73,5 ± 2,5 ^{Ab}	40
Final (76 dias)	145,0 ± 14,5 ^{Ba}	147,7 ± 6,5 ^{Ba}	172,7 ± 17,5 ^{Aa}	174,0 ± 10,9 ^{Aa}	16
IGS					
45 dias	2,7 ± 1,0 ^{Ba}	3,4 ± 0,5 ^{ABa}	4,1 ± 0,7 ^{ABa}	4,7 ± 0,1 ^{Aa}	6
76 dias	3,3 ± 1,7 ^{Ba}	4,2 ± 0,2 ^{ABa}	4,9 ± 0,6 ^{Aa}	4,9 ± 0,7 ^{Aa}	6
IHS					
45 dias	0,7 ± 0,3 ^{Ba}	1,4 ± 0,4 ^{ABa}	1,6 ± 0,5 ^{Aa}	1,9 ± 0,4 ^{Aa}	6
76 dias	0,7 ± 0,3 ^{Ba}	1,3 ± 0,2 ^{ABa}	1,5 ± 0,4 ^{Aa}	1,5 ± 0,5 ^{ABa}	6

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

A fecundidade total e relativa foram superiores ($p < 0,05$) para as fêmeas que receberam 599 mg de vitamina C/ Kg de ração. As fêmeas que receberam 942 mg de vitamina C/ Kg de ração apresentaram valores intermediários, e semelhantes ($p > 0,05$) aos dos tratamentos com nível 0 e 261 mg de vitamina C/ Kg de ração (Tabela 4). Em relação ao diâmetro maior e diâmetro menor dos ovos, os que procederam das fêmeas alimentadas com ração isenta de vitamina C apresentaram menores valores ($p < 0,05$), enquanto os demais tratamentos apresentaram valores superiores e semelhantes entre si ($p > 0,05$). O peso dos ovos aumentou proporcionalmente ao nível de vitamina C fornecida à matriz, os ovos vindos das fêmeas alimentadas com 599 e 942 mg de vitamina C/ Kg de ração, apresentaram os maiores valores e não diferiram entre si. Os dados de comprimento total, comprimento padrão e comprimento do tronco das larvas a 0 horas após a eclosão foram aumentando com o aumento do nível de adição de vitamina C nas rações das progenitoras, sendo que os dois maiores níveis não diferiram entre si ($p > 0,05$). O comprimento do corpo das larvas não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$). O peso foi inferior nas larvas provenientes das fêmeas alimentadas com as rações contendo os dois níveis inferiores de inclusão e maiores e semelhantes entre si para os dois maiores níveis de vitamina C na dieta. Às 120 horas após a eclosão o comprimento total, comprimento padrão, comprimento do corpo e peso foram menores nas larvas geradas das fêmeas que não receberam vitamina C, para o comprimento do tronco não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 4. Fecundidade total (FT), fecundidade relativa (FR), diâmetro maior (DM), diâmetro menor (Dm), peso de ovos; comprimento total (CT), comprimento parcial (CP), comprimento de cabeça (CC) e comprimento do tronco (CTR) de larvas recém eclodidas de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C.

	Níveis analisados de vitamina C na dieta			
	(mg/kg de ração)			
	0	261	599	942
FT	622,6±192,18 ^B	639,0±402,97 ^B	1191,8±225,57 ^A	892,7±352,19 ^{AB}
FR	3,61±1,56 ^B	4,40±2,23 ^B	10,09±2,93 ^A	6,44±4,69 ^{AB}
Dados do ovo				
DM (mm)	2,32 ± 0,11 ^B	2,62 ± 0,12 ^A	2,61 ± 11 ^A	2,61 ± 0,11 ^A
Dm(mm)	1,80 ± 0,15 ^B	2,00 ± 0,15 ^A	2,01 ± 0,21 ^A	2,06 ± 0,16 ^A
Peso(mg)	3,50 ± 0,59 ^C	3,84 ± 0,59 ^B	3,92 ± 0,62 ^A	4,50 ± 0,70 ^A
Dados da larva 0hpe				
CT(mm)	3,97 ± 0,05 ^C	4,25±0,08 ^B	4,37±0,05 ^A	4,37±0,50 ^A
CP(mm)	3,15 ± 0,07 ^C	3,43±0,10 ^B	3,55±0,07 ^A	3,52±0,09 ^A
CC(mm)	1,95±0,15 ^A	2,20±0,54 ^A	2,19±0,52 ^A	2,21±056 ^A
CTR (mm)	3,37±0,12 ^C	3,65±0,16 ^B	3,79±0,11 ^A	3,80±0,14 ^A
Peso(mg)	4,48±0,59 ^B	4,55±0,52 ^B	4,83±0,62 ^A	4,60±0,70 ^{AB}
Dados da larva 120hpe				
CT(mm)	7,69±0,04 ^C	8,47±0,08 ^B	8,49±0,09 ^{AB}	8,58±0,16 ^A
CP(mm)	6,29±0,04 ^B	6,8±0,11 ^A	6,89±0,05 ^A	7,88±0,06 ^A
CC(mm)	2,30±0,12 ^C	2,64 ± 0,18 ^B	2,79±0,12 ^A	2,76±0,14 ^{AB}
CTR (mm)	4,34±0,15 ^A	4,67±0,57 ^A	4,69±0,52 ^A	4,66±0,59 ^A
Peso (mg)	5,03±0,31 ^B	6,44±0,11 ^A	6,45±0,11 ^A	6,53±0,45 ^A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

A taxa de eclosão (Figura 1a), produção média de ovos por fêmea (Figura 1b) e produção média de larvas por fêmea (Figura 1c) apresentaram relação direta com o aumento dos níveis de vitamina C na dieta. A sobrevivência das larvas 120 hpe (Figura 1d) apresentou resposta quadrática com valores máximos estimados pela derivada da equação em 646 mg de vitamina C/kg de ração.

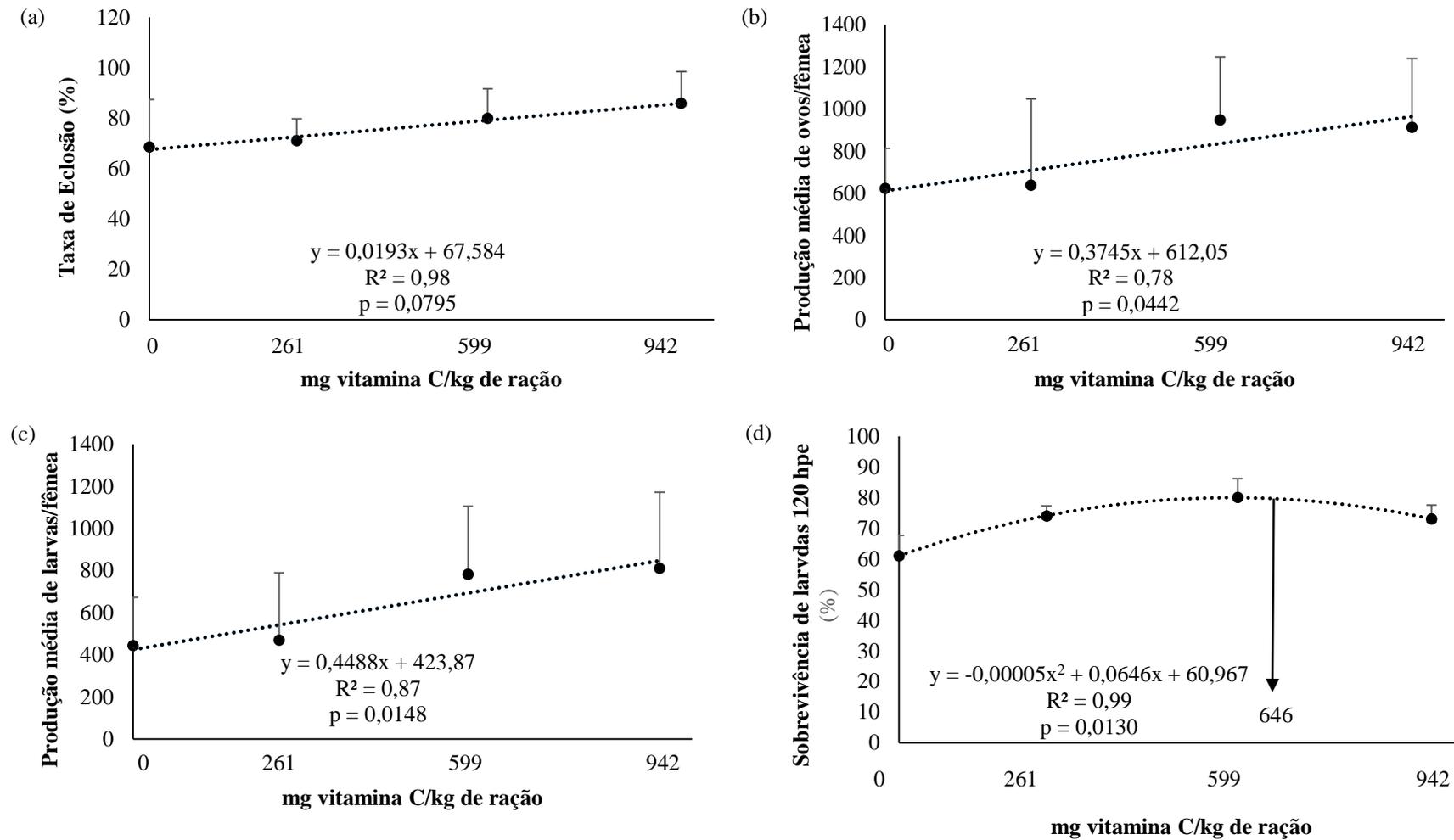


Figura 1. Taxa de eclosão (a); Produção média de ovos/fêmea (b); Produção Média de larvas/fêmea (c); sobrevivência de Larvas 120 horas após a eclosão (d).

Para o hematócrito, antes e após os manejos de reprodução, os piores resultados foram para o tratamento sem vitamina C na dieta (Tabela 5). Dentro dos diferentes tratamentos, só foi verificado diferença no tratamento sem vitamina C na dieta, com maiores valores antes dos manejos reprodutivos. Resultados semelhantes foram registrados para eritrócitos. Para a proteína plasmática, também foi verificado pior resultado para o tratamento sem vitamina C, antes e após os manejos. Porém, dentro de cada tratamento, os resultados foram semelhantes no tempo. O leucócito apresentou resultados semelhantes entre os tratamentos antes e após os manejos reprodutivos. Porém, para o tratamento sem vitamina C na ração, os menores valores de leucócitos foram após os manejos reprodutivos, sem diferenças nos demais tratamentos individualmente, antes e após os manejos. A glicose apresentou valores semelhantes entre os tratamentos antes dos manejos reprodutivos. Após os manejos, a glicose foi menor para o tratamento com 942 mg de vitamina C/kg de ração, seguido pelo tratamento com 599 mg que foi semelhante ao nível de 261 mg de vitamina C/kg de ração. Valores superiores foram verificados para o tratamento sem vitamina C na ração. Dentro de cada tratamento a glicose foi semelhante antes e após os manejos para 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. Para os níveis de 0 e 261, a glicose foi maior após os manejos reprodutivos.

Tabela 5. Variáveis sanguíneas de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de vitamina C, antes (45 dias) e após (76 dias) manejos reprodutivos

Níveis analisados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				
	0	261	599	942
Hematócrito (%)				
45 dias	22,1±2,8 ^{Ba}	27,3±1,1 ^{Aa}	28,3±1,3 ^{Aa}	29,1±2,0 ^{Aa}
76 dias	17,5±3,7 ^{Bb}	27,1±1,5 ^{Aa}	28,63±1,9 ^{Aa}	29,7±1,1 ^{Aa}
Eritrócito (µL)				
45 dias	173625,0±11347,9 ^{Ba}	229843,9±7854,3 ^{Aa}	254812,5±1350,6 ^{Aa}	240531,4±21341,0 ^{Aa}
76 dias	136025,0±14457,7 ^{Bb}	228937,5±1382,3 ^{Aa}	247718,7±13082,3 ^{Aa}	263906,3±25219,8 ^{Aa}
Proteína plasmática (mg/dL)				
45 dias	3,7±0,2 ^{Ba}	4,4±0,2 ^{Aa}	4,9±0,2 ^{Aa}	5,1±0,3 ^{Aa}
76 dias	2,6±0,16 ^{Ba}	4,5±0,4 ^{Aa}	4,9±0,1 ^{Aa}	5,0±0,8 ^{Aa}
Leucócito (µL)				
45 dias	13965,6±3644,2 ^{Aa}	13990,7±2290,2 ^{Aa}	13740,6±3687,0 ^{Aa}	13678,2±3028,0 ^{Aa}
76 dias	11834,3±2132,0 ^{Ab}	13909,3±4277,1 ^{Aa}	13559,3±3810 ^{Aa}	134015,6±3548,2 ^{Aa}
Glicose (mg/dL)				
45 dias	50,7±3,5 ^{Ab}	51,1±3,3 ^{Ab}	51,25±1,4 ^{Aa}	50,6±1,3 ^{Aa}
76 dias	60,1±3,7 ^{Aa}	55,6±4,3 ^{ABa}	51,88±2,1 ^{Ba}	49,0±4,4 ^{Ca}

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Nas avaliações da qualidade de ovos e larvas, no primeiro teste de incubação a diferentes salinidades (Tabela 6), considerando 0, 2, e 4 g de sal/L o pior resultado foi para o tratamento sem vitamina C ao final de 120 horas de incubação. Já na salinidade de 6 g de sal/L, os resultados de sobrevivência foram semelhantes entre os tratamentos. Considerando cada nível de vitamina C individualmente, só foram registradas diferenças significativas para os níveis de 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração, com valores inferiores nas salinidades de 4 e 6 g de sal/L.

Para o teste de exposição ao ar por 40 e 50 minutos, a resistência ao estresse das larvas recém eclodidas foi superior para as larvas provenientes de fêmeas que receberam 942 mg de vitamina C/kg de ração, intermediário para o tratamento em que as fêmeas receberam 599 mg de vitamina C/kg de ração e inferiores para os demais tratamentos. Dentro de cada tratamento, o tempo de 40 minutos proporciona maior resistência ao estresse que o de 50 minutos, independente do nível de vitamina C utilizado para as fêmeas.

Tabela 6. Sobrevivência (S) de larvas de tilápia *Oreochromis niloticus* incubadas em diferentes salinidades da água, ao final o período lecitotrófico (120 horas) e taxa de resistência ao estresse (R) de larvas recém-eclodidas, submetidas ao teste de exposição ao ar dos diferentes tratamentos.

	Níveis analisados de vitamina C na dieta (mg/kg de ração)				p
	0	261	599	942	
	Incubação a diferentes salinidades (g)				
S₀ (%)	80,0 ±10,0 ^{Ba}	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	0,0132
S₂ (%)	70,0±17,3 ^{Ba}	93,0±11,5 ^{ABa}	100,0 ^{Aa}	100,0 ^{Aa}	0,0395
S₄ (%)	83,3±15,2 ^{Ba}	80,0± 26,4 ^{Aa}	73,0±5,7 ^{Ab}	83,3±15,7 ^{Ab}	0,7751
S₆ (%)	60,0±00,0 ^{Aa}	80,0±17,3 ^{Aa}	80,0±0,0 ^{Aab}	80,0±0,0 ^{Ab}	0,1094
	Teste de exposição ao ar (min)				
R₄₀(%)	33,3±5,1 ^{Ba}	47,6±19,6 ^{Ba}	63,3±5,1 ^{ABa}	65,0±12,2 ^{Aa}	0,0026
R₅₀(%)	16,6±5,1 ^{Bb}	20,0±10,9 ^{Bb}	23,3± 5,1 ^{ABb}	36,7±13,6 ^{Ab}	0,0140

Médias seguidas da mesma letra maiúscula em linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

4. DISCUSSÃO

A vitamina C tem influência nos aspectos reprodutivos, assim como a nutrição dos reprodutores pode ser também avaliada na qualidade dos ovos e das larvas de tilápia nilótica. Os níveis de 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração resultaram em fêmeas maiores ao final dos 76 dias de alimentação, refletindo uma melhora no desempenho produtivo das fêmeas e na qualidade dos ovos e larvas. O crescimento dos peixes é influenciado pelo ácido ascórbico, uma vez que este atua na constituição dos componentes do esqueleto, como a cartilagem, ossos e colágeno (Barnes, 1975), sendo, portanto, essencial no processo de desenvolvimento deste espécime. A otimização do peso das fêmeas também foi observado em *Clarias gariepinus* (Shiau e Hsu, 1999) e *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus* (híbridos de tilápia) (Adham et al., 2000), quando alimentadas com dietas contendo 800 mg de vitamina C. Esse resultado pode ser atribuído ao efeito dessa vitamina na síntese de proteínas (Koenig, 1984). 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, uma reutilização endógena mais eficiente ou pelo aumento da capacidade de armazenamento com a idade dos animais (Waagbo et al., 1989).

O desenvolvimento gonadal é afetado por nutrientes, especialmente em espécies que apresentam desovas contínuas com períodos curtos de vitelogênese (Izquierdo et al., 2001). O aumento do IGS em fêmeas é devido a maior demanda de vitelo para os ovócitos em crescimento (Barbieri et al., 2000). Assim, um maior acúmulo de energia é promovido, principalmente, durante a mobilização da fase vitelogênica para serem utilizados no desenvolvimento embrionário (Babin et al., 2007). Este fato, provavelmente, justifica o aumento do IGS nos tratamentos de 599 de 942 mg de vitamina C, o que poderia explicar o aumento do diâmetro e do peso de ovos e larvas proveniente das fêmeas alimentadas com dietas contendo a mesma quantidade dessa vitamina. É possível que esse aumento do IGS seja devido à função antioxidante que a vitamina C exerce sobre as células (Verlhac e Gabaudan, 1994). De acordo Tolbert et al. (1975), essa vitamina possui efeito na esteroideogênese que ocorre nas gônadas. O mesmo autor explica que, o alto nível dessa vitamina nos ovários é um reflexo da sua função endócrina, na qual a vitamina C pode atuar como um regulador ou cofator na

biossíntese de esteróides no folículo. Portanto, parece haver uma relação direta entre o ácido ascórbico e o desenvolvimento ovariano em peixes.

O IHS é uma forma de quantificar o estoque de energia na fase de reprodução. Andersen et al. (1998) detectaram aumento significativo do índice hepatossomático para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), alimentado com dietas suplementadas com ferro e vitamina C. A diminuição IHS tem sido atribuída a sua possível participação na síntese e secreção de substâncias para formação do vitelo exógeno e no processo de maturação ovocitária (Bazzoli et al., 1998). Embora essa diminuição não tenha sido observada no presente estudo, a mobilização das reservas de alimento para a produção de vitelogenina (El-Sayed e Kawanna, 2007) foi evidenciada, uma vez que estes níveis de vitamina C proporcionaram os maiores valores para fecundidade, qualidade de ovos e larvas. Esse aumento no fígado pode ser um resultado de hiperplasia ou hipertrofia (Caballero et al., 1999) devido a uma sobrecarga derivada da dieta (Ibrahim et al., 2011).

Foi observado que os diferentes níveis da vitamina C da dieta influenciaram diretamente a fecundidade das fêmeas, a qualidade dos ovos (peso e diâmetro) e medidas das larvas recém-eclodidas e ao final do período lecitotrófico, com melhores resultados para os níveis de 599 e 942 mg de vitamina C/kg de ração. De acordo Soliman et al., (1986), o desempenho reprodutivo das fêmeas diminui quando são fornecidas dietas sem ou com baixa quantidade de ácido ascórbico, promovendo uma diminuição de disponibilidade de vitamina C no ovário, reduzindo o número de ovos, restringindo a eclodibilidade e aumentando a mortalidade das larvas. O peso e diâmetro dos ovos produzidos a partir de peixes alimentados com dietas desprovidas de ácido ascórbico foram deprimidos, possivelmente, pela ausência de ascorbato que pode ter prejudicado a síntese de colágeno (Soliman et al., 1986). Logo após a fertilização, a produção do colágeno acontece de forma efetiva. Nesse período, os tecidos colagenosos e esqueléticos iniciam a sua formação, evidenciando assim, a importante participação do ácido ascórbico no desenvolvimento do embrião (Masumoto et al., 1991). Assim, o tamanho dos ovos influencia no tamanho das larvas, na sobrevivência (Wallace e Aasjord, 1984) e na taxa de eclosão (Coleman e Galvani, 1998), fato registrado no presente estudo. O efeito da vitamina C sobre o diâmetro e peso de ovos pode estar relacionado com a maior deposição de nutrientes no vitelo, alterando o tamanho dos mesmos e otimizando a taxa de eclosão, a produção média de ovos/fêmea, a produção média de larvas/fêmea e a sobrevivência das larvas 120 hpe. Pode-se assim, inferir que

o diâmetro do ovo é uma variável importante na avaliação do desempenho reprodutivo dos peixes, como observado por Biswas et al. (2005).

Para Chatterjee (1967), a vitamina C desempenha papel importante em alguns aspectos do metabolismo das proteínas, o que poderia explicar o efeito positivo dos maiores níveis de vitamina C no desempenho em CT, CP, CC e CTR das larvas recém eclodidas e 120 hpe. De acordo com Schreck et al. (2001), fêmeas reprodutoras de diferentes espécies de peixes, quando submetidas a estresse de manejo e, particularmente nutricional, acabam produzindo ovos com reduzida eclodibilidade e, larvas e alevinos pouco saudáveis, além de produzir descendentes frágeis, com menor capacidade de sobrevivência e com alta taxa de mortalidade. Para tilápia mossambica (*O. mossambicus*) foi observado redução no crescimento 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 aqueles que receberam (Soliman et al., 1986). Toyama et al. (2000), trabalhando com tilápia na fase de inversão sexual, encontraram os melhores índices de ganho de peso nas tilápias que receberam suplementação acima de 800 mg de vitamina C/kg de ração e o melhor comprimento para as que receberam rações suplementadas com níveis acima de 400 mg de vitamina C/kg da dieta.

O hematócrito foi maior com a suplementação de vitamina C na dieta. Resultados semelhantes foram constatados em relação à carpa indiana (*Cirrhina rigala*) (Agrawal e Mahajan, 1980), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Martins et al., 1995) e catfish (*Clarias gariepinus*) (Adham et al., 2000). Segundo Adham et al. (2000) é comum a diminuição do hematócrito em animais isentos de vitamina C, o que pode ser caracterizada como anemia (Chagas et al., 2013). Isso mostra que o ácido ascórbico é um nutriente indispensável na manutenção dos processos fisiológicos dos peixes e que uma das suas funções está relacionada ao metabolismo do ferro (Lim et al., 2000). O número de eritrócitos foi reduzido após os manejos reprodutivos apenas nos peixes que não receberam a vitamina C na dieta. Como estas células são constituintes da série vermelha sanguínea e contém hemoglobina, cuja função é o transporte de O₂ e de parte de CO₂, qualquer deficiência em número ou forma dos eritrócitos pode comprometer a oxigenação nos tecidos (Ranzini-Paiva e Silva-Souza, 2004).

As proteínas plasmáticas possuem inúmeras funções no organismo que são imprescindíveis para a manutenção da homeostase nos vertebrados, entre estas funções estão a formação da estrutura celular, catalisação de reações bioquímicas e transporte de

metabólitos (Eckersall, 2008). O decréscimo da proteína plasmática total nos animais alimentados com dietas sem a inclusão de vitamina C, e seu reflexo na fecundidade e qualidade de ovos e larvas valida a afirmação de Oliveira et al. (2014) de que o aumento de proteína plasmática total pode estar relacionado ao aumento da vitelogenina circulante e sua utilização para formação do saco vitelínico. O mesmo autor sugere que esta variável é aumentada com a suplementação da vitamina C.

A leucopenia em condições estressantes também foi demonstrada em estudos com nutrição de peixes por Falconet al. (2008), Fernandes Junior et al. (2010) e Signor et al. (2010). A presença de maior número de leucócitos no sangue pode indicar melhor resposta de defesa do organismo (Tavares-Dias e Morais, 2003). Os resultados deste trabalho sugerem que, uma queda no número de leucócitos pode ser decorrente do manejo reprodutivo e da biometria, em detrimento à vitamina C, uma vez que a leucopenia foi verificada após o manejo e apenas nos animais isentos de vitamina C na dieta. A maior porcentagem de leucócitos observada na fase anterior ao manejo severo foi igualmente descrita por Verlhac e Gabaudan (1994) para salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e por Verlhac et al. (1998) para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em situação de estresse, o que demonstra a importância dessa vitamina na manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes. Barton e Iwama (1991) afirmaram que o número total de leucócitos circulantes também foi reduzido em peixes estressados e pode ser resultado da ação do cortisol, aumentando a susceptibilidade à invasão microbiana e permitindo que infecções se propaguem. A resposta da vitamina C neste estudo favorece a afirmação de que de substâncias oxidantes podem estar relacionados com bom desempenho e defesa imunológica (Verlhac et al., 1996).

A concentração de glicose plasmática é utilizada como um dos principais indicadores de estresse em peixes, especialmente em razão de seus valores permanecerem elevados por mais tempo em indivíduos estressados (Martins et al., 2004). Neste estudo, a resposta de valores de glicose aumentados após os manejos reprodutivos sugere uma situação de estresse para os animais que não receberam vitamina C. Aumento de glicose decorrente do estresse também foi registrado por Henrique et al. (1998) e Ortuño et al. (2003), que constataram a eficiência significativa da vitamina C em conter a elevação glicêmica em peixes, sob condições de estresse.

Diversos estudos mostraram que a tilápia do Nilo pode ser mantida a concentrações de sal superiores a 6 g/L, durante a fase juvenil e adulta (Kamal e Mair, 2005; El-Sayed et al., 2005). No entanto, no início da alimentação exógena, a

quantidade de sal de 6 g/L pode promover 100% de mortalidade (Luz et al., 2013). Neste trabalho, a adição de vitamina C nas dietas dos progenitores proporcionou até $80 \pm 17,3\%$ de sobrevivência de larvas recém-eclodidas nas mesmas condições. Esse resultado pode ser explicado devido ao efeito positivo dos altos níveis de vitamina C nos embriões que se estende por longos períodos de nutrição endógena (Dabrowski e Blom, 1994).

O estresse devido à exposição ao ar promove mudanças morfológicas, alterações comportamentais e uma variedade de ajustes metabólicos e fisiológicos em peixes (Adolph, 1983). Segundo Smart (1981), para espécies de tilápia, o mínimo de oxigênio é de 3mg/L, sendo que valores menores que estes seriam considerados estressantes. A maior sobrevivência observada pelas larvas descendentes de animais que receberam diferentes níveis de vitamina C se justifica pela possibilidade do estresse agudo agir sinergicamente com a deficiência em vitamina C (Wedemeyer, 1997), uma vez que esta vitamina possui uma função positiva na melhora do estresse. Fato este observado com a otimização da sobrevivência das larvas nos testes de salinidades e de exposição ao ar neste estudo. Salienta-se que a suplementação de vitamina C na dieta das reprodutoras acarreta em uma maior resistência das larvas ao estresse, pois esta vitamina pode ser transferida para os ovários e para os ovos, sendo absorvidos pelas larvas (Ortuño et al., 2003). Segundo Soliman et al. (1986) esse comportamento da vitamina C fornece uma reserva de ácido ascórbico para as larvas após a eclosão, promovendo um aumento na sobrevivência em momentos críticos.

5. CONCLUSÕES

A adição de 599 e 942 mg de vitamina C otimizou a fecundidade total e relativa, peso, tamanho e quantidade de ovos e larvas, além de promover maiores taxas de sobrevivência das larvas a diferentes salinidades e tempo de exposição ao ar e maior tamanho de larvas e volume de vitelo em diferentes temperaturas.

Reprodutores de tilápia do Nilo devem ser alimentados com pelo menos 599 mg de vitamina C na ração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHAM, K. G.; HASHEM, H. O.; ABU-SHABANA, M.B.; KAMEL, A.H. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquacult. Nutr.*, v.6, p.129-139, 2000.
- ADOLPH, E.F. Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity. *Resp. Physiol. Neurob.*, v.53, p.135-160, 1983.
- AGRAWAL, N.K.; MAHAJAN, C.L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp, *Cirrhinam rigala* Hamilton, due to avitaminosis C during early growth. *J. Fish Dis.*, v.3, p.231-248, 1980.
- ANDERSEN, F.; LYGREN, B.; MAAGE, A.; WAAGBØ, R. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, v.161, p.437-451, 1998.
- BABIN, P.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. *Springer*, The Netherlands. 2007.
- BALLESTRAZZI, R.; RAINIS, S.; TULLI, F.; BRACELLI, A. The effect of dietary coconut oil on reproductive trait and egg fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, v.11, p.289-299, 2003.
- BARBIERI, G.; FILHO, A.R.T.; CAMPOS, E.C.; VERMUIJER, H.; GIAMAS, M.T.D. Biologia populacional da tilápia, *Oreochromis niloticus*, da represa de Guarapiranga, São Paulo- III. Atividade alimentar. *Bol. Inst. Pesca*, v.26, p.15-17, 2000.
- BARNES, M.J. Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Annal N.Y. Acad. Sci.*, v.258, n.1, p.264-277, 1975.
- BARTON, B.B.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Ver. Fish Dis.*, v.1, p.3-26, 1991.
- BAZZOLI, N.; MESQUITA, T.L.; SANTOS, G.B.; RIZZO, E. Análise comparativa da reprodução de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) nos Reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. *Bioscience J.*, v.6, p.99-112, 1998.

- BLOM, J.H.; DABROWSKI, K. Dietary ascorbyl phosphate results in high ascorbic acid content in eggs of rainbow trout. *Comp. Biochem. Phys.*, v.112, p.75-79, 1995.
- BISWAS, A.K.; MORITA, T.; YOSHIZAKI, G.; MAITA, M.; TAKEUCHI, T. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, v.243, p.229-239, 2005.
- CABALLERO, M.J.; LÓPEZ-CALERO, G.; SOCORRO, J.; ROO, F.J.; IZQUIERDO, M.S.; FÉRNANDEZ, A.J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v.179, p.277-290, 1999.
- CHAGAS, E.C.; ARAÚJO, L.D.; BOIJINK, L.A.; INOUE, L.C.; GOMES, L.; MORAES, F.R. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com β -glucano. *Biotemas*, v.25, p.221-227, 2013.
- CHATTERJEE, G.C. Effects of ascorbic acid deficiency in animals, W.H. SEBRELL JR. and R.S. HARRIS (ed.). *The Vitamins*. New York. *Academic Press*, n. 11, v. I, p.407-456. 1967.
- CHIEN, R.G.; HWANG, D.F. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thorn fish *Teraponjarbua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.128, p.91-97, 2001.
- COLEMAN, R.M.; GALVÁNI, A.P. Egg size determines off spring size in neotropical cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae). *Copeia: Amer. Soc. Ichthy. Herpet.*, v.1, p.209-213, 1998.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, v.10, p.1-12, 2000.
- DABROWSKI, K.; BLOM, J.H. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.108, p.129-135, 1994.
- ECKERSAL, L.P.D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6. ed. San Diego: *Academic Press*, p.122-127, 2008.

- EL-SAYED, A.M.; KAWANNA, M. Effects of photoperiod on growth and spawning efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) broodstock in a recycling system. *Aquac. Res.*, v.38, p.1242-1247, 2007.
- EL-SAYED, A.M.; MANSOUR, C.R.; EZZAT, A.A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) brood stock reared at different water salinities. *Aquaculture*, v.248, p.187– 196, 2005.
- FALCON, D.R.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; SOLARTE, W.V.N.; GUIMARÃES, I.G. Leucograma da tilápia do Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. *Ci. Anim. Bras.*, v.9, p.543-551, 2008.
- FERNANDES JUNIOR, A.C.; PEZZATO, L.E.; GUIMARÃES, I.G.; TEIXEIRA, C.P.; KOCH, J.F.A.; BARROS, M.M. Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.39, p.1619-1625, 2010.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VALENCIA, A.; SALHI, M.; MONTERO, D. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v.148, p.233-246, 1997.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the micro hematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.56, p.35-39, 1971.
- GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.146, p.121-134, 1996.
- HALVER, J.; HARDY, R. *Fish Nutrition*. 3.ed. San Diego: Elsevier, 2002. 824p.
- HENRIQUE, M.M.F.; GOMES, A.E.F.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F.A. OLIVATELES, C.; DAVIES D. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, v. 161, n. 1, p. 415-426, 1998.
- IBRAHIM, S.H.A.M.; OMER, H.A.A.; ABEDO, A.A.; ALI, F.A.F.; ABDEL-MAGID, S.S. Ginger root (*Zingiber officinale*) as feed additive in rabbit diets with two levels of protein. *Am. Eur. J. Agr. Environ. Sci.*, v.10, p.906-916, 2011.

- IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALÁCIO H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, v.197, p.25-42, 2001.
- KAMAL, A.H.M.M.; MAIR, G.C. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, v.247, p.189-201, 2005.
- KOENING, J. Importance of vitamin C in ichthyophysiology and practice of pisciculture. *Ichty. Physiol. Acta*, v.8, p.41-57, 1984.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. Tradução de LOODI, W.R.; SIMÕES, A.A. São Paulo: Sarvier 839p. 1995.
- LIM, C.; KLESIUS, P.H.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, v.185, p.313-327, 2000.
- LUZ, R.K.; RIBEIRO, P.A.P.; IKEDA, A.L.; SANTOS, A.E.H.; MELILLO FILHO, R.; TURRA, E.M.; TEIXEIRA, E.A. Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude protein levels. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.41, 457-461, 2012.
- LUZ, R.K.; SANTOS, A.E.H.; MELILLO FILHO, R.; TURRA, E.M.; TEIXEIRA, E.A. Larvicultura de tilápia em água doce e água salinizada. *Pesqu. Agropecu. Bras.*, v.48, n.6, p.1150-1153, 2013.
- MARTINS, M.L. Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.28, p.563-568, 1995.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, v.30, p.71-80, 2004.
- 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: American Soy bean Association. Editado por D. M. Akiyama, R. K. H. Tan. 1999.
- 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. *J. Nutrit.*, v.125, p.3055-3061, 1995.
- NAVARRO, R.D.; NAVARRO, F.K.S.P.; SEIXASFILHO, J.; RIBEIRO-FILHO, O.P. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. *Ver. Augustus*, v. 30, p. 108-118, 2010.
- OLIVEIRA, M.M.; RIBEIRO, T.A.; OLIVEIRA, D.G.S.; ORLANDO, T.M.; DRUMOND, M.M. ; FREITAS, R.T.F. ; ROSA, P.V. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 150, n. 1, p. 62-69, 2014.
- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, J.; MESEGUER, M.A. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immun.*, v.14, p.145-156, 2003.
- PASA, C. Relação reprodução animal e os minerais. *Rev. biodiversidade on-line*, v. 9, p. 101-122, 2010
- PEREIRA, T.S.; FABREGAT, T.E.H.P.; FERNANDES, J.B.K. BOSCOLO, C.N.; CASTILLO, J.D.A.; KOBERSTEIN, T.C.R.D. Selênio orgânico na alimentação de matrizes de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.31, p.433-437, 2009.
- RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, p.89-120, 2004.
- ROBINSON, R.S.; FRAY, M.D.; WHATES, D.C.; LAMMING, G.E.; MANN, G.E. In: Vivo expression of interferon-tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon-tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol. Reprod. Dev.*, v.73, p.470-474, 2006.

- SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, v.197, p.3-24. 2001.
- SHIAU, S.Y.; HSU, T.S. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*, v.175, p.317-326, 1999.
- SIGNOR, A.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G.; BARROS, M.M. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. *Cie. Anim. Bras.*, v.11, p.509-519, 2010.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análises de alimentos* (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p.235, 2002.
- SMART, G.P. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and fish*. New York: *Academic Press*, p.277-293, 1981.
- SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.52, p.1-10, 1986.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience J.*, v.19, p.103-110, 2003.
- TOLBERT, B.M.; DOWNING, M.; CARLSON, R.W.; KNIGHT, M.K.; BAKER, E.M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbic acid sulfate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.258, p.48-69, 1975.
- TOYAMA, G.N.; CORRENTES, J.E.; CYRINO, J.E.P. Suplementação de vitamina C em rações para a reversão sexual da tilápia do Nilo. *Sci. Agr.*, v.57, p.221-228, 2000.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquac. Fisher. Manage.*, v.25, p.21-36, 1994
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.143, p.123-133, 1996.

- VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immun.*, v.8, p.409-424, 1998.
- WAAGBO, R.; THORSEN, T.; SANDNES, K. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v.80, p.301-314, 1989.
- WALLACE, J.C.; AASJORD, D. An investigation of the consequences of egg size for the culture of Arctic char, *Salvelinus alpinus* L. *J. Fish Biol.*, v.24, p.427-435, 1984.
- 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos com reprodutores de peixes têm demonstrado necessidades específicas. Com isso, a suplementação dietética de compostos essenciais, como vitaminas desde o início do desenvolvimento gonadal até a espermatogênese e vitelogênese, melhoram consideravelmente os índices reprodutivos. Os resultados deste estudo permitem inferir que a vitamina C tem papel crucial no incremento reprodutivo, tanto de macho como de fêmeas de tilápias do Nilo. Isso se deve a melhorias no ganho de peso, variáveis espermáticas como motilidade, vigor e volume; na fecundidade, variáveis sanguíneas, peso de ovos e larvas e resistência ao estresse das larvas. Desta forma, indica-se a suplementação de dietas de reprodutores de tilápia do Nilo com pelo menos 599 mg de vitamina C/kg de ração.