

**SUPLEMENTAÇÃO DO ASCORBIL-
PALMITATO E DO ALFA-TOCOFEROL NO
DESENVOLVIMENTO E ESTRESSE EM
LARVAS DE DOURADO (*Salminus brasiliensis*)**

DANIEL OKAMURA

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL OKAMURA

**SUPLEMENTAÇÃO DO ASCORBIL-PALMITATO E DO ALFA-
TOCOFEROL NO DESENVOLVIMENTO E ESTRESSE EM LARVAS
DE DOURADO (*Salminus brasiliensis*)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de monogástrico, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

Okamura, Daniel.

Suplementação do ascorbil-palmitato e do alfa-tocoferol no desenvolvimento e estresse em larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) / Daniel Okamura. --
Lavras : UFLA, 2007.

104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Priscila Vieira Rosa Logato.

Bibliografia.

1. Ascorbil-palmitato. 2. Alfa-tocoferol. 3. Metabolismo. 4. *Salminus brasiliensis*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3748

DANIEL OKAMURA

**SUPLEMENTAÇÃO DO ASCORBIL-PALMITATO E DO ALFA-
TOCOFEROL NO DESENVOLVIMENTO E ESTRESSE EM LARVAS
DE DOURADO (*Salminus brasiliensis*)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de monogástrico, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de outubro de 2007

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Profª. Dra. Débora Machado Fracalossi	UFSC
Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	UFLA
Prof. Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA

Profª. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

*A minha família: Márcia, Yutaka, Patrícia e
Ana Rosa, pelo apoio, paciência e
compreensão,
DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pelo suporte e pela oportunidade concedida.

À professora Priscila Viera Rosa Logato, pela amizade, orientação e confiança, minha mais profunda gratidão.

Aos meus co-orientadores, professores, Luis David Solis Murgas, Adelir Aparecida Saczk e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, pela amizade e incentivo.

Aos funcionários Eleci Pereira e José Roberto dos Santos, pelo companherismo durante todo o curso de graduação e o mestrado.

Aos pesquisadores do Núcleo de Estudo em Aquacultura (NAQUA), em especial aos colegas Felipe Guedes de Araújo e Ulisses Simon da Silveira, pela valiosa ajuda durante o projeto, nos momentos de maior dificuldade e pela amizade.

Aos funcionários da Cemig, por ter nos recebido de forma tão hospitaleira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

Ao Instituto Estadual de Floresta (IEF), pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1 Espécie: <i>Salminus brasiliensis</i>	4
3.2 Metabolismo de estresse.....	5
3.3 Radicais livres e antioxidantes na dieta de larvas e pós-larvas	10
3.4 Vitamina C	13
3.5 Vitamina E.....	21
3.6 Ácido ascórbico x α -Tocoferol.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local.....	28
4.2 Material biológico	29
4.3 Rações experimentais	30
4.4 Protocolo alimentar	33
4.5 Experimento I.....	34
4.5.1 Delineamento experimental.....	34
4.5.2 Coletas experimentais.....	36
4.5.3 Variáveis analisadas	37
4.6 Experimento 2	37
4.6.1 Delineamento experimental.....	38
4.6.2 Teste de estresse	39
4.6.3 Coletas experimentais.....	40

4.6.4 Variáveis analisadas	41
4.7 Metodologia analítica	41
4.7.1 Vitaminas.....	41
4.7.2 Cortisol	43
4.7.3 Pesos e comprimentos	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Experimento I.....	44
5.1.1 Concentrações de vitamina C nas larvas de dourado	44
5.1.2 Mesometria das larvas de dourado	54
5.2 Experimento II.....	58
5.2.1 Concentrações de vitamina C nas larvas de dourado	58
5.2.2 Concentração do cortisol nas larvas de dourado	70
6 CONCLUSÕES	74
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9 LISTA DOS ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Interação do sistema endócrino com o sistema imune.....	07
FIGURA 2	Principais reações precursoras de radicais livres.....	12
FIGURA 3	Estrutura molecular do ascorbil palmitato.....	15
FIGURA 4	Formas estruturais encontradas no metabolismo; A1-ácido ascórbico, A2-forma iônica do ácido ascórbico, B-radical livre ascorbil, C-ácido dehidroascórbico e D-ácido 2,3-dicetogulônico.....	17
FIGURA 5	Interação do ácido ascórbico e a lisil e prolil Hidroxilase.....	18
FIGURA 6	Participação do ácido ascórbico na biossíntese da Carnitina.....	19
FIGURA 7	Biossíntese do cortisol.....	20
FIGURA 8	Ação da vitamina C sobre a liberação do cortisol.....	21
FIGURA 9	Formas estruturais da vitamina E.....	22
FIGURA 10	Formas estruturais da vitamina E oxidada.....	24
FIGURA 11	Redução do α -tocoferolxil em α -tocoferol pelo ácido Ascórbico.....	26
FIGURA 12	Posição e regeneração do α -tocoferol na membrana Celular.....	27
FIGURA 13	Caixas experimentais para a larvicultura do dourado.....	29
FIGURA 14	Rações experimentais.....	31
FIGURA 15	Separação e granulometria das rações experimentais.....	32
FIGURA 16	Cronograma de alimentação seguindo os dias de vida das larvas de dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	34
FIGURA 17	Tubo nos quais as larvas de dourado <i>Salminus brasiliensis</i> foram armazenadas, em grupos de duas larvas por tubo a -20 °C.....	37

FIGURA 18	Tubo de PVC com a extremidade vedada com rede de 400 μ m imerso na água (esquerda) e suspenso da água (direita), expondo as larvas ao ar.....	40
FIGURA 19	Ilustração do comprimento total (figura à direita) e altura da cabeça (figura à esquerda).....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição das rações experimentais.....	31
TABELA 2	Concentração de ascorbil palmitato, ácido ascórbico, tocoferol acetato e alfa-tocoferol nas seis rações experimentais.....	32
TABELA 3	Concentrações de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (AD), determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) durante os dois diferentes períodos experimentais (5 e 15 dias).....	45
TABELA 4	Concentrações da vitamina C reduzida (VR) e da vitamina C total (TT), determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) durante dois diferentes períodos experimentais (5 e 15 dias).....	50
TABELA 5	Comprimento total (cm) das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>), alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.....	55
TABELA 6	Altura da cabeça (cm) das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>), alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.....	55

TABELA 7	Peso (gramas) das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>), alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.....	56
TABELA 8	Concentrações de ascorbil-palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (AD), determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) antes (inicial) e após (final) o teste de estresse.....	60
TABELA 9	Concentrações de vitamina C reduzida (VR) e vitamina C total (TT) determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) ante (inicial) e após (final) o teste de estresse.....	67
TABELA 10	Concentrações de cortisol (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) determinado no corpo inteiro das larvas de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>), alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato (AP) antes do teste de estresse (inicial) e após o teste de estresse (final).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AD	Ácido dehidroascórbico
AP	Ascorbil palmitato
VR	Vitamina C reduzida
TT	Vitamina C total
C18	Carbono 18
CV	Coefficiente de variação
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPI	Eixo hipotálamo hipófise inter-renal
PR	Períodos
SC	Sistema cromafim
SNC	Sistema nervoso central
CRH	Hormônio liberador da corticotropina
TRH	Hormônio liberador de tirotrópicos
DA	Dopamina
ACTH	Adrenocorticotrópicos
α -MSH	Hormônio estimulante dos melanócitos
GS	Glicocorticóides

RESUMO

OKAMURA, Daniel. **Suplementação do ascorbil-palmitato e do alfa-tocoferol no desenvolvimento e estresse em larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*)**. 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

Com o objetivo de avaliar o efeito das vitaminas E e C durante o estresse e o desenvolvimento de larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), foram realizados dois experimentos, em um delineamento experimental inteiramente casualizado com parcelas subdivididas. Nas parcelas, um arranjo fatorial (2x3) foi constituído por 6 rações experimentais, com a combinação entre duas concentrações de tocoferol acetato (0 e 250 mg kg⁻¹ de ração) e três concentrações de ascorbil palmitato (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ração). Nas subparcelas, foram analisados dois diferentes períodos de coleta. O primeiro experimento foi realizado nos primeiros 17 dias de vida das larvas de dourado, que foram alimentadas com as rações experimentais, do 3º ao 17º dia, num total de 15 dias. Coletaram-se amostras em dois diferentes períodos: larvas com 5 e com 15 dias de alimentação. Avaliaram-se os parâmetros: comprimento total, peso, altura da cabeça e as diferentes formas de vitamina C corporal, sendo o ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (AD), vitamina C reduzida (VR) e vitamina C total (TT). A VR foi composta pela soma das concentrações do AP com o AA e a TT pela soma do AD com a VR. A suplementação do ascorbil palmitato na dieta foi eficiente em aumentar as concentrações de AA e AD corporal nos primeiros 5 dias de alimentação (P<0,05). Houve uma resposta mais sensível das concentrações de AA, tendo as médias observadas de AA corporal nas larvas suplementadas com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de AP sido superiores às observadas nas larvas suplementadas com 0 mg kg⁻¹. Também obteve-se resposta menos sensível das concentrações de AD, em que apenas as médias de AD corporal observadas nas larvas suplementadas com 1.000 mg kg⁻¹ de AP foram superiores aos demais tratamentos. Para caracterizar o efeito das três suplementações de AP nas concentrações de AP corporal, foi necessário um período mais prolongado de alimentação (15 dias). Durante o desenvolvimento, o tocoferol acetato aumentou as concentrações de AD corporal nas larvas de dourado e evitou a oxidação das VR corporal, gerando um aumento significativo (P<0,05) nas concentrações de TT. No quinto dia de alimentação, não foi observada diferença significativa no comprimento total e no peso das larvas, no entanto, após 15 dias de alimentação, as larvas dos tratamentos contendo as suplementações de 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de AP foram

¹ Comitê Orientador: Priscila Vieira Rosa Logato-UFLA (Orientadora), Luis David Solis Murgas-UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas-UFLA.

superiores ($P < 0,05$) ao tratamento com 0 mg kg^{-1} . A altura da cabeça apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) no quinto dia de alimentação. Foram observadas, nas larvas suplementadas com 1.000 mg kg^{-1} de AP, médias superiores às das larvas alimentadas com 100 mg kg^{-1} . No 15^a dia de alimentação, pôde-se observar uma diferença significativa entre todos os tratamentos, tendo a altura da cabeça aumentado conforme as concentrações crescentes de suplementações do AP na ração. O segundo experimento seguiu a metodologia experimental do primeiro, no entanto, avaliou o efeito das vitaminas C e E no estresse. No 17^a dia, as larvas foram submetidas a um teste de estresse definido por duas exposições ao ar de 3 minutos cada, intercaladas com duas submersões na água de, respectivamente, 5 e 30 minutos. Em dois diferentes períodos: antes e após o teste de estresse, foram analisados o cortisol corporal e as diferentes formas de vitamina C corporal, assim como as formas avaliadas no primeiro experimento. Não houve diferença significativa nas concentrações de VR durante o estresse, no entanto, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) nas concentrações de AP e AA corporais. O metabolismo das larvas de dourado disponibilizou o AP corporal em AA e AD, sendo caracterizada ($P < 0,05$) a influência do tocoferol acetato nesse processo. As larvas dos tratamentos contendo maior suplementação de tocoferol acetato do que as suplementações de AP converteram o AP em AA, enquanto que, nos tratamentos contendo as suplementações maiores de AP do que a suplementação do tocoferol acetato, o AP foi convertido em AD. O tocoferol acetato aumentou ($P < 0,05$) a concentração de VR corporal nas larvas não suplementadas com AP. As médias gerais de cortisol corporal apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre as três suplementações de AP testadas. As larvas dos tratamentos contendo maiores suplementações de AP na ração apresentaram menores concentrações de cortisol corporal. Conclui-se que a suplementação de AP incorporou todas as formas de vitamina C no corpo inteiro das larvas de dourado, além de proporcionar melhor desenvolvimento e resposta ao estresse, podendo ser utilizada como fonte de vitamina C para larvas de dourado.

ABSTRACT

OKAMURA, Daniel. **Ascorbil palmitate and alpha-tocopherol supplementation on the development and stress response of dourado larvae (*Salminus brasiliensis*)** 2007. 104p. Dissertation (Master degree in animal science)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, .

In order to evaluate the effect of vitamin C and E supplementation during stress and development of dourado (*Salminus brasiliensis*), two experiments were performed in a totally random design arranged with sub-plots. A factorial design (2 x 3) was used to test six experimental diets formulated with two levels of tocopherol acetate (0 and 250 mg kg⁻¹ of the diet) and three levels of ascorbil palmitate (0, 100 and 1.000 mg kg⁻¹). On the sub-plots two different sampling periods were analyzed. The first experiment was performed during the first seventeen days of life of dourado larvae and the experimental diets were supplied from the second to the seventeenth day of life (15 days). The samples were taken in two different periods: 5th day from the beginning of the feeding trial with the experimental diets and on the 15th day of feeding (17th day of life). The total length, the wet weigh, the head height and the whole body concentration of ascorbil palmitate (AP), ascorbic acid (AA), dehydroascorbic acid (AD), reduced vitamin C (VR) and total vitamin C (TT) were assayed. The VR was obtained by the sum of the AP and AA concentrations and the TT was calculated by the sum of AD and VR. The supplementation with ascorbil palmitate was efficient in rising the whole body AA and AD concentrations during the first five days of the feeding trial (P<0,05). The AA concentration in the larvae body responded to the elevation of the AP in the diet. The larvae supplemented with 100 and 1000 mg kg⁻¹ of AP showed higher concentrations of AA than the ones that received the 0mg kg⁻¹ diet. A positive association was also observed between the AP levels in the diet and the whole body AD, but the relationship was not as clear as the one observed for AA. Only in the highest AP concentration, 1000mg kg⁻¹, was able to produce significative changes in the AD mean value. To characterize the effect of the three different levels of AP supplementation on the whole body AP concentration, a longer feeding period was necessary (15 days). During the development, the tocopherol acetate supplementation seems to had risen the body AD in the dourado larvae avoiding the VR oxidation, creating a significative (P<0,05) rise on the TT concentration. On the fifth feeding day, no significative difference on the total length and wet weigh could be observed, however, after fifteen days of feeding, the larvae from

¹ Guiding committee: Priscila Vieira Rosa Logato-UFLA (Orientadora), Luis David Solis Murgas-UFLA and Rilke Tadeu Fonseca de Freitas-UFLA.

the treatments supplemented with 100 and 1000 mg kg⁻¹ of AP showed better results for this parameters than the larvae that received 0 mg kg⁻¹. On the fifth feeding day, the head height was significantly different between the treatments (P<0,05). The larvae that received 1000 mg kg⁻¹ of AP showed higher mean values than the ones that received 100 mg kg⁻¹. On the 15th feeding day, significative differences in the development could be observed between all the treatments. The head height was higher in the treatments with the higher AP levels in the diet. On the second experiment the same experimental conditions adopted in the first study were kept, however, in this experiment the effects of the vitamins C and E on the stress were studied. On the 17th day, the larvae were submitted to a stress test constituted by two air exposure of 3 minutes each, separated by 3 minutes. After the last air exposure the larvae were let to recover for 30 minutes before the samples were taken. The whole body cortisol and the different forms of the vitamin C worked in the first experiment, were evaluated in two different period: after and before the stress test. There was no significant difference on the VR concentration during the stress, however, The AP and AA whole body concentrations were significantly different from the pre-test values. The dourado larvae metabolism made the body AP available in AA and AD with the participation of the tocopherol acetate in this process. The larvae that received the higher tocopherol acetate and lower AP supplementation converted the AP in AA, while in the treatments that received higher AP and lower tocopherol acetate supplementation, the AP was converted in AD. The tocopherol acetate increased (P<0,05) the body concentration of VR in the larvae that were not supplemented with AP. The averages of the body cortisol concentrations showed significative differences (P<0,05) between the three AP supplementation levels tested. The larvae from the treatments with higher levels of AP supplementation showed lower body cortisol levels. It can be concluded that the AP supplementation increased all forms of vitamin C concentration in the dourado larvae whole body, in addition to promote a better development and stress response, showing itself a suitable vitamin C source for dourado larvae.

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura nacional vem sofrendo mudanças a cada ano, entretanto, algumas das espécies de maior produção no Brasil são as exóticas, como, por exemplo, a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*). Atualmente, a piscicultura brasileira é deficiente em informações e técnicas referentes ao cultivo intensivo de espécies nativas, o que dificulta o desenvolvimento da produção em larga escala dessas espécies.

O dourado (*Salminus brasiliensis*) é um dos maiores peixes de escama dos rios e bacias brasileiras. É considerado um peixe nobre, pois apresenta carne de excelente qualidade, sendo também muito requisitado em pesque-pague. É uma espécie de grande porte e com um bom potencial de produção. Contudo, há poucos estudos referentes a essa espécie, o que dificulta algumas fases do seu cultivo, principalmente a larvicultura.

A maior dificuldade na adaptação de uma espécie selvagem em cativeiro se concentra na larvicultura. Nesse período ocorre um rápido desenvolvimento das larvas, exigindo boa adaptação do sistema de cultivo. Em uma produção, são comuns os problemas relacionados à mortalidade e à deformidades das larvas e alevinos que, em grande parte, são consequência de falhas nutricionais. A deficiência de alguns nutrientes na dieta das pós-larvas pode elevar a ocorrência de distúrbios fisiológicos, refletindo no desenvolvimento dos peixes durante essa fase. Esses problemas, em sua maioria, são acompanhados de alta taxa de mortalidade e deformações.

Diversos fatores são relatados como responsáveis pela malformação e pela alta taxa de mortalidade em pós-larvas, como o canibalismo, a alta densidade populacional, a baixa renovação da água no tanque de cultivo, a alta oscilação na temperatura da água e a alta contagem de patógenos na água.

Manter essas variáveis dentro de uma faixa aceitável é muito difícil quando se trabalha em campo, principalmente com uma espécie que não tem seus limites bem estabelecidos. Esses fatores dificultam a adaptação dos peixes durante a larvicultura, atuando como agentes estressores, o que torna essencial o fornecimento de um ótimo aporte nutricional.

Os antioxidantes são nutrientes essenciais na dieta da maioria das espécies de peixes e os mais utilizados são as vitaminas C e E. Seus efeitos no metabolismo dos animais são muito explorados, principalmente em peixes na fase de reprodução e pós-larvas. Sua essencialidade deve-se à ineficiência dos peixes em sintetizar essas vitaminas em quantidades necessárias.

Os efeitos da vitamina C e E sobre o crescimento e o desenvolvimento de larvas de peixe são bem relatados em recentes estudos. Suas deficiências estão relacionadas à crescente mortalidade e a deformações. Essas vitaminas atuam diretamente no equilíbrio metabólico e osmorregulatório, o que possibilita um funcionamento perfeito de órgãos e enzimas. São caracterizadas pelas constantes oxidações e reduções, para manter o equilíbrio osmorregulatório do metabolismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito e a interação entre a suplementação de ascorbil palmitato e de tocoferol acetato na alimentação de larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), durante o desenvolvimento e quando submetidas ao estresse.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito da suplementação do ascorbil-palmitato como fonte de vitamina C nas rações de dourados.
- Avaliar a influência da vitamina E na absorção, na oxidação e na redução do ascorbil palmitato.
- Observar o efeito do ascorbil palmitato e do tocoferol acetato no peso, no crescimento e na altura da cabeça das larvas durante a adaptação alimentar e nos primeiros dias de vida.
- Observar o efeito do ascorbil palmitato e do tocoferol acetato nas concentrações de cortisol corporal antes e após o estresse.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Espécie: *Salminus brasiliensis*

O dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), é da ordem characiforme, família Characidae e subfamília Salmininae, carnívoro-piscívoro exclusivo, de hábito diurno e coloração amarelo-dourado. É considerado um dos maiores e mais nobres peixes brasileiros de escama e água doce (Alvim, 1999; Braga et al., 2007).

Possui boca predadora terminal, ampla e com uma fenda oral, estendendo-se lateralmente, o que proporciona grande abertura, dando condições para essa espécie capturar presas de diferentes tamanhos (Rodrigues & Menim, 2006). Possuem numerosos dentes cônicos, apresentando maxilar inteiramente denteado ao longo de sua borda (Natakani et al., 2001). Segundo Vega-Orellana et al. (2006), essa espécie apresenta atividade da tripsina e quimitripsina 12 horas após a eclosão, já sendo capaz de ingerir proteínas. Essas são características que acentuam o canibalismo observado durante sua larvicultura e alevinagem.

As larvas eclodem com um comprimento total médio de 4,35 mm; os cromatóforos concentram-se inicialmente no focinho e na porção superior da bexiga natatória. A absorção total do saco vitelino ocorre com 8 mm de comprimento total e, com 14,44 mm, atinge o estágio de flexão, ocorrendo a pigmentação de todo o corpo (Nakatani et al., 2001).

Na natureza, esta espécie prefere ambientes correntosos e habita toda a extensão da bacia do Prata e do Pantanal Mato-Grossense, sendo encontrada nos rios Paraguai, Grande, Paraná, Jacuí e São Francisco (Braga et al., 2007; Mai & Zaniboni-Filho, 2005).

O dourado proporciona carne saborosa e de excelente qualidade. A espécie apresenta alto potencial para a pesca esportiva, sendo bastante

requisitada em pesque-pague (Fracalossi et al., 2004; Mai & Zaniboni-Filho, 2005). Tem grande potencial de produção devido ao rápido desenvolvimento durante a larvicultura e alevinagem, atingindo o tamanho para a comercialização de alevinos em um período até 30% menor que outras espécies brasileiras (Mai & Zaniboni-Filho, 2005).

Entretanto, são poucos os estudos da produção intensiva desta espécie. A maior parte das pesquisas é focada nas fases de larvicultura e alevinagem, etapas mais críticas da produção (Fracalossi et al., 2004).

O hábito alimentar carnívoro desde as primeiras horas de vida acentua o alto canibalismo e a inabilidade das larvas em aceitar alimentos inertes. Essas características, combinadas com baixas taxas de fertilização, limitam a produção em larga escala, sendo seu cultivo comercial pouco realizado (Mai & Zaniboni-Filho, 2005).

3.2 Metabolismo de estresse

A resposta fisiológica dos peixes a um estímulo externo é essencial para a sua adaptação a um novo ambiente. Isso resulta na mobilização de suas reservas energéticas e nas mudanças metabólicas que o ajudam a superar as variações do novo meio (Ruane et al., 2002). Essa resposta pode ser classificada como estresse.

Schreck et al. (2001) definem o estresse como uma cascata de eventos que ocorrem quando o organismo está tentando manter a homeostase ou restabelecer a normalidade frente a uma injúria qualquer. Quando esta reação é forçada além de seus limites, a resposta se torna prejudicial para a saúde do peixe.

Os indicadores mais utilizados na avaliação do estresse e que normalmente fornecem uma boa resposta são os níveis sanguíneos de glicose e de cortisol plasmáticos. O cortisol é utilizado para caracterizar a resposta

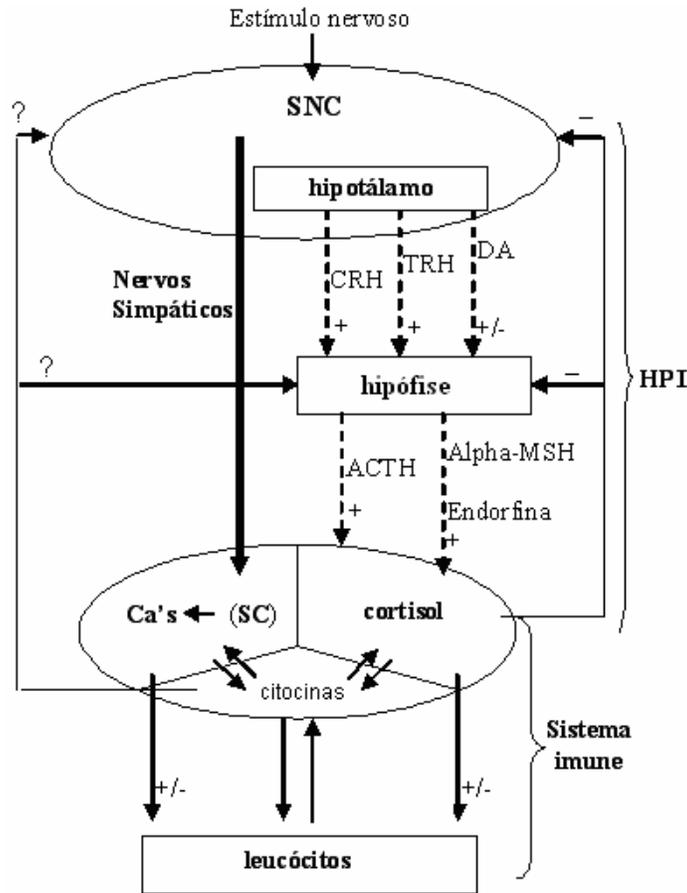
primária, e a glicose, a resposta secundária (Robertson et al., 1987; Barton, 2000). A elevação no valor do hematócrito pode ser observada como resposta secundária a eventos estressantes, para diversas espécies (Barton & Iwama, 1991), no entanto, esse parâmetro apresenta grande variação (Okamura et al., 2007).

A fisiologia do estresse abrange a interação e a intercomunicação do sistema endócrino com o sistema imune. O eixo principal do sistema endócrino envolve o hipotálamo, a glândula hipofisária e o sistema inter-renal. Esses compõem os dois grandes sistemas, o sistema simpático-cromafim (SC) e o eixo “hipotalâmico-hipofisário-inter-renal” (HPI), conhecido como eixo do estresse (Figura 1). Esses eixos são responsáveis por interpretar os estímulos do cérebro para o sistema imune, iniciando a resposta ao estresse (Weyts et al., 1999).

A estimulação do sistema SC resulta em aumento dos níveis circulantes de adrenalina, enquanto que a estimulação do eixo HPI resulta em aumento dos níveis circulantes de cortisol (Frisch & Anderson, 2000).

A partir do SNC, o estímulo nervoso tem dois destinos: um é a ativação do SC através do sistema nervoso simpático, que estimula uma rápida liberação de epinefrina (adrenalina) pelas células do sistema cromafim (Kemeny, 2003). Para garantir um abastecimento de glicose no cérebro, o cortisol e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) atuam no metabolismo de energia, bloqueando a utilização da glicose pelos tecidos periféricos e estimulando a gliconeogênese (Chrousos & Gold, 1992, apud Schreck et al., 2001). Esse procedimento possibilita o desprendimento de energia para o animal se defender ou fugir durante uma situação de emergência, ao mesmo tempo em que mantém suas funções basais. O outro destino do estímulo nervoso é a ativação do eixo HPI. O hipotálamo é responsável pela liberação de diversos hormônios, entre eles o hormônio liberador da corticotropina (CRH), o hormônio liberador da tirotropina (TRH) e a dopamina (DA) (Weyts et al., 1999). Esses hormônios são

drenados até o lóbulo anterior da glândula hipofisária pelo canal porta hipófise, composto por capilares inervados, controlando, dessa forma, a liberação dos hormônios da hipófise (McCann et al., 2000).



SNC: sistema nervoso central; HPI: eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal; CRH: hormônio liberador de corticotrópicos; TRH: hormônio liberador de tirotrópicos; DA: dopamina; ACTH: adrenocorticotrópicos; alpha-MSH: hormônio estimulante dos melanócitos; SC: sistema cromafim; Ca's: catecolaminas.

FIGURA 1 Interação do sistema endócrino com o sistema imune (Modelo adaptado de Weyts et al., 1999 e Kemeny, 2003).

Os hormônios liberados pela hipófise podem ter ação direta nos tecidos corporais ou agir sobre outras glândulas (McCann et al., 2000). Os principais participantes no mecanismo de estresse são o ACTH (hormônio adrenocorticotrópico), o α -MSH (hormônio estimulante dos melanócitos) e as endorfinas. Esses participam no controle de liberação dos glucocorticóides (cortisol) pelo córtex da adrenal (em peixes denominados inter-renais).

Durante a resposta imune, o sistema neuroendócrino é responsável pelo aumento dos níveis de glicocorticóides plasmático. Estudos revelaram que as citocinas (produzidas no rim e nos leucócitos) são responsáveis por este fenômeno. Foram observados receptores hormonais nas células do sistema imune e os receptores de citocinas nas células do sistema endócrino, mostrando grande interação entre os sistemas imune e endócrino com os hormônios e citocinas, respectivamente. Isso evidencia a comunicação entre os componentes do eixo-HPI e o sistema imune. Grande evidência dessa interação química entre os sistemas são os receptores de glicocorticóides, o ACTH e as endorfinas detectados nos linfócitos, assim como os receptores de citocinas (IL-1, TNF- α , IL-2 e IL-6) em células das glândulas endócrinas e do cérebro (McCann et al., 2000; Weyts et al., 1999).

Esta interação entre sistemas imune e endócrino não está bem definida, porém, é evidenciada por diversos estudos, não só agindo durante situações de estresse, mas também para manter a homeostasia durante o desenvolvimento e as condições basais do animal (McCann et al., 2000; Weyts et al., 1999).

Os glicocorticosteróides (GS), o ACTH e as endorfinas desempenham papel único durante o estresse. Em geral, a ação dos glucocorticóides (cortisol nos teleósteos) junto com as catecolaminas habilita o organismo a responder rapidamente às mudanças do ambiente e aos ataques dos agentes patogênicos (Barton & Iwama, 1991; Schreck et al., 2001; Flanagan et al., 2003).

O efeito do cortisol sobre o sistema imune pode ser imunoestimulante ou imunossupressor, dependendo do processo estudado, dos tipos de células e da quantidade de moduladores envolvidos. Por exemplo, o cortisol pode estimular a morte de linfócitos novos, durante sua diferenciação ou, em linfócitos já diferenciados, após sua ação sobre um patógeno. A estimulação depende do estágio de diferenciação celular e do grau de ativação dos linfócitos. Sua administração pode influenciar a distribuição dos leucócitos circulantes, diminuir sua concentração e aumentar o número de neutrófilos. Dessa forma, as populações de leucócitos são redistribuídas para os órgãos submetidos a estresse ou sob tratamento com cortisol (Weyts et al., 1999).

A liberação de catecolaminas, primariamente epinefrina (adrenalina), pelo SC na circulação, após a estimulação simpática do tecido secretor, acontece, de certa forma, antes da completa ativação do eixo HPI. As catecolaminas provêm de diferentes áreas nos peixes, mais particularmente das células cromafim localizadas na glândula adrenal. O tecido cromafim é innervado diretamente por fibras ganglionares simpáticas. Já o HPI necessita que o hipotálamo libere um tipo de neuropeptídeo denominado CRF (fator liberador da corticotrofina), que age na síntese e na liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise (Itoi et al., 2004; Van Enkevort et al., 2000; McCann et al., 2000). O ACTH necessita de tempo para percorrer a circulação até o tecido inter-renal, onde estimula a síntese e a secreção dos hormônios glucocorticóides (cortisol nos teleosteos). Juntos, catecolaminas e cortisol iniciam os fatores de respostas secundária e terciária do estresse (Barton & Iwama, 1991; Schreck et al., 2001; Flanagan et al., 2003).

Um aspecto marcante da resposta secundária é a mobilização de substratos ricos em energia pela depreciação das reservas de glicogênio hepático e elevação do nível plasmático de glicose (Vijayan et al., 1997). Pode também ser observado efeito sobre os níveis circulantes de ácidos graxos livres e sobre a

inibição da síntese protéica. A partir desse ponto de vista, o estresse pode ser encarado como um processo antianabólico. A resposta secundária também se manifesta por meio de um desequilíbrio hidromineral, causado pela redução na capacidade da regulação osmótica que resulta em ganho de água nos peixes de água doce e perda de água em peixes de água salgada (Ruane et al., 2002; Barton & Iwama, 1991).

As concentrações de eletrólitos (cloro, sódio e potássio) também podem ser afetadas produzindo carga alostática. Ainda não está claro se isto é uma resposta direta a um fator de estresse primário ou se acontece passivamente, devido ao fluxo de água. O estresse também influencia diversos mecanismos do sistema imune, deprimindo a capacidade imunológica dos peixes. O principal mecanismo de ação na redução da resistência a doenças é pelo efeito supressivo sobre o número ou função dos linfócitos circulantes. Os efeitos negativos de estresse crônico ou severo sobre o sistema imune já estão bem estabelecidos, sendo atribuídos, principalmente, aos corticosteróides (Barton & Iwama, 1991; Weyts et al., 1999; Schreck et al., 2001).

Existem numerosas respostas terciárias, resultantes das primárias e secundárias, como, por exemplo, alterações no crescimento, na taxa metabólica e na resistência a doenças, tolerância térmica, tolerância a hipóxia, performance de natação e capacidade reprodutiva (Schreck et al., 2001). Em geral, os fatores terciários são conseqüências derivadas da ação dos hormônios e substâncias que participam de todas as comunicações dos sistemas endócrino e imune. Normalmente, resultam em uma elevada produção de radicais livres, caracterizando um quadro de estresse oxidativo.

3.3 Radicais livres e antioxidantes na dieta de larvas e pós-larvas

A larvicultura é o período da produção em que a larva passa por uma metamorfose, atingindo o estágio juvenil, assumindo a forma de um peixe adulto

(Nakatani et al., 2001). Durante essa fase, as larvas apresentam trato digestório mais simples do que o dos adultos, no entanto, têm capacidade de crescimento de 10% a 100% por dia (Tesser et al., 2006). Também nesta fase se concentram os maiores problemas relacionados com a produção das espécies nativas, sendo difícil proporcionar condições adequadas, que suportem o rápido desenvolvimento (Luz & Zaniboni-Filho, 2002).

A larvicultura é uma fase em que o peixe apresenta grande sensibilidade, necessitando de bom suporte nutricional, visto que é quando se concentra uma alta taxa de mortalidade e de deformações, decorrentes do mal desenvolvimento corporal. Um aspecto importante na larvicultura é o fornecimento de alimentos capazes de sustentar o crescimento e o desenvolvimento do animal. Conseqüentemente, a formulação de uma dieta apropriada para suprir as deficiências nutricionais e metabólicas se torna essencial para o sucesso da produção (Smith et al., 2004b).

A ação de um antioxidante é a de reduzir ou neutralizar o efeito de alguns radicais livres que, em altas concentrações, promovem um desequilíbrio metabólico. Fang et al. (2002) definem os radicais livres como moléculas que apresentam elétrons não pareados na órbita externa, sendo moléculas instáveis e muito reativas, derivadas, principalmente, do oxigênio e de aminoácidos (Figura 2).

A completa redução do oxigênio para H_2O pela citocromo oxidase é um passo essencial para a formação de ATP. No entanto, a redução parcial do oxigênio resulta na formação de diversas formas de oxigênio reativo, moléculas que apresentam grandes riscos para os componentes celulares (Hermes-Lima et al., 2001). Esse processo metabólico é ainda mais agravante nas larvas e pós-larvas, por apresentarem desenvolvimento muito acelerado.

Os radicais de maior risco para o organismo são o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}). Essas três formas

intermediárias são responsáveis pela toxicidade do oxigênio (Fridovich, 1998). Já o óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO₂) são dois radicais livres nitrogenados derivados dos aminoácidos (Fang et al., 2002).

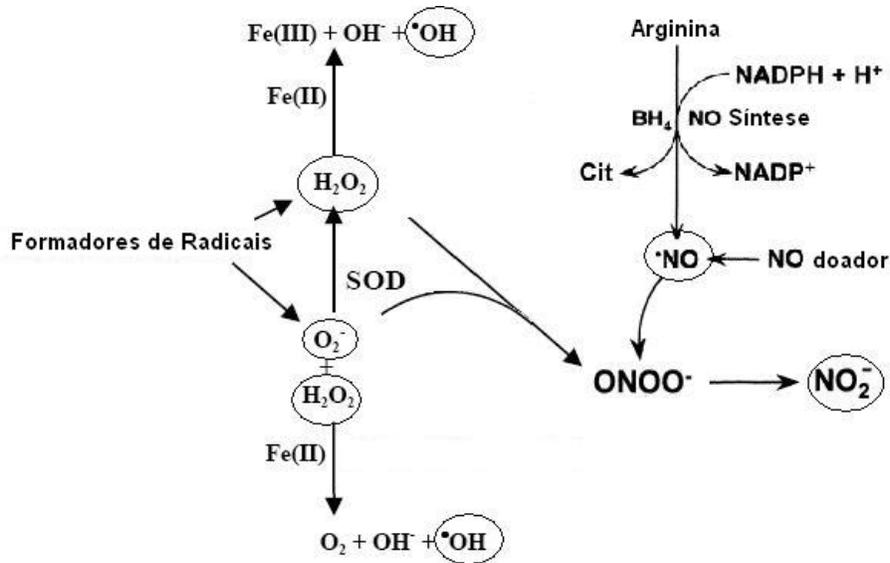


FIGURA 2 Principais reações precursoras de radicais livres (adaptado de Fang et al., 2002; Hermes-Lima et al., 2001).

Tanto as espécies de oxigênio reativo (ROS) quanto as de nitrogênio reativo (RNS) são produzidas constantemente pelo metabolismo animal, exercendo importante papel. São mediadores de diversas respostas celulares, agindo como mensageiros específicos. No sistema imunológico, são gerados pelos macrófagos e neutrófilos e atuam como antibactericida e antiviral (Lander, 1997).

Entretanto, altas concentrações de radicais livres podem ocasionar a oxidação de biomoléculas (Fang et al., 2002), proporcionando um quadro de estresse oxidativo. Esse estresse influencia diretamente a inativação de enzimas

e de estruturas moleculares, como DNA, proteínas, aminoácidos e lipídios constituintes da membrana celular (Tocher et al., 2002).

Diversas substâncias exercem papel de antioxidantes fisiológicos, podendo ser endógenas ou exógenas e solúveis em água ou em óleo. Os componentes de origem endógena são NADH, NADPH, glutathione (GSH), ácido úrico, glutathione peroxidase (GPX) e alguns grupos de proteínas. Os antioxidantes de origem exógena são o α -tocoferol e o ácido ascórbico. Atualmente, as vitaminas C e E são muito exploradas, por serem antioxidantes fisiológicos de origem exógena (Tocher et al., 2002), podendo ter sua concentração facilmente manipulada na dieta.

3.4 Vitamina C

A vitamina C, também chamada de ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel necessária para a maioria das espécies aquáticas criadas em viveiros (Smith et al., 2004a). O ácido ascórbico tem importante papel no desenvolvimento dos vertebrados; sua eficiência estende-se ao crescimento, resistência ao estresse e no metabolismo de toxinas (Dabrowski et al., 1988).

As reservas de vitamina C sofrem rápido declínio durante o desenvolvimento das larvas (Gouillou-Coustans et al., 1998), sendo esta fase a mais crítica devido ao rápido crescimento e à alta adaptação ao ambiente. No entanto, são escassos os dados sobre exigências da vitamina C para as primeiras alimentações das pós-larvas. Os estudos mais comuns são realizados em peixes de água fria (Gouillou-Coustans et al., 1998).

A necessidade de uma fonte exógena desta vitamina é atribuída à ausência da gulonolactona oxidase, que é a enzima responsável pela conversão do ácido glucurônico em ácido ascórbico (Smith et al., 2004a). Mesmo os peixes que sintetizam essa vitamina, em certas circunstâncias, não são capazes de sintetizá-la na velocidade necessária (Gouillou-Coustans et al., 1998).

A exigência da vitamina C pode variar conforme a espécie, a fase de desenvolvimento, o metabolismo dos peixes e a quantidade de outros nutrientes na dieta, assim como a vitamina E (Chen et al., 2004). Em larvicultura, os resultados são muito contraditórios, sendo observadas respostas de 20 a 100 mg de vitamina C por kg de ração durante o desenvolvimento e até 1.000 mg de vitamina C contra as consequências do estresse (Okamura et al., 2007).

O ácido ascórbico é um forte antioxidante metabólico; por ser solúvel em água, protege o metabolismo das reações de oxidação, realizadas pelos radicais livres. Por conseguinte, é uma vitamina muito instável e, durante sua estocagem, pode ser oxidada ao reagir com outros nutrientes presentes na ração (Shiau & Hsu, 2002).

As formas comerciais mais utilizadas são os ascorbil fosfatados e o ascorbil palmitato, devido à maior estabilidade molecular, prolongando seu tempo de estocagem. Os ascorbil fosfatados, por serem hidrossolúveis, são comumente utilizados em péletes de ração, enquanto o ascorbil palmitato, por ser lipossolúvel, é utilizado em emulsões para enriquecer zooplânctons e artêmias (Smith et al., 2004a).

O ascorbil palmitato (Figura 3) é um derivado anfipático do ácido ascórbico que mantém suas características antioxidantes (Humeau et al., 1998) e proporciona estabilidade molecular maior (Pinnell, 2002). Sua estrutura consiste em uma cadeia hidrofóbica de ácido palmítico e uma parte polar composta pelo ácido ascórbico (Pokorski et al., 2004). É sintetizado por uma reação enzimática de esterificação entre o ácido palmítico e o ácido ascórbico, que é realizada por algumas lipases. Atualmente, existem diversos estudos testando o rendimento de diferentes lipases capazes de sintetizar o ascorbil palmitato. Entre as lipases testadas, estão as originadas da *Cândida antártica* (Humeau et al., 2000), *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas cepacia* e, com baixo rendimento, as lipases extraídas do pâncreas de suínos (Bradoo et al., 1999).

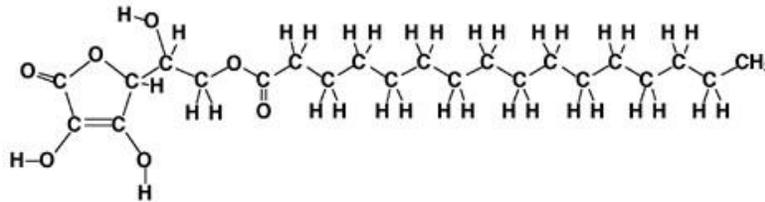


FIGURA 3 Estrutura molecular do ascorbil palmitato (Fonte: Casiday & Frey, 2007).

A absorção do ascorbil palmitato pelo trato digestório não está bem definida. Ross et al. (1999) afirmam que o ascorbil palmitato em humanos é todo hidrolizado a ácido ascórbico; no entanto, May et al. (1996) afirmam que o ascorbil palmitato é parcialmente absorvido na sua forma íntegra.

Experimentos mais recentes, realizados com gatos, revelaram que o ascorbil palmitato pode ser absorvido pelo sistema digestório e retido nos tecidos neurais, sem sofrer mudanças estruturais nessa espécie de animais (Pokorski et al., 2003). Smart & Crawford (1991) também observaram grande eficiência da suplementação de ascorbil palmitato na dieta de ratos.

May et al. (1996) relatam que o ascorbil palmitato apresenta eficiência superior em prevenir danos ao metabolismo, causados pelo estresse oxidativo, quando comparado com o ácido ascórbico. Os autores sugerem que o ácido palmítico serve como carreador do ascorbato, facilitando seu transporte em meio lipofílico, otimizando, dessa forma, o seu efeito antioxidante.

No entanto, mesmo que o ascorbil palmitato seja parcialmente absorvido na sua forma íntegra, é de comum acordo entre os autores que a grande maioria seja absorvida ou metabolizada em ácido ascórbico. Pokorski et al. (2003) sugerem que a fração lipossolúvel de ascorbato presente no metabolismo pode ser posteriormente disponibilizada em ácido ascórbico, por meio do processo de hidrolização realizado pela lipase-esterase extracelular e intracelular.

O ácido ascórbico no metabolismo é facilmente oxidado pelos radicais livres, assumindo a forma não ativa denominada de ácido dehidroascórbico (Deutsch & Kolhouse, 1993). No metabolismo animal, o ascorbato assume diferentes formas, o que dificulta o estudo da oxidação e redução dessa vitamina.

Karlsen et al. (2005) propõem cinco diferentes estruturas para a vitamina C: a) ácido ascórbico, forma reduzida e mais ativa; b) forma iônica do ácido ascórbico; c) radical livre ascorbil, forma oxidada da vitamina; d) ácido dehidroascórbico, segunda forma oxidada da vitamina e e) ácido 2,3-dicetogulônico, após sofrer a última oxidação suportada pela vitamina, sendo essa uma reação irreversível (Figura 4).

A capacidade de transformação de ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico ocorre por um sistema óxido redutor, funcionando como um transportador de hidrogênio em nível celular. Essa característica permite que ele participe em reações de oxi-redução, na biossíntese das catecolaminas, de colágenos e da carnitina (Peake, 2003; Manela-Azulay et al., 2003).

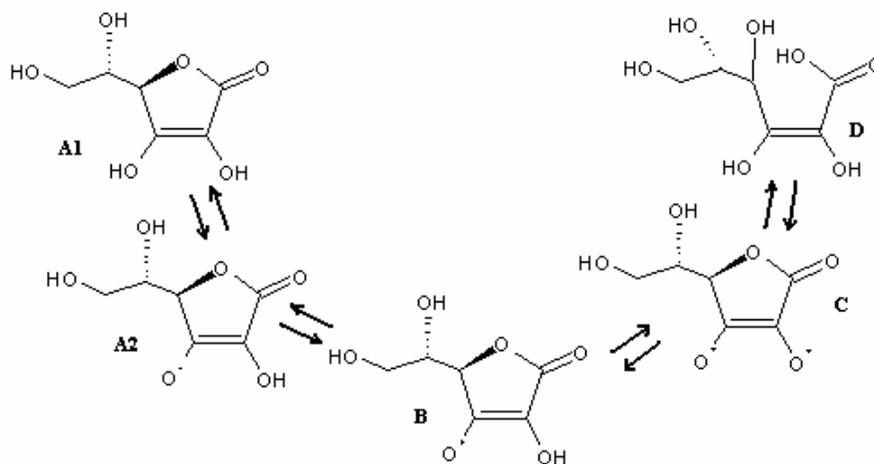


FIGURA 4 Formas estruturais encontradas no metabolismo: A1=ácido ascórbico, A2=forma iônica do ácido ascórbico, B=radical livre ascorbil, C=ácido dehidroascórbico e D=ácido 2,3-dicetogulônico (Fonte: Karlsen et al., 2005).

O efeito da vitamina C é muito estudado em peixes; altas dosagens podem prevenir problemas de deformidades, cicatrização e melhorar o ganho de peso, além de prevenir contra o estresse e auxiliar na resistência contra bactérias patogênicas. Em geral, atua como suporte para o desenvolvimento e o sistema imune, refletindo na sobrevivência das pós-larvas (Merchie et al., 1996; Gapasin et al., 1998; Lavens et al., 1999; Smith et al., 2004b).

A vitamina C exerce um papel de co-fator na biossíntese do colágeno tipo I e III, influenciando no processo de hidroxilação da prolina e da lisina (Nakagawa et al., 2000). A lisil e a prolil hidroxilase catalisam a hidroxilação dos resíduos lisil e prolil nos polipeptídios de colágenos, e essa modificação pós-translacional permite a formação e estabilização da tripla hélice, possibilitando a subsequente eliminação do procolágeno no meio extracelular. A lisil e a prolil hidroxilase são enzimas férricas e a vitamina C previne a oxidação do ferro, evitando a sua auto-inativação. Dessa forma, promove a síntese de

colágenos maduros por intermédio da manutenção da atividade enzimática (Manela-Azulay et al., 2003) (Figura 5).

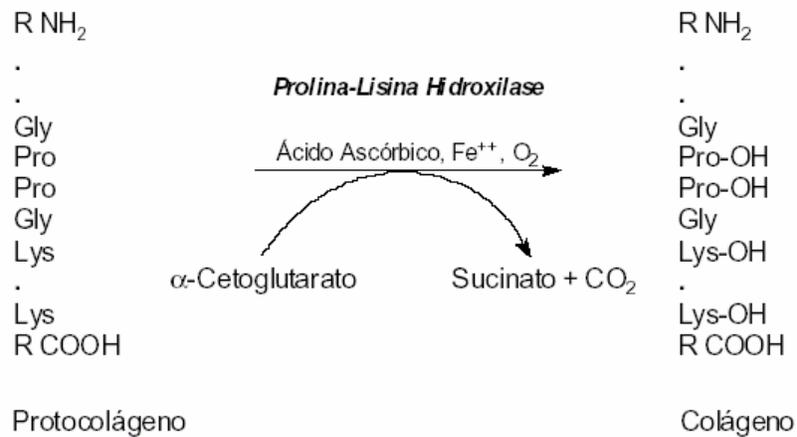


FIGURA 5 Interação do ácido ascórbico e a lisil e proil hidroxilase (Fonte: Rotta, 2003).

Portanto, lordose, escoliose e malformação do esqueleto são alguns dos sintomas da deficiência de ascorbato (Dabrowski et al., 1990; Dabrowski, 1990). Cahu et al. (2003) relatam grande sensibilidade do catfish a baixas concentrações de vitamina C, influenciando no seu desenvolvimento. Larvas de carpa-capim alimentadas com dietas ausentes de ácido ascórbico apresentaram arqueamento opercular e deformidade nas nadadeiras (Dabrowski et al., 1988).

A síntese da carnitina é outro metabolismo da vitamina C relacionado com o desenvolvimento, pois exerce importante papel no metabolismo de energia. A carnitina é responsável pelo transporte de alguns ácidos graxos de cadeia longa para o interior das mitocôndrias, onde, posteriormente, pela beta-oxidação, são utilizados como fonte de energia (Burtle et al., 1991). O ácido ascórbico atua sobre duas enzimas responsáveis pela conversão da lisina em carnitina (Peake, 2003) (Figura 6).

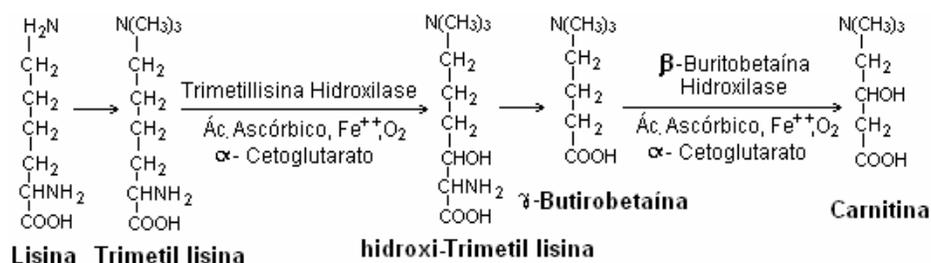


FIGURA 6 Participação do ácido ascórbico na biossíntese da carnitina (Fonte: Rotta, 2003).

Outro importante papel da vitamina C é em função do metabolismo do estresse. As liberações dos corticosteróides e das catecolaminas influenciam o equilíbrio catiônico e aniônico, o que gera um desequilíbrio osmorregulatório. Essas alterações metabólicas resultam em diminuição da sua capacidade de resposta inflamatória e a resistência às doenças (Barton & Iwama, 1991; Andrés et al., 1999 ;Frisch & Anderson, 2000).

Alguns estudos com imunostimulantes têm sugerido que a vitamina C pode interferir em um ou ambos os eixos (hipotalâmico-simpático-cromafim e hipotalâmico-hipofisário-adrenal) que mediam a resposta ao estresse (Dabrowski et al., 1994; Ortuño et al., 2003).

Na glândula adrenal, o ácido ascórbico auxilia na biossíntese da noradrenalina e atua mantendo o cobre reduzido nas células cromafins. A forma reduzida é necessária para a atuação da dopamina β -monoxigenase, responsável pela conversão da dopamina em noradrenalina. De maneira semelhante, atua na hipófise, interagindo com o cobre e a peptidil glicina α -amidante monoxigenase, melhorando a síntese e a liberação de diversos neuropeptídeos e fatores de liberação hormonal (Peake, 2003).

Verlhac & Gabaudan (1994) sugerem que o aumento da disponibilidade de ácido ascórbico pode prevenir a severidade da resposta ao estresse nos peixes, beneficiando a respiração celular e, com isso, equilibra o funcionamento

do metabolismo nessas situações. Em peixes submetidos ao estresse, as alterações hematológicas, geralmente, são acompanhadas de hiperglicemia (Tavares e Morais, 2004), relacionada com a liberação de cortisol e outros hormônios, principalmente as catecolaminas (Mommsen et al., 1999).

O efeito do ácido ascórbico na biossíntese ou na liberação do cortisol ainda é muito contraditório. Acredita-se que essa vitamina atue como suporte para a síntese do cortisol, que é sintetizado através do colesterol pelo estímulo do ACTH. A reação é iniciada com um oxigênio e um par de elétrons fornecido pelo NADPH. Essa transferência de elétrons pode gerar radicais superóxidos que inibem a ação da CYP11B1 (11- β -hidroxilase) no último passo da síntese do cortisol (Figura 7). O ácido ascórbico neutraliza os radicais de superóxidos, controlando a síntese de cortisol (Peake, 2003).

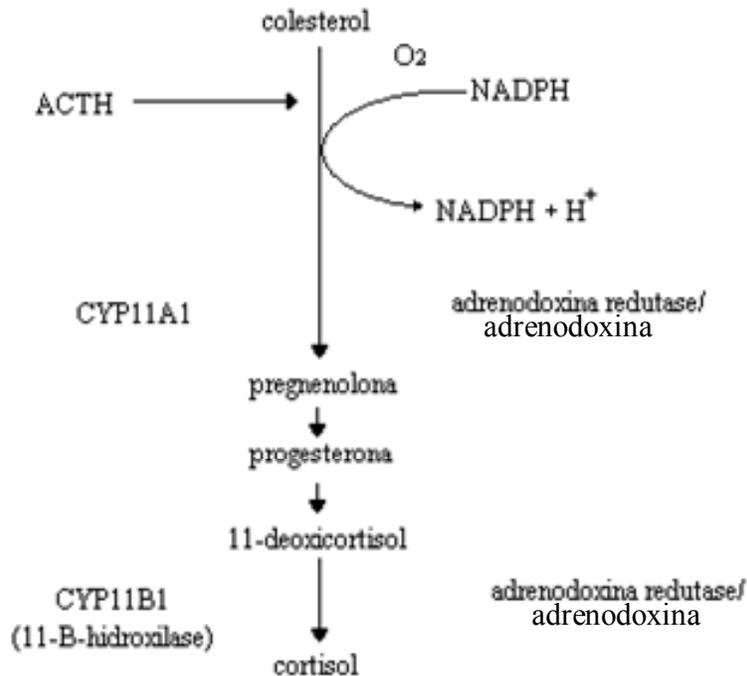


FIGURA 7 Biossíntese do cortisol (Fonte Peake, 2003).

No entanto, no metabolismo, a vitamina C pode inibir a liberação do cortisol. O ácido ascórbico pode neutralizar os radicais livres derivados dos efeitos das catecolaminas, evitando o estresse oxidativo e melhorando a recuperação por atenuar o efeito do estresse (Figura 8) (Peake, 2003).

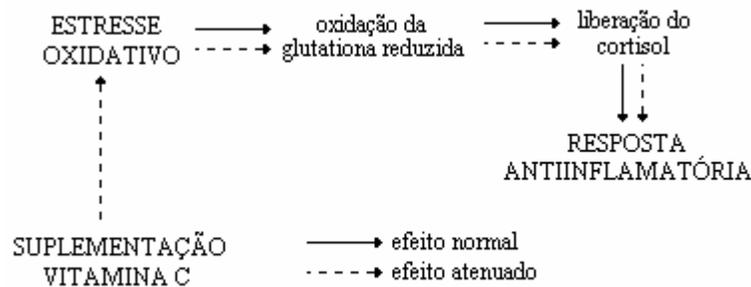


FIGURA 8 Ação da vitamina C sobre a liberação do cortisol (Fonte: Peake, 2003).

3.5 Vitamina E

A vitamina E é um grupo de potentes antioxidantes lipossolúveis. Sua análise estrutural revela que sua ação antioxidante está relacionada a oito diferentes estruturas, quatro tocoferóis (α , β , γ e δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ e δ). A forma mais comum e ativa encontrada na natureza é α -tocoferol (Figura 9). Suas funções específicas não são bem elucidadas (Lee & Dabrowski., 2004), em geral, são relacionadas ao seu potencial antioxidante, não sendo atribuído outro papel específico a esta vitamina (Brigelius-Flohé & Traber., 1999; Meydani et al., 2005).

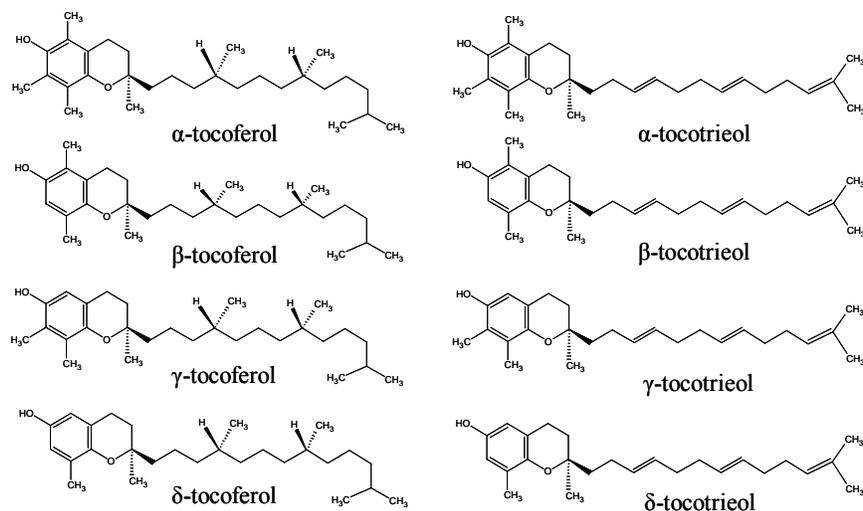


FIGURA 9 Formas estruturais da vitamina E (Fonte: Meydani et al., 2005).

Estudos relatam que a vitamina E reage com radicais livres e moléculas de oxigênio, prevenindo a peroxidação dos lipídios, das proteínas e de outras substâncias. Devido ao seu alto poder antioxidante e ao seu caráter lipofílico, se torna o principal antioxidante presente em depósitos de gordura, nas lipoproteínas, no fígado e nos lipídios constituintes das membranas celulares (Shiau & Hsu, 2002; Chen et al., 2004).

A exigência por esta vitamina varia conforme a espécie e o hábitat do peixe, entretanto, pesquisas mostram que a exigência é maior quando a dieta apresenta alto teor de óleo, devido à capacidade desta vitamina de proteger os ácidos graxos poliinsaturados, durante sua absorção e metabolismo (Huang et al., 2004).

Segundo Lee & Dabrowski (2004), em situações de deficiência, o fígado é responsável por disponibilizar a vitamina E armazenada nos tecidos. Dessa forma, diminui a concentração desta vitamina no tecido, no qual exerce importante função na membrana celular, mantendo a integridade estrutural dos lipídios que a compõem e apresentando um efeito imunorregulatório, além de

evitar o rompimento celular, o qual é caracterizado pelo escurecimento do tecido (Ruff et al., 2003; Meydani et al., 2005). Sendo assim, o fígado apresenta uma alta concentração de vitamina E, devido ao metabolismo dos lipídios e as próprias funções metabólicas que este órgão desempenha.

Ham & Liebler (1997), estudando a peroxidação de lipídios no fígado de ratos, adicionaram in-vitro 2 mM de tri-butilhidroperóxido (t-BuOOH) por 10 minutos. Constatou-se que, nos tratamentos contendo vitamina E, as mudanças metabólicas ocasionadas pela adição do t-BuOOH foram minimizadas. Observaram também a oxidação do α -tocoferol, formando α -tocoferolquinona, α -tocoferolhidroquinona, 2,3-epoxi- α -tocoferolquinona e 5,6-epoxi- α -tocoferolquinona (Figura 10), relatando uma concentração decrescente do α -tocoferol conforme a concentração dos produtos de sua oxidação aumentava. Conseqüentemente, reduziu a peroxidação dos lipídios e manteve-se um controle respiratório constante em âmbito mitocondrial. Estes resultados sugerem que o α -tocoferol exerce importante papel de regulador das funções metabólicas no fígado, em situações de estresse oxidativo.

Segundo Jain et al. (2000), alta concentração de tocoferol é eficiente em reduzir as concentrações de radicais livres no meio intracelular. Essa redução é capaz de preservar algumas enzimas antioxidantes, como a glutatona e a catalase na sua forma reduzida em eritrócitos humanos, mantendo alta atividade de ambas as enzimas no meio intracelular.

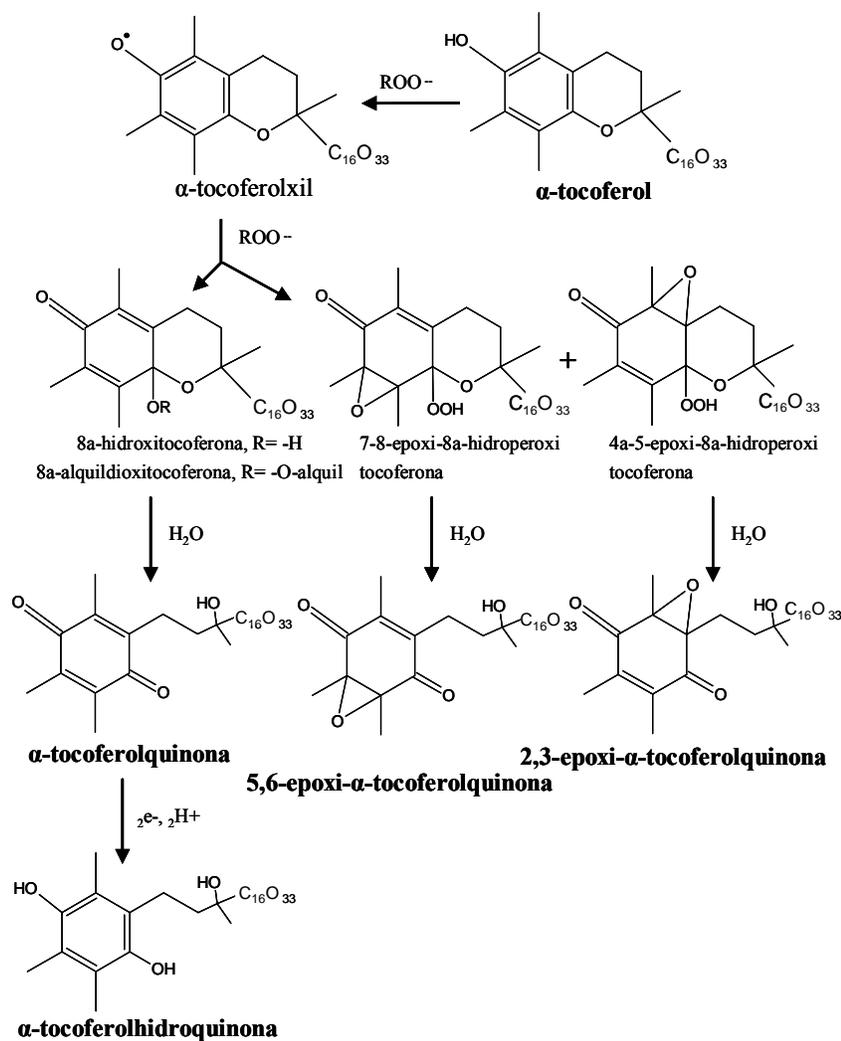


FIGURA 10 Formas estruturais da vitamina E oxidada (Fonte: Brigelius-Flohé & Traber, 1999).

Bowry et al. (1992) relatam, em seus estudos, o efeito pró-oxidante do tocoferol. O tocoferol é oxidado por diferentes radicais livres, formando os radicais tocoferil. Esses radicais são reduzidos em tocoferol por outros antioxidantes, principalmente o ácido ascórbico (em meio aquoso) e a ubiquinona (em meio lipofílico).

Altas concentrações de tocoferol e de radicais livres acarretam o aumento de radicais tocoferil, que reagem com o ácido ascórbico ou a ubiquinona para serem regenerados. Com a deficiência de ambos antioxidantes os radicais de tocoferol assumem um papel de agente oxidante, caracterizando seu efeito antagônico de pró-oxidante (Bowry et al., 1992).

Os sinais de deficiência desta vitamina estão relacionados com a degeneração decorrente da peroxidação dos lipídios e de seus derivados, sendo queda no ganho de peso, degeneração muscular, hemorragia cutânea, escurecimento da pele, ineficiência reprodutiva, degeneração lipídica do fígado e, conseqüentemente, maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e infecções (Barros, 2002; Izquierdo et al., 2001; Chen et al., 2004). Esses sinais são mais evidentes na fase de reprodução das matrizes e desenvolvimento das larvas submetidas a um sistema intensivo de produção.

3.6 Ácido ascórbico x α -Tocoferol

A interação entre o ácido ascórbico e o α -tocoferol é muito pesquisada. Estudos sugerem uma relação em âmbito celular, entre a membrana e o citosol (Chan, 1993 apud Shiau & Hsu, 2002). Essa relação é atribuída à capacidade da vitamina C em reciclar a vitamina E, partindo dos radicais oxidados do tocoferol. Tal relação é observada em diversas espécies de peixes (Emata et al., 2000; Ji et al., 2003).

É proposto que o α -tocoferol tenha sua cadeia fitil posicionada na região interna da membrana, na parte hidrofóbica, enquanto o grupo OH (reativo e polar) reside próximo ou junto à superfície da membrana celular, ficando, assim, acessível aos componentes solúveis em água, como o ácido ascórbico. Este pode reduzir o radical do α -tocoferolxil (Figura 11) formado quando o α -tocoferol doa um H para um peróxido de lipídio. Os produtos formados pela reação do ácido

ascórbico e o α -tocoferolxil são um radical ascorbil e um α -tocoferol (ácido dehidroascórbico e a vitamina E, respectivamente).

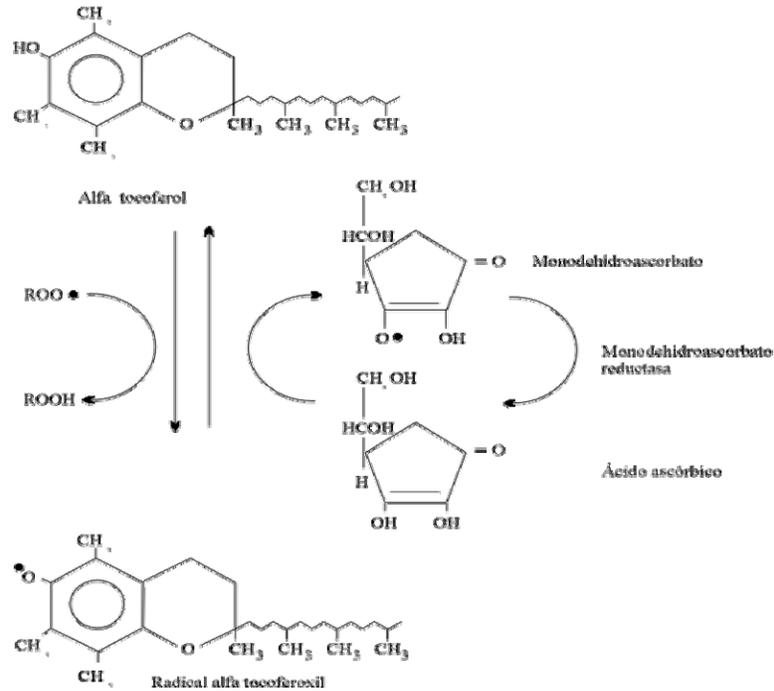


FIGURA 11 Redução do α -tocoferolxil em α -tocoferol pelo ácido ascórbico (Fonte: Rodríguez, 1997).

Dessa forma, a adição de vitamina C inibe a perda do α -tocoferol presente nas membranas, atrasando a oxidação dos lipídios, conseqüentemente protegendo as membranas celulares (Figura 12). Esse mecanismo de ação sugere que os radicais produzidos nas membranas celulares são transportados para a fase aquosa via vitamina E e vitamina C (Hamre et al., 1997; Buettner, 1993).

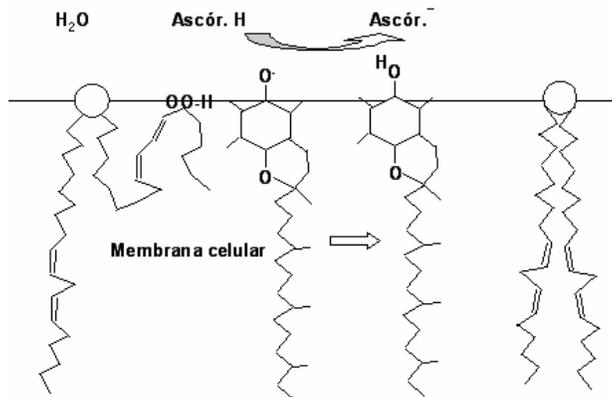


FIGURA 12 Posição e regeneração do α -tocoferol na membrana celular (Fonte: Buettner, 1993).

Estudos relatam que a deficiência de vitamina C reduz a concentração de vitamina E no fígado dos peixes. Autores atribuem essa redução a dois fatores, o primeiro devido ao papel de antioxidante exercido pela vitamina C atuando nos radicais livres e, conseqüentemente, protegendo a vitamina E, e o segundo, à ação direta da vitamina C na recuperação da vitamina E (Lee & Dabrowski, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação do ascorbil-palmitato como fonte de vitamina C e sua interação com o tocoferol-acetato, foram testadas três concentrações de ascorbil-palmitato combinadas com duas concentrações de tocoferol-acetato em seis diferentes rações experimentais.

Para a determinação das formas de vitamina C mais presentes no metabolismo das larvas e o efeito de ambas as vitaminas no desenvolvimento e no estresse, foram realizados dois experimentos. O primeiro determinou o efeito do ascorbil palmitato e do tocoferol acetato sobre o desenvolvimento das larvas de dourado, sendo desenvolvido nos primeiros 17 dias de vida das larvas de dourado. O segundo experimento avaliou o efeito do ascorbil-palmitato e do tocoferol acetato sobre o cortisol total após o teste de estresse realizado nas larvas de dourado ao término do primeiro experimento.

4.1 Local

Os experimentos foram conduzidos na Estação Ambiental de Volta Grande, da Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), município de Conceição das Alagoas, MG, Brasil. A estação ambiental dispõe de um laboratório de piscicultura com três divisões: sala de reprodução, larvicultura e de análises química e biológica.

A sala de reprodução usada é composta por 11 aquários de aproximadamente 1.000 litros de capacidade total e 20 incubadoras cilíndricas de 300 litros de capacidade total. Para a larvicultura, foi utilizado um galpão fechado, onde foram adaptadas 24 caixas de fibra de vidro com 0,61 x 0,44 x 0,40 m de diâmetro superior, diâmetro da base e altura, respectivamente e capacidade total de 100 litros.

Cada caixa experimental foi provida de um abastecimento de água sob pressão. O abastecimento de água foi coberto por redes de 50 μm para evitar a entrada de plâncton. Para a saída da água, foram instalados flanges no centro da base das caixas, os quais foram cobertos com uma rede de 400 μm , para evitar a fuga das larvas. No escoamento da água foi utilizado um sistema do tipo “cotovelo de PVC” (Figura 13).



FIGURA 13 Caixas experimentais para a larvicultura do dourado.

Durante todas as fases experimentais, reprodução e larvicultura, foi adotados um sistema aberto de abastecimento de água, responsável pela renovação constante da água. O fluxo de água nas caixas experimentais era suficiente para a troca total da água em uma hora de renovação.

4.2 Material biológico

Foram utilizadas 7.200 larvas de dourado recém-eclodidas, com $1,03 \pm 0,09$ mg de peso inicial e $0,6 \pm 0,013$ cm de comprimento total, provenientes de reprodutores da própria Estação Ambiental de Volta Grande. A reprodução foi estimulada com extrato bruto de hipófise de carpa. Após a fertilização, os embriões foram distribuídos em 3 incubadoras cônicas, com 300 litros de capacidade, sob fluxo de água constante.

Seis horas após a eclosão, as larvas foram contadas e avaliadas individualmente, possibilitando o descarte das larvas com deformidades ou deficiências natatórias. A contagem foi realizada com mangueiras transparentes e baldes de 15 litros de capacidade total, sob aeração constante. Após a triagem, as larvas foram distribuídas nas 24 caixas experimentais, com volume útil de 60 litros de água. Cada caixa acomodou 300 larvas de dourado, apresentando densidade de cinco larvas por litro. Os peixes foram mantidos nas caixas durante os 17 dias experimentais, onde receberam as diferentes dietas experimentais durante 15 dias.

4.3 Rações experimentais

Os tratamentos foram compostos por seis diferentes dietas semipurificadas (Tabela 1), contendo três diferentes níveis de vitamina C (0; 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ração) combinada com dois diferentes níveis de vitamina E (0 e 250 mg kg⁻¹ de ração). A fonte de vitamina C utilizada foi o ascorbil palmitato e a de vitamina E foi o tocoferol acetato. As rações eram isoenergéticas (4.252 kcal kg⁻¹) e isoprotéicas (57% de proteína bruta). A gelatina em pó e a celulose foram utilizadas com a função de aglutinante, e a farinha de peixe e albumina como fonte protéica. O premix vitamínico utilizado na formulação foi manipulado de forma isenta de qualquer fonte de vitamina C e vitamina E.

TABELA 1 Composição das rações experimentais

Ingredientes	Tocoferol acetato					
	0			250		
	Ascorbil palmitato			Ascorbil palmitato		
	0	100	1000	0	100	1000
Farinha de peixe (%) ¹	59,5	59,5	59,5	59,5	59,5	59,5
Albumina (%)	20	20	20	20	20	20
Gelatina (%)	7	7	7	7	7	7
Óleo vegetal (%)	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
Celulose (%)	3,2	3,1	2,2	2,95	2,85	1,85
Fosfato bicálcico (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Premix mineral (%)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Premix vitamínico (%) ²	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Antioxidante BHT (%)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Ascorbil-palmitato (mg kg ⁻¹)	0	100	1000	0	100	1000
Tocoferol-acetato (mg kg ⁻¹)	0	0	0	250	250	250

¹Farinha de resíduo da indústria de filetagem de salmão.

²Composição de 50 g do suplemento vitamínico: Vitamina D3 50.000 UI; Vitamina A 200.000 UI; Vitamina K 1.000mg; Vitamina B12 720mg; Vitamina B1 (tiamina) 720mg; Vitamina B2 (riboflavina) 900mg; Vitamina B6 (piridoxina) 600mg; Biotina 150mg; Ácido fólico 180mg; Pantotenato de Ca 1.800mg; Niacina 3.600mg; Colina 40.000mg.

As rações experimentais foram elaboradas no Laboratório de Nutrição, do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Lavras. Os ingredientes foram pesados em balança analítica e homogeneizados com 40% de água.

A mistura final foi submetida a um moedor de carne sem hélice, assumindo a forma de “macarrão”. Após esses processos, as rações foram secas em temperatura inferior a 35°C e na ausência de luz (Figura 14).

**FIGURA 14** Rações experimentais.

As rações secas foram quebradas em moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo-Te631/1) e separadas em três diferentes granulometrias: menor que 0,5mm, 0,5 a 1mm e 1 a 2,5mm de diâmetro dos péletes (Figura 15).

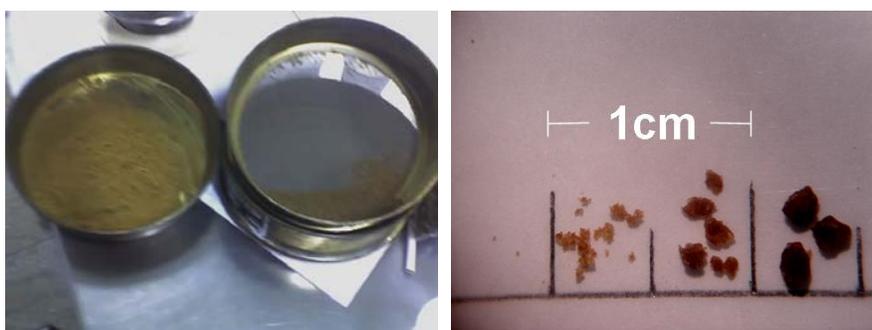


FIGURA 15 Separação e granulometria das rações experimentais.

As concentrações de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA), tocoferol acetato (TA) e alfa-tocoferol presentes na ração estão expressos na Tabela 2.

TABELA 2 Concentração de ascorbil palmitato, ácido ascórbico, tocoferol acetato e alfa-tocoferol, nas seis rações experimentais

VITAMINAS (mg kg ⁻¹ de ração)	Tocoferol acetato					
	0			250		
	Ascorbil palmitato			Ascorbil palmitato		
	0	100	1000	0	100	1000
Ascorbil palmitato	16	115	935	19	117	924
Tocoferol acetato	nd	nd	nd	244	256	257
Alfa-tocoferol	11	6	nd	nd	7	nd
Ácido ascórbico	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: valores não detectados.

Possivelmente, os valores encontrados de alfa-tocoferol são provenientes da farinha de peixe utilizada na confecção das rações, assim como

os valores de ascorbil palmitato nas rações referentes aos tratamentos contendo 0 mg kg^{-1} de suplementação do AP.

4.4 Protocolo alimentar

Nos dois primeiros dias de vida, as larvas de dourado foram alimentadas com larvas de curimba, sendo estimado o fornecimento de quatro larvas de curimba para cada larva de dourado, em um intervalo de três horas. A mudança da alimentação viva pela alimentação seca, referente ao período de adaptação alimentar, foi realizada em cinco dias, compreendidos entre o terceiro e o sétimo dias de vida das larvas de dourado. A partir do oitavo dia de vida, os dourados foram alimentados exclusivamente com as diferentes rações experimentais por um período de dez dias, entre o oitavo e o décimo sétimo dias de vida (Figura 16).

A adaptação alimentar foi dividida em duas fases, sendo a primeira entre o terceiro e o quarto dias e a segunda, entre o quinto e o sétimo dias de vida das larvas de dourado. No terceiro e quarto dias, os dourados foram alimentados com larva de curimba e com as diferentes rações experimentais de maneira consorciada, fornecendo as larvas de curimba e as rações juntas. Nesse período, foram utilizadas as rações com diâmetro inferior a 0,5mm. Entre o quinto e o sétimo dias, as larvas de dourado receberam as larvas de curimba e as rações experimentais alternadamente, tendo as larvas de curimba sido fornecidas em alimentações intercaladas com o fornecimento das rações experimentais. Nessa fase da adaptação alimentar foram utilizadas as rações experimentais com grânulos entre 0,5 e 1 mm de diâmetro. Do oitavo ao décimo sétimo dias, as rações fornecidas apresentavam os péletes com diâmetro entre 1 e 2,5mm.

As larvas foram alimentadas diariamente, por um período de 18 horas, fornecendo-se a primeira alimentação às 7 horas e a última, à 1 hora. Durante a adaptação alimenta, adotou-se um intervalo de alimentação de duas em duas

horas e de quatro em quatro horas no período referente aos dez dias de alimentação, exclusivamente com as rações experimentais.

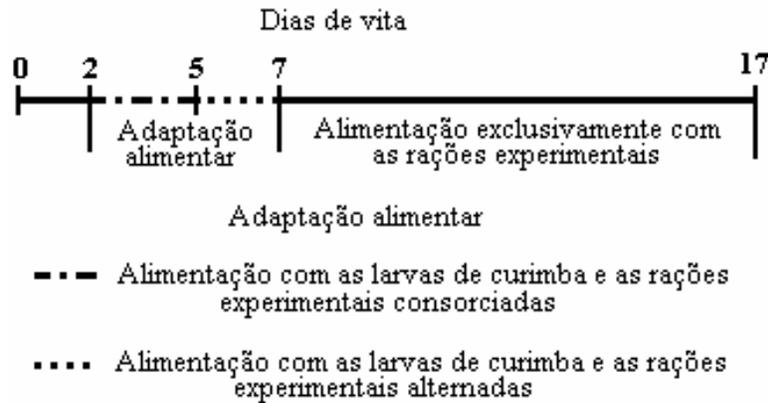


FIGURA 16 Cronograma de alimentação seguindo os dias de vida das larvas de dourado *Salminus brasiliensis*.

4.5 Experimento I

No primeiro experimento avaliaram-se os parâmetros de desenvolvimento e determinaram-se as diferentes formas da vitamina C no metabolismo das larvas de dourado, durante a fase inicial do crescimento. A interação do tocoferol acetato com o ascorbil palmitato foi avaliada durante a adaptação alimentar e no final da fase experimental.

4.5.1 Delineamento experimental

Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, sendo utilizado na parcela um arranjo fatorial (2x3) constituído pela combinação entre duas concentrações de tocoferol acetato (0 e 250 mg kg⁻¹ de ração) e três concentrações de ascorbil palmitato (0, 100 e 1000 mg kg⁻¹ de ração); nas subparcelas foram analisados dois diferentes períodos (5 e 15 dias de alimentação). O primeiro período de coleta foi referente ao término

da adaptação alimentar, sendo larvas submetidas a 5 dias de fornecimento das rações experimentais. O segundo período de coleta foi referente ao término da fase experimental, sendo larvas submetidas a 15 dias de fornecimento das rações experimentais, sendo 5 dias de adaptação alimentar mais 10 dias de alimentação exclusiva com as rações experimentais.

O experimento foi conduzido com 6 tratamentos e 4 repetições, totalizando 24 parcelas avaliadas em dois diferentes períodos. Cada parcela er constituída por 300 larvas de dourado, que foram submetidas a um período experimental de 17 dias, com o fornecimento das rações nos últimos 15 dias.

Modelo estatístico:

$$Y_{ijk_l} = m + T_i + A_j + (TA)_{ij} + D(ij)_k + P_l + (TP)_{i_l} + (AP)_{j_l} + (TAP)_{ij_l} + e_{ijk_l}$$

Sendo:

“ Y_{ijk_l} ” = valor observado no período “ l ”, das larvas submetidas à concentração i de tocoferol acetato e j de ascorbil palmitato, na repetição k ;

“ m ” = média geral do experimento;

“ T_i ” = efeito da concentração do tocoferol acetato, sendo $i = 0$ e 250 mg kg^{-1} ;

“ A_j ” = efeito da concentração de ascorbil palmitato j , sendo $j = 0, 100$ e 1.000 mg kg^{-1} ;

“ $(TA)_{ij}$ ” = efeito da interação entre a concentração i de tocoferol acetato e a concentração j de ascorbil palmitato;

“ $D(ij)_k$ ” = o erro experimental associado à observação de cada parcela, sendo “ k ” as diferentes repetições = 1, 2, 3 e 4;

“ P_l ” = efeito do período “ l ”, sendo $l = 5$ e 15 dias de alimentação;

- “(TP)_i” = efeito da interação entre a concentração *i* de tocoferol acetato e o período ₁;
- “(AP)_j” = efeito da interação entre a concentração *j* de ascorbil palmitato e o período ₁;
- “(TAP)_{ij}” = efeito da interação entre a concentração *i* de tocoferol acetato, *j* de ascorbil palmitato, no período ₁.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote computacional Sistema para Análise de Variância (Sisvar), descrito por Ferreira (2000). As médias foram submetidas ao teste de Student-Newman-Keuls.

4.5.2 Coletas experimentais

Para definir o número de larvas a serem coletadas por parcela, no sétimo dia, antecedendo a primeira coleta, foi realizada uma contagem estimada das larvas sobreviventes. Cada coleta amostral de 8 larvas por parcela representou 16% da população estimada no sétimo dia.

Foram realizadas duas coletas experimentais: A primeira foi realizada após a adaptação alimentar (Figura 16), sendo amostradas 8 larvas com 7 dias de vida em cada parcela. A segunda coleta foi realizada no final do período de alimentação (Figura 16), 10 dias após o término da adaptação alimentar, tendo sido amostradas 8 larvas, com 17 dias de vida, em cada parcela.

As larvas foram sacrificadas imediatamente após a coleta e mantidas em água, a 0°C, por um período não superior a 5 minutos, tempo suficiente para se avaliar os parâmetros de desenvolvimento. Após esse período, as larvas foram armazenadas em grupos de duas larvas por tubo, a -20°C (Figura 17), para futuras análises das vitaminas C.



FIGURA 17 Tubo nos quais as larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) foram armazenadas, em grupos de duas larvas por tubo, a -20°C .

4.5.3 Variáveis analisadas

Os parâmetros liminológicos foram medidos diariamente, durante os 17 dias experimentais. A medição do pH foi realizada com um peagâmetro digital com duas casas decimais de precisão (Bernauer, F-1005); a temperatura e o oxigênio foram medidos com um oxímetro digital portátil, com precisão de duas casas decimais, provido de um sensor de temperatura (Bernauer, F-1550A).

A mortalidade foi determinada pela contagem diária das larvas mortas e pela contagem das larvas remanescentes após os 17 dias de alimentação.

Nas amostras obtidas nas duas coletas foram medidos a altura da cabeça, o comprimento total e o peso, e foram determinadas as concentrações de ascorbil-palmitato (AP), ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (AD), vitamina C reduzida (VR) e vitamina C total (TT) no corpo inteiro das larvas de dourado. A VR foi composta pela soma das concentrações do AP e AA corporais, e a TT foi composta pela soma das concentrações de VR e AD.

4.6 Experimento 2

O segundo experimento foi realizado com as larvas remanescentes do primeiro experimento. As larvas de dourado utilizadas estavam com 17 dias de vida e seguiram o protocolo de alimentação descrito na Figura 16. Após os 17

dias experimentais, as larvas foram submetidas a um teste de estresse definido pela exposição ao ar. O experimento avaliou o efeito de ambas as vitaminas sobre a concentração de cortisol total e determinou as diferentes formas da vitamina C no metabolismo das larvas de dourado, antes e após o estresse.

4.6.1 Delineamento experimental

Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, sendo utilizado na parcela um arranjo fatorial (2x3) constituído pela combinação entre duas concentrações de tocoferol acetato (0 e 250 mg kg⁻¹ de ração) e três concentrações de ascorbil palmitato (0, 100 e 1000 mg kg⁻¹ de ração); nas subparcelas foram analisados dois diferentes períodos (inicial e final). O período inicial analisou as larvas antes do teste de estresse, enquanto o período final analisou as larvas após o teste de estresse.

O experimento foi conduzido com 6 tratamentos e 4 repetições, totalizando 24 parcelas avaliadas em dois diferentes períodos.

Modelo estatístico:

$$Y_{ijk_1} = m + T_i + A_j + (TA)_{ij} + D(ij)_k + P_1 + (TP)_{i_1} + (AP)_{j_1} + (TAP)_{ij_1} + e_{ijk_1}$$

Sendo:

“ Y_{ijk_1} ” = valor observado no período “1”, das larvas submetidas à concentração i de tocoferol acetato e j de ascorbil palmitato, na repetição k ;

“ m ” = média geral do experimento;

“ T_i ” = efeito da concentração do tocoferol acetato, sendo $i = 0$ e 250 mg kg⁻¹;

“ A_j ” = efeito da concentração de ascorbil palmitato j , sendo $j = 0, 100$ e 1.000 mg kg⁻¹;

“(TA)_{ij}” = efeito da interação entre a concentração *i* de tocoferol acetato e a concentração *j* de ascorbil palmitato;

“(D)_{ijk}” = o erro experimental associado à observação de cada parcela, sendo “*k*” as diferentes repetições = 1, 2, 3 e 4;

“(P)₁” = efeito do período “₁”, sendo ₁ = período antes do estresse e período após o estresse;

“(TP)_{i1}” = efeito da interação entre a concentração *i* de tocoferol acetato e o período ₁;

“(AP)_{j1}” = efeito da interação entre a concentração *j* de ascorbil palmitato e o período ₁;

“(TAP)_{ij1}” = efeito da interação entre a concentração *i* de tocoferol acetato, *j* de ascorbil palmitato no período ₁.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote computacional Sistema para Análise de Variância (Sisvar), descrito por Ferreira (2000). As médias foram submetidas ao teste de Student-Newman-Keuls.

4.6.2 Teste de estresse

O teste de estresse foi realizado em um tubo de PVC, com comprimento e diâmetro, respectivamente, iguais a 15 e 20 cm, tendo uma de suas extremidades vedada com rede de 400 µm de abertura. As larvas foram mantidas dentro do tubo de PVC e a extremidade vedada com a rede era imersa e suspensa da água conforme os períodos de exposição ao ar do teste de estresse (Figura 18).

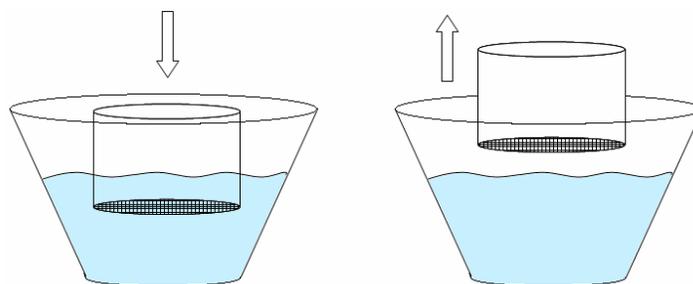


FIGURA 18 Tubo de PVC com a extremidade vedada com rede de 400 μm , imerso na água (esquerda) e suspenso da água (direita), expondo as larvas ao ar.

O teste foi realizado em um grupo de 8 larvas de dourado de cada parcela e foi definido por 2 períodos de exposição ao ar, igual a 3 minutos cada período e 2 períodos de recuperação na água, igual a 5 e 30 minutos. O grupo de 8 larvas foi separado e alocado dentro do tubo de PVC imerso na água. O tubo, então, foi suspenso da água, expondo as larvas ao ar por um período de 3 minutos. Após esse período, o tubo foi imerso na água por um período de 5 minutos, então, o tubo foi novamente suspenso, expondo as larvas ao ar por mais 3 minutos. Após a segunda exposição ao ar, o tubo foi novamente imerso na água por um período de 30 minutos e, então, as larvas foram coletadas para análise do cortisol. Este período de imersão antecedendo a coleta teve o objetivo de esperar uma alta liberação de cortisol no metabolismo das larvas.

4.6.3 Coletas experimentais

Foram coletadas 8 larvas de cada parcela antes do teste de estresse e 8 larvas de cada parcela, após o teste de estresse. As larvas coletadas foram imediatamente sacrificadas e armazenadas em 4 tubos, a -20°C . As larvas foram armazenadas em grupos de duas larvas por tubo (Figura 17), para futuras análises de cortisol total e das diferentes formas da vitamina C.

4.6.4 Variáveis analisadas

Foi determinada a mortalidade das larvas durante o teste de estresse. Nas amostras obtidas nas duas coletas (antes e após o estresse) foram determinadas as concentrações de cortisol, ascorbil-palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (AD), vitamina C reduzida (VR) e vitamina C total (TT), no corpo inteiro das larvas de dourado. A VR foi composta pela soma das concentrações do AP e AA corporais, e a TT foi composta pela soma das concentrações de VR e AD corporais.

4.7 Metodologia analítica

As análises das vitaminas e do cortisol realizado nas larvas e nas rações experimentais foram conduzidas na UFLA, em Lavras, MG, Brasil. A extração do cortisol e das vitaminas foi realizada na Central de Análise e Prospecção Química no Laboratório do Departamento de Química da UFLA. As vitaminas foram determinadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA e o cortisol foi determinado no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária, também da UFLA.

4.7.1 Vitaminas

As análises das vitaminas C e E foram realizadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi da marca Varian, equipado com uma bomba ternária (modelo 9012), um injetor automático (modelo 9300) e o detector empregado foi um espectrofotométrico na região do UV/Vis (modelo 9050). Foi utilizada, em todas as análises, uma coluna C₁₈ (Varian) (250 x 4,6 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna analítica C₁₈. As identificações e as quantificações das vitaminas nas amostras foram realizadas utilizando-se padrões externos. Os procedimentos estão descritos no anexo C.

O ascorbil palmitato, alfa-tocoferol e o tocoferol acetato seguem as metodologias de Freitas & Moretti (2006) e Huo et al. (1996): 0,5 g de amostra foram triturados, homogeneizada e as substâncias foram extraídas com 1 mL de metanol contendo 0,02% de butilhidroxitolueno (fase móvel extratora). Após a extração, o material foi centrifugado (15.000xg a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante foi separado. O processo de extração foi repetido por mais uma vez e os sobrenadantes de ambas as extrações foram misturados. Para a análise no sistema CLAE, 60 µL do homogenato dos sobrenadantes foi purificado em um filtro de sílica C18 e filtrado em membrana 0,45 µm de millipore; depois, uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema. As vitaminas foram detectadas em um comprimento de onda de 280 nm. A fase móvel utilizada foi 100% metanol e o fluxo foi de 1,8 mL min⁻¹.

O ácido ascórbico e o ácido dehidroascórbico seguem a metodologia modificada de Papp et al. (1998): 0,5g de amostra foram triturados, homogeneizados e a extração foi realizada com 1,5 mL de acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ e pH 4,8 (fase móvel extratora). Após a extração, o material foi centrifugado (15.000xg a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante separado. O processo de extração foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes de ambas as extrações foram misturados. Separou-se 1mL do homogenato dos sobrenadantes para a adição de 100µl de acetato de sódio (0,2mol L⁻¹, pH 4,8) e 150µL de ácido perclórico 72%. A mistura foi filtrada com membrana 0,45 µm de millipore e uma alíquota de 20µl foi injetada no sistema CLAE. A fase móvel foi composta por um sal tetrafluorborato de tetrabutilamonio 0,5mM, ácido etilenodiaminotetra acético 0,5mM (sal dissódico), acetato de sódio 0,04M e pH ajustado para 3,76, com o ácido fosfórico 85%. O comprimento de onda foi fixado em 250 nm e o fluxo otimizado em 0,6 ml min⁻¹.

4.7.2 Cortisol

O cortisol foi extraído do corpo inteiro das larvas, seguindo a metodologia de Van Anholt et al. (2004): 50mg de amostra previamente liofilizada e triturada foram homogeneizados em 500 μ L de HCl 0,01M, usando um banho ultrassônico por um período de 10 minutos. Após o banho, as amostras foram centrifugadas (17.300.g, a 5°C, por 10 minutos) e o sobrenadante foi analisado.

A concentração do cortisol foi determinada pelo método ELISA, utilizando-se um Kit CORTISOL ELISA Accu-Bind (cd: 3625-300). A leitura foi realizada por um leitor automático de microplacas com 96 poços (ThermoPlate modelo TP-Reader). O cortisol foi quantificado com uma equação analítica apresentada no anexo D.

4.7.3 Pesos e comprimentos

As medições foram realizadas com um paquímetro e seguiram a metodologia de Nakatani et al. (2001), sendo mensurados o comprimento total e a altura da cabeça (Figura 19).

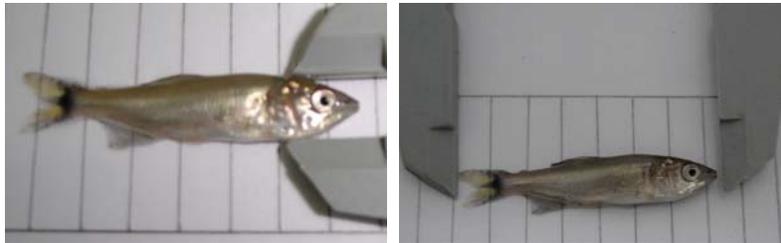


FIGURA 19 Ilustração do comprimento total (figura à direita) e altura da cabeça (figura à esquerda).

As larvas foram pesadas utilizando-se balança de precisão com quatro casas decimais. Foram pesadas oito larvas de cada parcela e as médias foram anotadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento I

Os parâmetros limnológicos se mantiveram constantes durante todo o período experimental. A média geral da temperatura da água foi de $26,8 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$; a amplitude térmica não ultrapassou 4°C , diariamente. O oxigênio dissolvido foi mantido em $5,6 \pm 0,98 \text{ mg L}^{-1}$ e o pH em $7,1 \pm 0,3$.

Não houve diferença significativa na mortalidade entre os tratamentos, durante todo o período experimental. A média estimada das larvas sobreviventes no sétimo dia foi de, aproximadamente, 50 larvas por parcela, representando uma taxa de sobrevivência estimada de 16%, e a sobrevivência média calculada no décimo sétimo dia do trabalho foi de 33 larvas por parcela, representando uma taxa de sobrevivência de 11%.

5.1.1 Concentrações de vitamina C nas larvas de dourado

Os tratamentos foram eficientes em alterar a concentração e o perfil de vitamina C presente nas larvas de dourado. Ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (AD), vitamina C reduzida (VR) e a vitamina C total (TT) determinados no corpo inteiro das larvas apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) conforme os tratamentos fornecidos. A variável TT foi composta pela soma das três vitaminas analisadas, sendo o AP, AA e AD, enquanto a variável VR foi composta pelas duas formas de vitamina C reduzida, sendo AP e AA.

Os níveis de suplementação de ascorbil palmitato na ração (0, 100 e 1.000 mg kg^{-1}) influenciaram as concentrações de todas as formas de vitamina C (AP, AA, VR, AD e TT) determinadas nas larvas de dourado. O mesmo efeito não foi observado para os dois níveis de suplementação do tocoferol acetato, que apresentaram efeito apenas nas concentrações do AD e TT. Os períodos correspondentes à adaptação alimentar (5 dias) e ao fornecimento exclusivo das

rações experimentais (15 dias) influenciaram apenas nas concentrações de AP, VR e AD. A Tabela 3 demonstra as concentrações de AP, AA e AD determinada no corpo inteiro das larvas de dourado alimentadas com as diferentes suplementações de vitamina E e C, nos diferentes períodos de alimentação.

TABELA 3 Concentrações de ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (AD), determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA), durante os dois diferentes períodos experimentais (5 e 15 dias).

Suplementação (mgxkg ⁻¹)	Concentração de vitamina C nas larvas de dourado (µg x g ⁻¹)							
	TA	AP	AP		AA		AD	
			5 dias*	15 dias*	5 dias*	15 dias*	5 dias*	15 dias*
0	0	16,18 aB	17,99 cA	18,96 bA	17,31 bA	8,50 bB	1,33 bA	
		± 0,41	± 0,91	± 1,04	± 0,21	± 2,51	± 0,07	
	100	16,98 aB	19,10 bA	19,37 aA	22,95 aA	11,20 bB	2,92 bA	
		± 0,19	± 0,56	± 0,22	± 2,71	± 3,29	± 0,46	
	1000	17,58 aB	21,43 aA	20,33 aA	21,92 aA	27,56 aB	13,27 aA	
		± 0,70	± 0,57	± 0,92	± 1,00	± 6,97	± 5,91	
Média		18,21 ± 0,75		20,14 ± 0,83		10,79 ± 3,84		
250	0	16,41 aB	18,73 cA	18,08 bA	18,49 bA	14,17 bB	1,79 bA	
		± 0,35	± 0,46	± 0,57	± 0,77	± 5,99	± 0,27	
	100	17,15 aB	20,89 bA	17,43 aA	20,31 aA	17,10 bB	16,40 bA	
		± 0,16	± 0,52	± 0,62	± 1,26	± 5,79	± 2,81	
	1000	17,51 aB	22,38 aA	19,96 aA	21,89 aA	29,48 aB	22,75 aA	
		± 0,83	± 0,25	± 1,34	± 1,73	± 5,03	± 7,11	
Média		18,84 ± 0,95		19,36 ± 0,67		16,94 ± 3,77		
Fonte de variação	Probabilidade > F calculado							
AP		0,00		0,00		0,00		
TA		-		-		0,01		
APxTA ¹		-		-		-		
Cv 1		6,24		11,05		55,76		
PR*		0,00		-		0,01		
PRxAP ¹		0,01		-		-		
PRxTA ¹		-		-		-		
PRxAPxTA ¹		-		-		-		
Cv 2		5,52		13,72		75,49		

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro da mesma suplementação de TA na ração, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha, dentro da mesma forma de vitamina C (AP, AA ou AD), diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

¹interações entre as diferentes fontes de variações.

*Períodos de alimentações (PR), “5 dias”: adaptação alimentar e “15 dias”: larvas do “5º dia” alimentadas por mais dez dias, exclusivamente com as rações experimentais.

As concentrações de AP presentes no corpo inteiro das larvas de dourado foram influenciadas pelo período de alimentação e pela suplementação de ascorbil palmitato, havendo interação significativa entre essas variáveis (valor de P para PRxAP<0,05). As larvas alimentadas por cinco dias com as rações experimentais apresentaram concentração inferior de AP corporal, quando comparadas com as larvas alimentadas por 15 dias. No 15^a dia, as larvas apresentaram concentrações crescentes de AP corporal, conforme os níveis de suplementação de cada tratamento (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹).

As três concentrações de AP suplementadas nas rações influenciaram significativamente nas concentrações de AA corporal, determinado nas larvas de dourado (valor de P para AP<0,05, Tabela 3). As médias das concentrações de AA nos tratamentos suplementados com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato não apresentaram diferença significativa entre si, porém, foram superiores às do tratamento suplementado com 0 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato.

A concentração de AD corporal foi influenciada pelo período de alimentação e pela suplementação do ascorbil palmitato e do tocoferol acetato na ração (valor de P para o PR, AP e TA<0,05), no entanto, não houve interação significativa entre essas fontes de variação. A suplementação de 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato aumentou a concentração de AD nas larvas, quando comparada com as larvas alimentadas com 0 e 100 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. O tocoferol acetato aumentou as concentrações de AD corporal, as larvas que receberam a suplementação do tocoferol acetato apresentaram média geral de AD superior à das larvas que não foram suplementadas, sendo, respectivamente, igual a 16,94 e a 10,79 µg de AD por grama de peso vivo das larvas de dourado (Tabela 3). Quando se observa o período de alimentação, observa-se que as larvas mais novas apresentaram médias superiores de AD corporal quando comparadas as do final do experimento.

As concentrações de AP corporal determinadas nas larvas de dourado comprovaram que o ascorbil palmitato pode, provavelmente, ser absorvido pelo trato gastrointestinal de peixes, sem sofrer variações estruturais. O metabolismo de absorção e armazenamento do ascorbil palmitato em peixes são inferências de estudos realizados com humanos e outros animais.

Embora alguns autores cite que o ascorbil palmitato é totalmente hidrolisado no intestino humano, formando o ácido ascórbico, May et al. (1996) sugerem que uma pequena fração seja absorvida na sua forma íntegra. Afirmam também que a forma lipossolúvel, por ter um acesso facilitado em meio lipofílico, apresenta potencial de ação maior quando comparada com o ácido ascórbico, sua forma hidrossolúvel.

Ross et al. (1999) afirmam que a atuação da vitamina C em meios lipofílicos deve-se a outras moléculas anfipáticas derivadas do ascorbil palmitato durante sua absorção, sendo essas moléculas mais resistentes à hidrólise intestinal. No entanto, Pokorski et al. (2003) observaram, em gatos, a deposição do ascorbil palmitato após o fornecimento na dieta, demonstrando que parte do ascorbil palmitato foi absorvida pelo trato gastrointestinal e depositada sem sofrer mudanças estruturais, assim como no presente estudo.

Continuando seus estudos, Pokorski et al. (2004) descrevem a capacidade do ascorbil palmitato em penetrar nas biomembranas lipídicas, determinando que o ascorbil palmitato foi depositado no tecido neural de gatos, principalmente em células com alta relevância na regulação respiratória. Entretanto, provavelmente, a maior parte do ascorbil palmitato absorvido, seja na forma de ácido ascórbico derivado da hidrolização do ascorbil palmitato, explicando as maiores concentrações de ácido ascórbico (AA) nas larvas de dourado alimentadas com rações contendo a suplementação de 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato.

A maioria dos estudos que avaliam o ascorbil palmitato como fonte de vitamina C para larvas de peixe é realizada com alimentos vivos enriquecidos com o ascorbil palmitato. Os alimentos vivos, como a artêmia salina, apresentam grande capacidade em converter o ascorbil palmitato em ácido ascórbico (Merchie et al., 1995; Merchie et al., 1997). Essa capacidade dos alimentos vivos garante o fornecimento do ácido ascórbico para as larvas de peixes e não diretamente do ascorbil palmitato.

Assim como os crustáceos, as larvas de peixe demonstraram capacidade semelhante em converter o ascorbil palmitato em ácido ascórbico, possivelmente pela ação das lipases, classe de enzimas responsáveis pela dissociação do ascorbil palmitato em ácido ascórbico e ácido palmítico. Em humanos, após a ingestão, o ascorbil palmitato é atacado pelas lipases intestinais, disponibilizando uma molécula ativa de ácido ascórbico (Pizarro et al., 2006). Essas enzimas podem ter sido responsáveis pelo aumento do AA corporal observado nas larvas que receberam os tratamentos suplementados com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato, comparadas às larvas que receberam o tratamento contendo 0 mg kg⁻¹.

A suplementação do ascorbil palmitato pode ter influenciado as concentrações de AD corporal de maneira indireta, provavelmente devido ao aumento nas concentrações de AA corporal. Park et al. (2006) observaram que as concentrações de AD aumentaram, em *Piaractus mesopotamicus* alimentados com rações contendo níveis crescentes de vitamina C. Esse aumento é devido à maior disponibilidade de vitamina C no metabolismo para ser oxidada em AD, no entanto, houve também o efeito da vitamina E sobre as concentrações do AD.

Diversos autores atribuem à vitamina E uma atuação direta na formação de ácido dehidroascórbico. O tocoferol é oxidado por diferentes radicais livres, formando os radicais tocoferil, moléculas de vitamina E com um potencial oxidante. Esse potencial caracteriza o efeito antagônico da vitamina E,

denominado de pró-oxidante metabólico. Esses radicais são reduzidos em tocoferol por outros antioxidantes presentes no metabolismo, principalmente o AA em meio aquoso e a ubiquinona em meio lipofílico (Bowry et al., 1992).

O sinergismo entre o AA e o tocoferol é fundamentado na teoria proposta por Tappel, em 1962, que atribui ao AA o potencial de regenerar os radicais tocoferil em alfa tocoferol (Hamre et al., 1997). Com a redução dos radicais tocoferil em alfa tocoferol ocorre a oxidação do AA em AD, aumentando, dessa forma, as concentrações de AD no metabolismo.

As concentrações de AD determinadas nas larvas de dourado demonstram que a vitamina E aumentou a oxidação do AA em AD, caracterizando o efeito de pró-oxidante da vitamina E relatado por Bowry et al. (1992). Estes autores descrevem a vitamina E como responsável por aumentar as concentrações de radicais tocoferil no metabolismo. Esses radicais influenciaram, de maneira direta ou indireta, na oxidação do AA em AD. Provavelmente, foi de maneira direta, devido à ação do AA na recuperação dos radicais tocoferil, seguindo a teoria proposta por Tappel em 1962 (Hamre et al., 1997).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Chen et al. (2004), ao estudarem *Notemigonus crysoleucas*. Os autores observaram aumento significativo nas concentrações de AD em juvenis alimentados com dietas suplementadas com vitamina E, quando comparados com juvenis não suplementados.

Os dados da Tabela 4 expressam as concentrações de vitamina C reduzida (VR), composta pelo AP e o AA e as concentrações de vitamina C total (TT), composta pelo AP, AA e AD. Esses valores demonstram o efeito que os tratamentos exercem nas concentrações de vitaminas potencialmente ativas (VR) e na absorção e retenção das diferentes formas de vitamina C no corpo das larvas de dourado (TT).

TABELA 4 Concentrações da vitamina C reduzida (VR) e da vitamina C total (TT), determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA), durante dois diferentes períodos experimentais (5 e 15 dias).

Suplementação (mg kg ⁻¹)		Concentração de vitamina C nas larvas de dourado (µg g ⁻¹)			
TA	AP	VR		TT	
		5 dias*	15 dias*	5 dias*	15 dias*
0	0	35,15 ^{aA} ± 1,12	35,30 ^{bA} ± 1,00	43,65 ^{cA} ± 1,68	36,63 ^{cA} ± 1,00
	100	36,36 ^{aB} ± 0,40	42,05 ^{aA} ± 2,28	47,56 ^{bA} ± 3,39	44,98 ^{bA} ± 2,12
	1000	37,92 ^{aB} ± 1,47	43,36 ^{aA} ± 1,31	65,48 ^{aA} ± 7,97	56,63 ^{aA} ± 5,05
Média		38,35 ± 1,44		49,15 ± 4,2	
250	0	34,49 ^{aA} ± 0,31	37,22 ^{bA} ± 0,51	48,67 ^{cA} ± 5,69	39,01 ^{cA} ± 0,76
	100	34,58 ^{aB} ± 0,69	41,20 ^{aA} ± 1,09	51,69 ^{bA} ± 6,40	57,61 ^{bA} ± 3,61
	1000	37,47 ^{aB} ± 1,98	44,27 ^{aA} ± 1,55	66,96 ^{aA} ± 6,67	67,03 ^{aA} ± 8,66
Média		38,20 ± 1,57		55,16 ± 4,47	
Fonte de variação		Probabilidade > F calculado			
AP		0,00		0,00	
TA		-		0,02	
APxTA ¹		-		-	
Cv 1		5,75		16,39	
PR*		0,00		-	
PRxAP ¹		0,05		-	
PRxTA ¹		-		-	
PRxAPxTA ¹		-		-	
Cv 2		7,61		22,48	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro da mesma suplementação de TA na ração, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha, dentro da mesma forma de vitamina C (VR ou TT), diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

¹interações entre as diferentes fontes de variações.

*Períodos de alimentações (PR), “5 dias”: adaptação alimentar e “15 dias”: larvas do “5ª dia” alimentadas por mais dez dias exclusivamente com as rações experimentais.

Foi observada interação significativa entre o período de alimentação e o ascorbil palmitato, nas concentrações da VR (valor de P para PRxAP<0,05). As rações suplementadas com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato foram

eficientes em aumentar as concentrações de VR no corpo inteiro das larvas, após um período de 15 dias de alimentação, apresentando maiores concentrações no 15^a dia. Comparado com o período de 5 dias, esse efeito não foi observado nas larvas que receberam o tratamento contendo 0 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. Conseqüentemente, no 15^a dia, as larvas suplementadas com 100 e com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram maiores concentrações de VR corporal quando comparadas com as larvas não suplementadas (0 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato).

As concentrações de TT corporal sofreram efeito significativo das suplementações de ascorbil palmitato (valor de P para AP<0,05), caracterizando a resposta das larvas às três diferentes dosagens de suplementação do ascorbil palmitato (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹). As concentrações de TT foram crescentes conforme os maiores níveis de suplementação do ascorbil palmitato. A vitamina E também influenciou na capacidade de retenção da vitamina C no metabolismo das larvas. Pôde-se observar o efeito significativo da suplementação de tocoferol acetato (valor de P para TA<0,05), demonstrando diferença entre as médias obtidas nas duas diferentes suplementações (0 e 250 mg kg⁻¹). As larvas suplementadas com o tocoferol acetato apresentaram maiores concentrações de TT do que as larvas não suplementadas, sendo, respectivamente, iguais a 55,16 e 49,15 µg de vitamina C por grama de peso vivo das larvas de dourado.

Esses resultados demonstram que a suplementação de 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato foi capaz de aumentar a concentração de TT presente no corpo inteiro das larvas. A diferença observada de TT foi conseqüência do aumento das concentrações de AD e pelas concentrações de AP e de AA, representada pela VR, terem se mantido inalteradas.

Possivelmente, essa maior concentração de TT está relacionada com o efeito da vitamina E em manter o ascorbato em sua forma reduzida e ou oxidada, melhorando o metabolismo de oxidação e redução do ascorbato. A

influência que o tocoferol exerce nas concentrações de TT no peixe pode estar relacionada com a interação existente no metabolismo entre o alfa tocoferol, AD, AA e a glutathione.

O sinergismo entre os AA e o tocoferol foi proposto por Tappel, em 1962, atribuindo ao AA a capacidade de regenerar os radicais tocoferil em alfa tocoferol (Hamre et al., 1997). A hipótese de Tappel justifica que maiores concentrações de alfa tocoferol são responsáveis por aumentar as concentrações de AD e diminuir as concentrações de AA ou de AP (VR corporal). Isso porque, com a redução dos radicais tocoferil em alfa tocoferol, ocorre a oxidação da vitamina C reduzida (VR) em AD. No entanto, foi observado, nos tratamentos contendo a suplementação de tocoferol acetato, o aumento do AD, enquanto que as concentrações de VR foram mantidas inalteradas. O metabolismo responsável pela recuperação do AD em AA ou em vitamina C potencialmente ativa envolve a vitamina E. Esse metabolismo pode explicar por que as concentrações de VR não diminuíram na presença da vitamina E.

O último passo da oxidação do ascorbato no metabolismo de peixes e crustáceos é definido pela conversão do AD em ácido 2,3-dicetogulônico. Essa é uma reação irreversível que indisponibiliza o ascorbato e, posteriormente, pode ser hidrolisado em oxalato e treonato (Conklin, 1989; O'Keefe, 2001; Mitra & Mukhopadhyay, 2003). Em humanos, a reação de oxidação completa do ascorbato é responsável por 30% a 50% do oxalato excretado (Ogawa et al., 2000; Baxmann et al., 2003). Entretanto, no metabolismo, o AD é preferencialmente transportado para o meio intracelular pela GLUT 1 e GLUT 3, no qual são reduzidos principalmente pela glutathione, retornando à sua forma de AA (Peake, 2003), mantendo as concentrações de AA altas.

A vitamina E melhora os mecanismos que inibem a oxidação completa do ascorbato, agindo contra a peroxidação lipídica e restabelecendo a atividade de enzimas antioxidantes, como a glutathione e a catalase (Thamilselvan et al.,

2003; Thamilselvan & Menon, 2005). Dessa forma, minimiza a perda da vitamina C pela sua completa oxidação. Segundo Jain et al. (2000), altas concentrações de tocoferol são eficientes em reduzir as concentrações de radicais livres totais no meio intracelular. Essa redução foi capaz de preservar a glutathione na sua forma reduzida em eritrócitos humanos, mantendo alta a atividade da glutathione no meio intracelular.

Hamre et al. (1997) determinaram uma interação positiva entre a suplementação de vitamina C e vitamina E na dieta de peixes. Observaram que doses maiores de tocoferol acetato (300 mg kg^{-1}) aumentam a atividade da glutathione em 20% e a concentração de AA em 50%, no fígado do salmão-do-atlântico. Entretanto, esse aumento é minimizado quando se observam as concentrações de AA no corpo inteiro dos peixes.

Esse efeito foi observado em outros estudos que relacionaram o efeito do alfa-tocoferol sobre a concentração da vitamina C presente nos peixes. Sealey & Gatlin (2002) determinaram que a suplementação de vitamina E (entre 30 e 300 mg kg^{-1}) melhorou as concentrações de vitamina C plasmática em juvenis de striped bass não suplementados. Kolkovski et al. (2000) encontraram a mesma relação entre ambas as vitaminas, ao determinarem o ascorbato no corpo inteiro de larva de *Stizostedion vitreum*.

O equilíbrio do balanço de oxidação e redução entre a glutathione-AA-AD-tocoferol pode ser responsável pelo aumento das concentrações de TT, aumentando as concentrações de AD e mantendo altas as concentrações de VR nos tratamentos contendo tocoferol acetato.

Pôde-se concluir que a suplementação de ascorbil palmitato na dieta foi eficiente em aumentar as concentrações de AA e AD corporal, nos primeiros cinco dias de alimentação. Provavelmente, a absorção do ascorbil palmitato em peixes é realizada, em grande parte, na forma de AA, obtendo-se, dessa forma, uma resposta mais rápida nas concentrações de AA, como observado nas larvas

suplementadas com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato, e uma resposta menos sensível das concentrações de AD, como observado apenas nas larvas suplementadas com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. Já as concentrações do AP corporal diferiram entre si apenas no 15^a dia de alimentação, sendo necessário um período mais prolongado de alimentação (15 dias) para caracterizar o efeito das três concentrações testadas de ascorbil palmitato (0, 100 e 1000 mg kg⁻¹).

Durante o desenvolvimento, o tocoferol acetato aumentou as concentrações de AD e TT corporal nas larvas de dourado. A suplementação com 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato preservou as VR, ao mesmo tempo que aumentou as concentrações de AD determinado nas larvas de dourado. As concentrações de AD e VR foram responsáveis pelo aumento significativo nas concentrações de TT. Esses resultados caracterizaram um efeito pró-oxidante do tocoferol acetato ao aumentar as concentrações de AD corporal, e um efeito antioxidante ao manter o equilíbrio do sistema de oxidação e redução da vitamina C no metabolismo dos peixes, preservando inalteradas as concentrações do AP e do AA.

5.1.2 Mesometria das larvas de dourado

Para a avaliação do desempenho, foram medidos o comprimento total, a altura da cabeça e o peso das larvas de dourado. Todos os parâmetros apresentaram diferença significativa apenas das três diferentes suplementações de ascorbil palmitato (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹) e dos dois períodos avaliados (5 e 15 dias de alimentação). O tocoferol acetato não influenciou significativamente em nenhuma das três medidas utilizadas para avaliação do desempenho.

Os dados das Tabelas 5, 6 e 7 demonstram as médias do comprimento total, da altura da cabeça e do peso obtidos nas larvas de dourado que receberam

as três diferentes suplementações de ascorbil palmitato (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹), nos dois diferentes períodos experimentais.

TABELA 5 Comprimento total (cm) das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.

Suplementação de ascorbil palmitato (mg kg ⁻¹)	Período de fornecimento das rações experimentais	
	5 dias	15 dias
0	2,851 ^a ± 0,138	3,931 ^b ± 0,233
100	2,867 ^a ± 0,116	4,235 ^a ± 0,137
1000	3,025 ^a ± 0,150	4,333 ^a ± 0,235
CV	18,43	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro do mesmo período de alimentação, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

No 5^a dia de alimentação com as rações experimentais não houve diferença significativa entre as médias do comprimento total observadas nas larvas de dourado. No entanto, com 15 dias de alimentação, as larvas dos tratamentos contendo as suplementações de 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram médias superiores ao tratamento contendo 0 mg kg⁻¹.

TABELA 6 Altura da cabeça (cm) das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.

Suplementação de ascorbil palmitato (mg kg ⁻¹)	Período de fornecimento das rações experimentais	
	5 dias	15 dias
0	0,552 ^{ab} ± 0,026	0,717 ^c ± 0,036
100	0,542 ^b ± 0,035	0,751 ^b ± 0,026
1000	0,580 ^a ± 0,034	0,788 ^a ± 0,047
CV	18,43	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro do mesmo período de alimentação, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Em um curto período de alimentação (5 dias), o ascorbil palmitato foi eficiente em aumentar a altura da cabeça, nas larvas do tratamento suplementado com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato, quando comparado ao tratamento contendo 100 mg kg⁻¹ de suplementação. As larvas do tratamento sem suplementação de ascorbil palmitato (0 mg kg⁻¹) apresentaram uma média intermediária, sendo igual significativamente às larvas dos tratamentos com 100 e 1.000 mg kg⁻¹. No 15^a dia de alimentação, pôde-se observar uma diferença significativa entre as três médias obtidas das larvas de todos os tratamentos, tendo as médias de altura da cabeça aumentado conforme as concentrações crescentes de ascorbil palmitato suplementado na ração.

TABELA 7 Peso (gramas) das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*), alimentadas com dietas contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato na ração, nos períodos de 5 e 15 dias de alimentação.

Suplementação de ascorbil palmitato (mg kg ⁻¹)	Período de fornecimento das rações experimentais	
	5 dias	15 dias
0	0,211 ^a ± 0,028	0,619 ^b ± 0,103
100	0,193 ^a ± 0,034	0,719 ^a ± 0,077
1000	0,233 ^a ± 0,038	0,741 ^a ± 0,110
CV	18,43	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro do mesmo período de alimentação, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

As médias do peso das larvas não apresentaram diferença significativa no 5^a dia de alimentação. No entanto, no 15^a dia, as larvas alimentadas com a suplementação de 0 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram menor média de peso, quando comparadas com as larvas dos tratamentos contendo 100 e 1.000 mg kg⁻¹.

Xie & Niu (2006) citam que a vitamina C está envolvida em diversos sistemas enzimáticos, sendo necessária para a formação do colágeno e do tecido conectivo e que ambos são essenciais para um rápido desenvolvimento. Esses autores, estudando juvenis de *Plecoglossus altivelis*, observaram alta interação

entre a produção de hidroxiprolina e as concentrações de ácido ascórbico. Definiram que a produção de hidroxiprolina na pele e na espinha responde à dosagem de até 30 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico na ração e que os sinais clínicos de deficiência nessa espécie ocorrem com dosagens menores que 22 mg kg⁻¹. Essa concentração pode variar conforme a fonte de vitamina C utilizada na dieta e a espécie estudada.

Outro fator relacionado ao desenvolvimento é a biossíntese da carnitina. Ozório (2001) relata que a biossíntese da carnitina necessita de dois aminoácidos (lisina e metionina), três vitaminas (ascorbato, niacina e B6) e um metal (ferro na forma reduzida). O'Keefe (2001) descreve que a vitamina C é necessária para a hidrólise da carnitina em peixes. Seguindo a mesma hipótese, Ji et al. (2003) afirmam que a vitamina C e os ácidos graxos de cadeia longa exercem importante papel na lipólise em peixes.

Ozório (2001) observou que a carnitina foi eficiente em otimizar a utilização dos lipídios da dieta de catfish, melhorando a relação proteína/energia e aumentando o crescimento de larvas e juvenis de catfish. Schuhmacher & Gropp (1998) também observaram melhoras no desenvolvimento da truta arco-íris alimentada com dietas contendo suplementação de carnitina.

No entanto, a ação da vitamina C no desenvolvimento é composta pelo conjunto de diversas rotas metabólicas. Em larvas de dourado, a vitamina C foi eficiente em melhorar o comprimento total e o peso após 15 dias de alimentação com as diferentes dietas.

Chagas & Val (2003) observaram que concentrações superiores a 100 mg kg⁻¹ de vitamina C não surtiram efeito sobre o ganho de peso em tambaqui, enquanto Li et al. (1998) encontraram a concentração máxima de dose/resposta equivalente a 50 mg kg⁻¹ para catfish. Gouillou-Coustans et al. (1998) não detectaram respostas no crescimento de carpa comum para concentrações superiores a 90 mg kg⁻¹. As larvas de dourado apresentaram respostas

semelhantes, pois doses superiores a 100 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato na ração não apresentaram diferença significativa para o comprimento e peso final. No entanto, a altura da cabeça demonstrou ser mais sensível às concentrações de vitamina C na larvicultura, visto que apresentou resposta aos tratamentos com 5 dias de alimentação. A cabeça das larvas de dourado apresenta um rápido desenvolvimento inicial (Nakatani et al., 2001), podendo estar mais susceptível ao efeito dos tratamentos nos primeiros dias de vida. No entanto, a concentração de 0 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato apresentou valor intermediário, possivelmente devido ao efeito das larvas de curimba fornecidas nos primeiros dias de alimentação e nos cinco dias de adaptação alimentar.

5.2 Experimento II

O teste de estresse foi realizado com a temperatura da água de $27,82 \pm 0,81^\circ\text{C}$ e a amplitude térmica não ultrapassou $1,2^\circ\text{C}$ diário. O oxigênio dissolvido foi mantido em $4,6 \text{ mg L}^{-1}$ e o pH em 7,1.

Não houve diferença significativa na mortalidade entre os tratamentos durante o teste de estresse. Das 192 larvas desafiadas pelo teste de estresse, foram contabilizadas 2 larvas mortas; a taxa de sobreviventes calculada das larvas de dourado após o teste de estresse foi igual a 98,9%.

5.2.1 Concentrações de vitamina C nas larvas de dourado

Os tratamentos foram eficientes em alterar a concentração e o perfil de vitamina C determinada nas larvas de dourado submetidas ao teste de estresse. Ascorbil palmitato (AP), ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (AD), vitamina C reduzida (VR) e a vitamina C total (TT) presentes no corpo inteiro das larvas apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) conforme os tratamentos fornecidos. A variável TT foi composta pela soma das três

vitaminas analisadas, sendo AP, AA e AD, enquanto a variável VR foi composta pelas duas formas de vitamina C reduzida, sendo AP e AA.

Os níveis de suplementação de ascorbil palmitato na ração (0, 100 e 1.000 mg kg⁻¹) influenciaram as concentrações de todas as formas de vitamina C analisadas (AP, AA, AD, VR e TT). O mesmo efeito não foi observado para os dois níveis de suplementação do tocoferol acetato, que apresentaram efeito apenas nas concentrações da VR. Os períodos correspondentes ao teste de estresse, antes do teste (inicial) e após o teste (final), influenciaram as concentrações de AP, AA, AD e TT, porém, não influenciaram nas concentrações de VR. Os dados da Tabela 8 referem-se às concentrações de AP, AA e AD determinada no corpo inteiro das larvas de dourado alimentadas com as diferentes suplementações de vitaminas nos diferentes períodos de alimentação.

TABELA 8 Concentrações de ascorbil-palmitato (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido dehidroascórbico (AD) determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) antes (inicial) e após (final) o teste de estresse.

Suplementação (mgxkg ⁻¹)		Concentração de vitamina C nas larvas de dourado (µg x g ⁻¹)					
TA	AP	AP		AA		AD	
		Inicial*	Final*	Inicial*	Final*	Inicial*	Final*
0	0	17,99 ^{bA} ± 0,91	16,97 ^{bB} ± 0,29	17,31 ^{bA} ± 0,21	15,77 ^{bA} ± 0,30	1,33 ^{aA} ± 0,07	5,81 ^{bA} ± 1,63
	100	19,10 ^{aA} ± 0,56	18,12 ^{aB} ± 0,58	22,95 ^{aA} ± 2,71	23,99 ^{aA} ± 0,53	2,92 ^{aB} ± 0,46	37,66 ^{aA} ± 11,2
	1000	21,43 ^{aA} ± 0,57	18,34 ^{aB} ± 1,46	21,92 ^{aA} ± 1,00	24,94 ^{aA} ± 1,78	13,27 ^{aB} ± 5,91	59,20 ^{aA} ± 18,1
Média		18,65 ± 18,05		21,14 ± 20,01		20,03 ± 11,93	
250	0	18,73 ^{bA} ± 0,46	17,60 ^{bB} ± 0,02	18,49 ^{aB} ± 0,77	24,60 ^{aA} ± 0,38	1,79 ^{aA} ± 0,27	4,22 ^{bA} ± 0,19
	100	20,89 ^{aA} ± 0,52	18,63 ^{aB} ± 1,08	20,31 ^{aB} ± 1,26	25,22 ^{aA} ± 0,82	16,40 ^{aA} ± 2,81	12,19 ^{bA} ± 7,65
	1000	22,38 ^{aA} ± 0,25	18,76 ^{aB} ± 0,62	21,89 ^{aA} ± 1,73	21,97 ^{aA} ± 1,17	22,75 ^{aB} ± 7,11	91,39 ^{aA} ± 15,2
Média		19,49 ± 18,96		22,08 ± 22,16		24,79 ± 8,65	
Fonte de variação		Probabilidade > F calculado					
AP		0,00		0,00		0,00	
TA		-		-		-	
APxTA ¹		-		0,00		-	
Cv 1		7,98		13,04		81,60	
PR*		0,00		0,00		0,00	
PRxAP ¹		-		-		0,00	
PRxTA ¹		-		0,03		-	
PRxAPxTA ¹		-		0,01		0,03	
Cv 2		7,03		10,33		66,85	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro da mesma suplementação de TA na ração, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha, dentro da mesma forma de vitamina C (AP, AA ou AD), diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

¹interações entre as diferentes fontes de variações.

*Períodos experimentais (PR), “inicial”: larvas de dourado antes do teste de estresse e “final”: larvas de dourado após do teste de estresse.

As concentrações de AP corporal foram influenciadas pela suplementação de ascorbil palmitato na ração (valor de P para AP<0,05) e pelos períodos experimentais (valor de P para PR<0,05). As larvas de dourados que receberam as rações suplementadas com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil

palmitato apresentaram concentrações maiores de AP corporal, quando comparadas com as larvas que receberam as rações contendo 0 mg kg^{-1} . As larvas referentes ao período inicial (antes do teste estresse) apresentaram concentrações de AP corporal superiores às concentrações de AP determinadas nas larvas referentes ao período final (após o teste de estresse).

Foi observada uma interação significativa nas concentrações do AA corporal entre os períodos experimentais e as suplementações de ambas as vitaminas (valor de P para $PR \times AP \times TA < 0,05$). Nos tratamentos ausentes de tocoferol acetato, as suplementações de 100 e 1.000 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato foram capazes de aumentar as concentrações de AA determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado, quando comparadas com as concentrações de AA corporal presentes nas larvas alimentadas com 0 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato. As larvas alimentadas com rações contendo 250 mg kg^{-1} de tocoferol acetato com as suplementações de 0 e 100 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato apresentaram concentrações superiores de AA corporal no período final, quando comparadas com as larvas desses tratamentos no período inicial (Tabela 8).

Houve uma interação significativa entre os tratamentos nas concentrações de AD corporal. Essa forma de vitamina C também foi influenciada pelos períodos e pelas suplementações de ambas as vitaminas (valor de P para $PR \times AP \times TA < 0,05$). As larvas referentes ao período final, alimentadas com a ração não suplementada com as vitaminas E e C (0 mg kg^{-1} de tocoferol acetato e de ascorbil palmitato), apresentaram concentrações menores de AD corporal, quando comparadas com as larvas alimentadas com rações contendo os dois níveis de suplementações do ascorbil palmitato (0 mg kg^{-1} de tocoferol acetato e com 100 e 1.000 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato).

Nesse mesmo período final e nos tratamentos contendo 250 mg kg^{-1} de tocoferol acetato, as larvas alimentadas com as rações suplementadas com 0 e 100 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato apresentaram concentrações menores de AD

corporal, quando comparadas com as larvas alimentadas com a suplementação de 1.000 mg kg⁻¹. As larvas alimentadas com as rações contendo as suplementações de 0 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato e a suplementação de 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram concentrações superiores de AD corporal no período final, comparadas às larvas desses tratamentos no período inicial (Tabela 8).

As concentrações de AP corporal determinadas nos dourados demonstraram que os tratamentos contendo as suplementações de 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato foram mais eficientes em incorporar o AP no metabolismo dos dourados. Os dois períodos avaliados, antes e após o estresse, caracterizaram que o estresse proporcionou o consumo do AP presente no corpo dos dourados, pois as concentrações de AP corporal determinadas antes foram superiores às determinadas após o teste de estresse.

A fisiologia do estresse é marcada pela liberação de diversos hormônios que atuam no metabolismo, disponibilizando grande quantidade de energia e proporcionando elevada concentração de radicais livres. As catecolaminas e os corticosteróides exercem grande influência no metabolismo de energia, durante o estresse (Van Heeswijk et al., 2005).

O metabolismo dos peixes responde aos estímulos das catecolaminas de maneira diferente, quando comparado ao dos mamíferos. As catecolaminas em peixes atuam em β -adrenoreceptores, que geram respostas opostas das lipases presentes no tecido adiposo com as lipases presentes no tecido hepático (Van Heeswijk et al., 2006). No fígado, as catecolaminas estimulam a atividade das lipases por meio da ativação do β_2 -adrenoreceptores, enquanto que a atividade das lipases nos adipócitos é inibida devido à ação dos β_1 e β_3 -adrenorreceptores (Van Den Thillart et al., 2002).

A redução do ascorbil palmitato durante o estresse pode ser referente à conversão do mesmo em AA, devido à atividade da lipase hepática. Essa reação, provavelmente, é irreversível. Dessa forma, uma vez que o AP corporal é convertido em AA ou em AD, não retorna a sua forma lipofílica de ascorbil palmitato. Essa redução nas concentrações de AP pode explicar as concentrações encontradas de AA e AD presente nas larvas de dourado, nos diferentes períodos de coleta, inicial e final.

A concentração do AA corporal foi menor nos dourados alimentados com ração sem a suplementação de ambas as vitaminas (0 mg kg^{-1} de tocoferol acetato e 0 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato), quando comparadas com as larvas dos outros dois tratamentos auxentes de tocoferol acetato (0 mg kg^{-1} de tocoferol acetato com 100 e com 1.000 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato). Essa diferença não foi significativa nas concentrações de AA determinadas nas larvas de dourado suplementadas com 250 mg kg^{-1} de tocoferol acetato, demonstrando que a vitamina E proporcionou um aumento nas concentrações de AA corporal presentes nas larvas alimentadas com 0 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato. Esse aumento foi suficiente para igualar com as concentrações de AA corporal determinada nas larvas alimentadas com 100 e 1.000 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato.

No meio intracelular, a reação de redução do AD em AA é realizada, em grande parte, pela glutathione. Essa reação permite a recuperação do AD em AA (Peake, 2003). A vitamina E é eficiente em reduzir as concentrações de radicais livres totais no meio intracelular (Jain et al., 2000). Dessa forma, inibe a peroxidação lipídica e restabelece a atividade de enzimas antioxidantes, como a glutathione e a catalase (Thamilselvan et al., 2003; Thamilselvan & Menon, 2005). Hamre et al. (1997) observaram que salmões alimentados com vitamina C e E apresentaram aumento de 20% na atividade da glutathione e 50% na concentração de AA hepático. Provavelmente, o tocoferol acetato foi eficiente

em neutralizar os radicais livres no meio intracelular, restabelecendo a atividade da glutatona que melhorou a conversão do AD em AA corporal, aumentando as concentrações de AA presentes no metabolismo dos dourados.

O teste de estresse proporcionou um aumento nas concentrações de AA corporal nos dourados alimentados com a suplementação de 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 0 e 100 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. Os dourados que receberam esses tratamentos apresentaram um aumento nas concentrações de AA corporal após o teste de estresse, quando comparadas com os dourados antes do estresse.

Rios-Durán et al. (2006), simulando o transporte de três horas do *Chirostoma estor*, não encontraram diferença significativa nas concentrações de AA presente no fígado, gônadas, músculo e nas brânquias, que caracterizasse o efeito do estresse. Li et al. (1998), submetendo bagre-do-canal ao estresse, também não observaram diferença significativa nas concentrações de AA sérico e hepático durante o estresse dessa espécie. A diferença nas concentrações de AA foi relacionada apenas com a suplementação da vitamina C, observando que maiores concentrações de vitamina na dieta proporcionaram maiores concentrações de AA nos peixes submetidos e não submetidos ao estresse. Apesar de as concentrações de AA nas larvas de dourado parecerem contraditórias, esses autores não utilizaram o ascorbil palmitato como fonte de vitamina C na dieta, tendo o AA sido a única forma de vitamina C reduzida (potencialmente ativa) encontrada nos peixes de ambos os trabalhos.

O presente trabalho utilizou o ascorbil palmitato como fonte de vitamina C, sendo essa forma de vitamina uma segunda fonte de vitamina C reduzida. Quando se observa a VR, constata-se que os efeitos do estresse observado pelos autores estão de acordo com o observado nas larvas de dourado.

Após o estresse, os tratamentos contendo 0 e 100 mg kg⁻¹ apresentaram uma redução nas concentrações de AP corporal (Tabela 8), que acompanhou o

aumento do AA corporal. Caracteriza-se, assim, que o estresse influenciou apenas na transformação do AP para o AA, não influenciando na concentração da VR (AP + AA), como pode ser observado na diferença não significativa entre os períodos inicial e final demonstrado na Tabela 9.

Apesar de o teste de estresse por exposição ao ar proporcionar uma grande diferença numérica entre as concentrações de AD, pôde ser observada diferença significativa entre os períodos inicial e final apenas nos tratamentos contendo as suplementações de 0 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato e 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. O aumento na concentração de AD observado nesses tratamentos proporcionou, no período final, concentrações de AD maiores, em comparação com as demais suplementações.

A concentração de AD caracterizou a oxidação do AA durante o estresse. Essa reação de oxidação é decorrente da síntese das catecolaminas e do cortisol, além de reações com os radicais livres produzidos pelo metabolismo sob efeito das catecolaminas. Dessa forma, esse parâmetro pode ser relacionado com uma rápida resposta ao estresse ou a deficiência de outros antioxidantes metabólicos (Deutsch & Kolhouse, 1993; Dabrowski et al., 1994; Fridovich, 1998; Ortuño et al., 2003).

O aumento do AD corporal observado durante o estresse pode ser devido ao equilíbrio do sistema de oxidação e redução realizado pelo metabolismo. A vitamina E pode aumentar a atividade da glutatona, que é responsável por recuperar o AD em AA (Peake, 2003; Thamilselvan et al., 2003; Thamilselvan & Menon, 2005), e pode também atuar como pró-oxidante metabólico, oxidando o AA em AD (Hamre et al., 1997).

Durante uma rápida necessidade do peixe em utilizar um antioxidante metabólico, como é o caso do estresse, o ciclo de oxidação e redução existente entre a vitamina C e E utilizando a glutatona como intermediária pode

estabelecer um equilíbrio entre ambas às vitaminas. Dessa forma, nos tratamentos em que a vitamina C foi suplementada em maiores concentrações que a vitamina E, foi observado o aumento nas concentrações do AD, devido à utilização da vitamina C como antioxidante. Já, nos tratamentos em que a suplementação de vitamina E foi maior do que a suplementação da vitamina C, foi observado o aumento nas concentrações de AA, devido à utilização da vitamina E como antioxidante, minimizando a oxidação do AA em AD e aumentando a atividade da glutathione, dessa forma, melhorando a recuperação do AD em AA.

A Tabela 9 expressa as concentrações de vitamina C reduzida (VR), composta pelo AP e o AA e as concentrações de vitamina C total (TT) composta pelo AP, AA e AD. Esses valores demonstram o efeito que os tratamentos exerceram nas concentrações de vitaminas potencialmente ativas (VR) e na absorção e retenção das diferentes formas de vitamina C no corpo das larvas de dourado (TT).

TABELA 9 Concentrações de vitamina C reduzida (VR) e vitamina C total (TT) determinadas no corpo inteiro das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil-palmitato (AP) e tocoferol acetato (TA) ante (inicial) e após (final) o teste de estresse.

Suplementação (mg kg ⁻¹)		Concentração de vitamina C nas larvas de dourado (µg g ⁻¹)			
TA	AP	VR		TT	
		Inicial*	Após*	Inicial*	Após*
0	0	35,30 ^{bA} ± 0,45	32,74 ^{bA} ± 0,30	36,63 ^{aA} ± 1,00	38,56 ^{cA} ± 1,76
	100	42,05 ^{aA} ± 1,47	42,12 ^{aA} ± 1,16	44,98 ^{aB} ± 2,12	79,78 ^{bA} ± 11,1
	1000	43,36 ^{aA} ± 0,54	43,29 ^{aA} ± 1,64	56,63 ^{aB} ± 5,05	102,4 ^{aA} ± 17,0
Média		39,81 ± 38,05		59,83 ± 49,99	
250	0	37,22 ^{aA} ± 0,41	42,20 ^{aA} ± 1,33	39,01 ^{bA} ± 0,76	46,42 ^{bA} ± 0,33
	100	41,20 ^{aA} ± 0,64	43,85 ^{aA} ± 1,39	57,61 ^{abA} ± 3,61	56,04 ^{bA} ± 8,43
	1000	44,27 ^{aA} ± 0,81	40,74 ^{aA} ± 0,86	67,03 ^{aB} ± 8,66	132,1 ^{aA} ± 14,3
Média		41,58 ± 41,12		66,36 ± 49,77	
Fonte de variação		Probabilidade > F calculado			
AP		0,00			
TA		0,03			
APxTA ¹		0,00			
Cv 1		6,49		27,81	
PR		-			
PRxAP ¹		-			
PRxTA ¹		-			
PRxAPxTA ¹		0,04			
Cv 2		7,56		24,10	

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna, dentro da mesma suplementação de TA na ração, diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha, dentro da mesma forma de vitamina C (VR ou TT), diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

¹interações entre as diferentes fontes de variações.

*Períodos experimentais (PR), “inicial”: larvas de dourado antes do teste de estresse e “final”: larvas de dourado após do teste de estresse.

As concentrações de VR corporal foram influenciadas pelo tocoferol acetato e pelo ascorbil palmitato, havendo uma interação significativa entre as suplementações de ambas as vitaminas (valor de P para PRxAP<0,05). As rações suplementadas com 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato foram eficientes em aumentar as concentrações de VR corporal no tratamento ausente da

suplementação do ascorbil palmitato. As larvas de dourados alimentadas com a ração sem as suplementações das vitaminas E e C apresentaram menor concentração de VR corporal, quando comparadas com as larvas suplementadas apenas com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. Essa diferença entre as suplementações de ascorbil palmitato não foi significativa entre os tratamentos que receberam a suplementação do tocoferol acetato.

As concentrações de TT corporal foram influenciadas pelos períodos experimentais e pelas suplementações das vitaminas C e E, sendo observada uma interação significativa entre as suplementações de ambas as vitaminas e os períodos experimentais (valor de P para PRxAPxTA<0,05). Os dourados que não receberam a suplementação de tocoferol acetato, analisados no período inicial, não apresentaram diferença significativa nas concentrações de TT corporal. Entretanto, as larvas de dourado que receberam a suplementação de tocoferol acetato nesse mesmo período apresentaram concentrações de TT corporal crescentes conforme os níveis de ascorbil palmitato suplementado.

Após o teste de estresse, observou-se, nas larvas não suplementadas com o tocoferol acetato, que as três suplementações de ascorbil palmitato foram eficientes em incorporar níveis crescentes de TT corporal. Nesse mesmo período, as larvas suplementadas com o tocoferol acetato e suplementadas com 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram concentrações maiores de TT corporal, quando comparadas com as suplementações de 0 e 100 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato. As larvas alimentadas com as rações contendo as suplementações de 0 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 100 e 1.000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato e a suplementação de 250 mg kg⁻¹ de tocoferol acetato com 1000 mg kg⁻¹ de ascorbil palmitato apresentaram concentrações superiores de TT corporal no período final, quando comparadas com as larvas desses tratamentos no período inicial.

Possivelmente, a concentração de VR não apresentou diferença significativa durante o estresse, devido ao intervalo dado entre o teste de estresse e a coleta das amostras. As larvas foram coletadas 30 minutos após o teste de estresse. Esse pode ser um intervalo insuficiente para a ação da vitamina reduzida no metabolismo. Durante o estresse, a vitamina C participa como cofator na biossíntese hormonal, além de neutralizar os radicais livres gerados no metabolismo.

A primeira resposta ao estresse é caracterizada pela liberação das catecolaminas e pela liberação mais tardia do cortisol. As catecolaminas são responsáveis, primeiramente, por modular as funções cardiovasculares e respiratórias, mantendo altos níveis de oxigênio circulante. Esse oxigênio é necessário para suprir a respiração dos tecidos durante o estresse (Reide et al., 1998), liberando maiores concentrações de radicais livres no metabolismo.

Com exceção das catecolaminas que apresentam a liberação imediata, a liberação do cortisol e a formação de altas concentrações de radicais livres são processos mais tardios. Pepels & Balm (2004) avaliaram o cortisol, em três intervalos diferentes, após o estresse da captura de *Oreochromis mossambicus* com 12 dias de vida. Estes autores observaram que o último período avaliado (11 a 20 minutos após o estresse) apresentou a maior concentração de cortisol. Davis et al. (1998) observaram que bagre-do-canal apresentou o pico de cortisol uma hora após o teste de estresse.

O aumento do TT observado entre os períodos inicial e final refletiu o aumento do AD. Esse aumento, possivelmente, foi devido às diferentes formas de vitaminas propostas por Karlsen et al. (2005). São formas intermediárias entre o AA e AD, como a forma iônica do ácido ascórbico e o radical ascorbil, as quais não foram analisadas neste experimento. Esse aumento ocorreu durante o teste de estresse, período em que não houve o fornecimento das rações experimentais, impossibilitando que essas vitaminas tenham origem exógena.

Provavelmente, quando se eleva o metabolismo ao limite, se incentiva a produção de AA ou de AD, estimulando-se a reação de oxidação ou a redução total dessas vitaminas intermediárias, sendo mais provável a oxidação do ascorbato em AD.

O teste de estresse influenciou no perfil da vitamina C presente no metabolismo das larvas de dourado. O estresse não reduziu as concentrações de VR, no entanto, mudou as concentrações de AP e AA presentes nas larvas de dourado. Observou-se que as larvas de dourado foram eficientes em disponibilizar o AP corporal em AA ou AD, sendo caracterizada a influência do tocoferol acetato nesse processo. As larvas dos tratamentos, contendo maior suplementação de tocoferol acetato do que as suplementações de ascorbil palmitato, disponibilizaram o AP em AA, enquanto que as larvas dos tratamentos contendo maiores suplementações de ascorbil palmitato do que a suplementação do tocoferol acetato disponibilizaram o AP em AD. O tocoferol acetato demonstrou também influenciar na concentração de VR, melhorando e aumentando essa variável nos tratamentos que continham baixas suplementações de ascorbil palmitato.

Esses resultados demonstraram que, durante uma rápida necessidade de antioxidante metabólico, como é o caso do estresse, a vitamina E e a vitamina C interagem de maneira diferente, comparado com o desenvolvimento. Durante o estresse, a alta suplementação da vitamina E atuou preservando o AA e não como um pró-oxidante, aumentando as concentrações de AD, como é observado no desenvolvimento.

5.2.2 Concentração do cortisol nas larvas de dourado

Não houve interação significativa nas concentrações de cortisol corporal; a suplementação de tocoferol acetato também não influenciou nesse parâmetro. No entanto, houve efeito significativo dos períodos experimentais

(valor de P para PR<0,05) e dos três níveis de suplementações de ascorbil palmitato (valor de P para AP<0,05). Os dados da Tabela 10 demonstram as concentrações de cortisol determinada no corpo inteiro das larvas de dourado alimentadas com as três diferentes suplementações de ascorbil palmitato, nos dois períodos experimentais.

TABELA 10 Concentrações de cortisol (em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) determinado no corpo inteiro das larvas de dourado (*Salminus brasiliensis*) alimentadas com rações contendo diferentes suplementações de ascorbil palmitato (AP), antes do teste de estresse (inicial) e após o teste de estresse (final).

Suplementação de AP (mg x kg^{-1})	Período ²		Média geral ¹
	Inicial	Final	
0	0,207	0,419	0,313 ^b
100	0,183	0,360	0,271 ^{ab}
1000	0,129	0,310	0,219 ^a
Média geral ¹	0,172 ^B	0,363 ^A	
CV		33,30	

¹Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna diferem entre si, pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

²Períodos experimentais (PR), “inicial”: larvas de dourado antes do teste de estresse e “final”: larvas de dourado após do teste de estresse.

As médias gerais de cortisol apresentaram diferença significativa nas concentrações antes do estresse e após o estresse, demonstrando que o teste de estresse foi eficiente em alterar as concentrações de cortisol corporal. Ortuño et al. (2003) também observaram que a exposição ao ar por 3 minutos foi eficiente em proporcionar a ativação dos eixos relacionados ao metabolismo do estresse.

As médias gerais referentes aos diferentes tratamentos demonstraram que os tratamentos contendo maiores concentrações de ascorbil palmitato na ração apresentaram menores níveis de cortisol corporal. As larvas do tratamento contendo 1.000 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato apresentaram a menor média de cortisol, enquanto as larvas do tratamento contendo 100 mg kg^{-1} apresentaram

níveis intermediários e as larvas do tratamento com 0 mg kg⁻¹ apresentaram a maior concentração de cortisol corporal.

O papel da vitamina C no estresse é fundamentado no conjunto de hipóteses propostas por diversos autores, podendo atuar na síntese dos hormônios ou prevenindo danos causados pelos mesmos. O AA pode neutralizar os radicais livres derivados dos efeitos das catecolaminas, evitando o estresse oxidativo, como já comentado e, dessa forma, pode minimizar o efeito do estresse ou proporcionar uma rápida recuperação (Peake, 2003), influenciando em baixos níveis de cortisol. No entanto, uma terceira hipótese relaciona a comunicação entre o sistema imune e o eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal (HPI).

A comunicação entre ambos os sistemas, em humanos e peixes, é evidenciada pela observação dos receptores de glicocorticóides, ACTH e endorfinas detectados nos linfócitos, assim como os receptores de citocinas (IL-1, TNF- α , IL-2 e IL-6) em células das glândulas endócrinas e do cérebro (Weyts et al., 1999). As citocinas são responsáveis por anunciar ao eixo HPI quando uma determinada resposta imune é ativada. Dessa forma, ocorre tanto o controle da liberação hormonal quanto a manutenção do sistema imune (McCann et al., 2000; Weyts et al., 1999). Considerando o efeito da vitamina C em ambos os sistemas, endócrino e imune, é sugerido que a suplementação de vitamina C possa manter baixo nível basal de cortisol.

A vitamina C pode atuar no sistema imune de maneira benéfica, melhorando os números de células relacionadas a esse sistema (Chagas & Val, 2003). Henrique et al. (1998), submetendo *Sparus aurata* à hipóxia, determinaram que os tratamentos com vitamina C mantiveram os níveis de cortisol constantes, enquanto foi observado um aumento no tratamento ausente de vitamina. Maeland et al. (1999), pesquisando o efeito da vitamina C em

Hippoglossus hippoglossus, observaram que a vitamina proporcionou uma rápida recuperação nos níveis de cortisol.

A vitamina C apresentou interação com o estresse, visto que o estresse reduziu as concentrações de AP e aumentou as concentrações de AA e AD nas larvas. A suplementação de ascorbil palmitato foi eficiente em reduzir as concentrações do cortisol. No entanto, não foi possível neste trabalho, definir o mecanismo de ação dessa vitamina. Possivelmente, ela atua em todas as hipóteses propostas, proporcionando menor liberação do cortisol e auxiliando para que esses níveis retornem aos níveis basais mais rapidamente.

Apesar dos vários relatos caracterizando que a vitamina C está envolvida na resposta ao estresse, os estudos com essa vitamina envolvem diversos fatores que podem afetar os resultados, gerando grande margem de erro (Ortuño et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

O ascorbil palmitato pode ser utilizado como fonte de vitamina C em larvas de dourado, elevando as concentrações de todas as formas de vitamina C presentes no metabolismo dos peixes. Apesar de o ascorbil palmitato ser absorvido, em grande parte, como ácido ascórbico, pode também ser absorvido e armazenado como ascorbil palmitato, sem sofrer modificações estruturais durante a absorção. O ácido ascórbico foi a forma de vitamina C corporal mais sensível às diferentes suplementações de ascorbil palmitato, seguido pelo ácido dehidroascórbico e, em menor intensidade de resposta, o ascorbil palmitato.

Foi também determinado que as concentrações de vitamina C presente no metabolismo dos peixes podem definir a sua disponibilidade para as reações de oxidação e redução com a vitamina E. A alta concentração de vitamina E suplementada na ração influenciou as diferentes formas de vitamina C corporal. No desenvolvimento, a vitamina E atuou como um pró-oxidante, aumentando as concentrações de vitamina C oxidada nas larvas de dourado, enquanto que, no estresse, a vitamina E atuou como um antioxidante, aumentando as concentrações de vitamina C reduzida nas larvas de dourado.

No desenvolvimento, o ascorbil palmitato apresentou resultados semelhantes aos obtidos com outras fontes de vitamina C. Isso demonstra que concentrações superiores a 100 mg kg^{-1} não apresentam diferença significativa no comprimento total e no peso das larvas de dourado. Para a avaliação do desenvolvimento de dourado, a altura da cabeça foi a medida que melhor respondeu às diferentes suplementações de ascorbil palmitato.

A concentração de cortisol corporal respondeu a doses superiores a 100 mg kg^{-1} de ascorbil palmitato e a suplementação de 1000 mg kg^{-1} proporcionou menores concentrações de cortisol corporal nas larvas submetidas ao estresse.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A larvicultura de dourado apresenta grandes dificuldades experimentais, devido ao comportamento predador da espécie. Durante a execução do experimento foi constatada grande dificuldade entre o sexto e nono dias experimentais, pois, nesse período, se concentrou alta taxa de mortalidade. Futuros estudos com a larvicultura do dourado devem ser realizados com um grande número de larvas estocadas em baixa densidade, de maneira que proporcione amostras numerosas e satisfatórias para essas análises.

A dieta contendo altas concentrações de farinha de peixe e óleo despertou o interesse das larvas desde o segundo dia de alimentação. Os intervalos de alimentação de duas em duas horas e de quatro em quatro horas minimizaram o comportamento canibal das larvas, assim como o fornecimento de peletes com o diâmetro cada vez maior, preferencialmente acompanhando o tamanho da boca das larvas.

As vitaminas analisadas apresentam grande instabilidade, o que gera altos erros experimentais além da variação normal decorrente do metabolismo de cada indivíduo (peixe). O ácido dehidroascórbico foi a forma que apresentou a maior variação. Outros autores também encontraram alto coeficiente de variação para essa forma de vitamina C, discutindo resultados com probabilidade de até 10% de erro. O presente trabalho utilizou quatro repetições por tratamento e 300 larvas por parcela, sendo analisadas 8 larvas por variável, o que demonstra serem necessárias maiores repetições experimentais para esse parâmetro.

São poucos os trabalhos que utilizam o ascorbil palmitato na ração de peixes, no entanto, ele é muito utilizado em enriquecimento de alimentos vivos. Trabalhos com enriquecimento dificultam a discussão do metabolismo do

ascorbil palmitato, visto que zooplânctons e artêmia convertem o ascorbil palmitato em ácido ascórbico antes de serem ingeridos pelos peixes.

Como sugestão para futuras pesquisas, seriam de grande valor estudos que relacionem o sistema de absorção do ascorbil palmitato em peixes, assim como pesquisas que relacionem a conversão do ascorbil palmitato em ácido ascórbico e dehidroascórbico, definindo a ação das lipases sobre o ascorbil palmitato e a interação de outras enzimas antioxidantes com a vitamina C.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, M.C.C. **Composição e alimentação da ictiofauna em um trecho do Alto Rio São Francisco, Município de Três Marias-MG.** 1999. 98p. Dissertação (Mestrando em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

ANDRÉS, R.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. **American Journal of Physiology**, v.277, p.863-868, 1999.

BARROS, M.M. **Nutrição e saúde dos peixes.** FMVZ-UNESP, Botucatu, 2002. 16p. Apostila de Minicurso. (Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, 12), Goiânia, GO, Brasil.

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

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

BAXMANN, A.C.; MENDONÇA, C.O.G.; HEILBERG, I.P. Effect of vitamin C supplements on urinary oxalate and pH in calcium stone-forming patients. **Kidney International**, v.63, p.1066-1071, 2003.

BOWRY, V.W.; INGOLD, K.U.; STOCKER, R. Vitamin E in human low-density lipoprotein (When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant). **Biochemistry Journal**, v.288, p.341-344, 1992.

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. High Yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. **JAACS**, v.76, n.11, p.1291-1295, 1999.

BRAGA, L.G.T.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K.; CYRINO, J.E.P. Trânsito gastrointestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.131-134, 2007.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER M. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v.13, p.1145-1155, 1999.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.300, p.535-543, 1993.

BURTLE, G.J.; NEWTON, G.L.; BLURN, S.A. L-Carnitine supplemented Catfish Diet. **US Patent**, n.5030657, 9 July 1991.

CAHU, C.; INFANTE, J.Z.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v.227, p.245–258, 2003.

CASIDAY, R.; FREY R. **Nutrients and solubility**. Disponível em: <www.chemistry.wustl.edu/.../Vitamins/home.htm>. Acesso em: 05 out. 2007.

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

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

CONKLIN, D.E. Vitamin requirements of juvenile Penaeid shrimp. **Advances in Tropical Aquaculture**, v.9, p.287-308, março, 1989.

DABROWSKI, K. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus L.*). **Aquaculture**, v.84, p.61-70, 1990.

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

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

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

DAVIS, K.; SIMCO, B.A.; LI, M.; ROBINSON, E. Effect of reduction of supplementary dietary vitamins on the stress response of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **World Aquaculture Society**, v.29, n.3, p. 319-324, 1998.

DEUTSCH, J.C.; KOLHOUSE, J.F. Ascorbate and Dehydroascorbate Measurements in aqueous solutions and plasma determined by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.65, p.321-326, 1993.

EMATA, A.C.; BORLONGAN, I.G.; DAMASO, J.P. Dietary vitamin C and E reproduction of milkfish *Chanos chanos forsskal*. **Aquaculture Research**, v.31, p.557-564, 2000.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, n.10, 2002.

FERREIRA, D.F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**: manual de orientação. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Departamento de Ciências Exatas, 2000. 37p. Manual de Software.

FLANAGAN, D.E.; KESHAVARZ, T.; EVANS, M.L.; FLANAGAN, S.; FAN, X.; JACOB, R.J. Role of corticotrophin-releasing hormone in the impairment of counterregulatory responses to hypoglycemia. **Diabetes**, v.52, p.605-613, 2003.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do Jundiá, *Rhamdia quelen*, e o dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

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

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203–1209, 1998.

FRISCH, A.J.; ANDERSON, T.A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish physiology and biochemistry**, v.23, p.23-34, 2000.

GAPASIN, R.S.J.; BOMBEO, R.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; NELIS, H. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on

milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. **Aquaculture**, v.162, p.269–286, 1998.

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

HAM, A.J.L.; LIEBLER, D.C. Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.339, p.157–164, 1997.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R.K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, p.137-149, 1997.

HENRIQUE, M.M.F.; GOMES, A.E.F; GOUILLOU-COUSTANS, M.F. et al. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, v.161, p.415–426, 1998.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. **Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress**. Brasília: Universidade de Brasília. Departamento de Biologia Celular. Oxyradical Research Group, 2001.

HUANG, C.H.; HIGGS, D.A.; BALFRYC, S.K.; DEVLIN, R.H. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139, p.199– 204, 2004.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; MICLO, A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, p.19–231, 1998.

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. **Biotechnology Letters**, v.22, p.165–168, 2000.

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

ITOI, K.; JIANG, Y.Q.; IWASAKI, Y.; WATSON, S. J. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v.16, p.348-355, 2004.

IZQUIERDO, M.S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25-42, 2001.

JAIN, S.K.; McVIE, R.; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of Type 1 Diabetic Children. **Diabetes Care**, v.23, n.9, Sept. 2000.

JI, H.; OM, A.D.; YOSHIMATSU, T.; HAYASHI, M.; UMINO, T.; NAKAGAWA, H.; ASANO, M.; NAKAGAWA, A. Effect of dietary vitamins C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. **Fisheries Science**, v.69, p.1001-1009, 2003.

KARLSEN, A.; BLOMHOFF, R.; GUNDERSEN, T.E. High-throughput analysis of Vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. **Journal of Chromatography B**, v.824, p.132-138, 2005.

KEMENY, M.E. The psychobiology of stress. **Blackwell Publishing Inc.** v.12, n.4, ago. 2003.

KOLKOVSKI, S.; CZESNY, S.; YACKEY, C.; MOREAU, R.; CIHLA, F.; MAHAN, D.; DABROWSKI, K. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *stizostedion vitreum* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v.6, p.199-206, 2000.

LANDER, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **The FASEB Journal**, v.11, p. 118-124, fev. 1997.

LAVENS, P.; MERCHIE, G.; RAMOS, X.; KUJAN, A.L-H.; HAUWAERT, A.V.; PEDRAZZOLI, A.; NELIS, H.; LEENHEER, A. Supplementation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v.5, p.205-209, 1999.

LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). **British Journal of Nutrition**, v.89, p.589-596, 2003.

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.

LI, M.H.; WISEA, D.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *ctalurus punctatus*. **World Aquaculture Society**, v.29, n.1, mar. 1998.

LUZ, R.K.; ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) em diferentes densidades de estocagem nos primeiros dias de vida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.560-565, 2002.

MAELAND, A.; ROSENLUND, G.; STOSS, J.; WAAGBO, R. Weaning of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. using formulated diets with various levels of ascorbic acid. **Aquaculture Nutrition**, v.5, p.211-219, 1999.

MAI, M.G.; ZANIBONI-FILHO, E. Efeito da idade de estocagem em tanques externos no desempenho da larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (osteichthyes, Characidae). **Acta Science Animal Science**, Maringá, v.27, n.2, p.287-296, 2005.

MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C.A.M.; PEREZ, M.A.; FILGUEIRA, A.L.; CUZZI, T.; Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, p.265-274, maio/jun. 2003.

MAY, J.M.; QU, Z.; COBB, C.E. Accessibility and reactivity of ascorbate 6-palmitate bound to erythrocyte membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, n.4, p.471-480, 1996.

McCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; KARANTH, S.; RETTORI, V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1121-1131, 2000.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; DHERT, P.H.; GÓMEZ, M.G.U.; NELIS, H.; LEENHEER, A.; SORGeloos, P. Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. **Journal of Fish Biology**, v.49, p.573–583, 1996.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; RADULL, J.; NELIS, H.; DE LEENHEER, A.; SORGeloos, P. Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the giant freshwater prawn. **Aquaculture International**, v.3, p.355-363, 1995.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; VERRETH, J.; OLLEVIER, F.; NELIS, H.; DE LEENHEER, A.; STARCH, V.; SORGeloos, P. The effect of supplemental ascorbic acid in enriched live food for *Clarias gariepinus* larvae at startfeeding. **Aquaculture**, v.151, p.245-258, 1997.

MEYDANI, S.N.; HAN, S.N.; WU, D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. **Immunological Reviews**, v.205, p.269–284, 2005.

MITRA, G.; MUKHOPADHYAY, P.K. Dietary essentiality of ascorbic acid in rohu larvae: Quantification with ascorbic acid enriched zooplankton. **Aquaculture International**, v.11, p.81–93, 2003.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries, Dordrecht**, v.9, n.3, p.211-268, 1999.

NAKAGAWA, H.; MUSTAFA, M.G.; TAKII, K.; UMIDO, T.; KUMAI, H. Effect of dietary catechin and *Spirulina* on vitamin C metabolism in red sea bream. **Fisheries Science**, v.66, p.321-326, 2000.

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

O'KEEFE, T. Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. **ASA Technical Bulletin**, v.AQ48, p. 1-9, 2001.

OGAWA, Y.; MIYAZATO, T.; HATANO, T. Oxalate and urinary stones. **World Journal Surg.** v.24, p.1154–1159, 2000.

OKAMURA, D.; ARAÚJO, F.G.; LOGATO, P.V.R.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, R.T.F.; ARAÚJO, R.V. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 883-888, 2007.

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 Immunology**, v.14, p. 145–156, 2003.

OZÓRIO, R.O.A. **Dietary L-carnitine and energy and lipid metabolism in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles.** 2001. Thesis. (PhD) - Wageningen University. Fish Culture and Fisheries Group. Wageningen Institute of Animal Sciences.

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

PARK, K.H.; TERJESEN, B.F.; TESSER, M.B.; PORTELLA, M.C.; DABROWSKI, K. α -Lipoic acid-enrichment partially reverses tissue ascorbic acid depletion in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed vitamin C-devoid diets. **Fish Physiol Biochem**, v.32, p.329-338, 2006.

PEAKE, J.M. Vitamin C: effects of exercise and requirements with training. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.13, p.125-151, 2003.

PEPELS, P.P.L.M.; BALM, P.H.M. Ontogeny of corticotropin-releasing factor and of hypothalamic–pituitary–interrenal axis responsiveness to stress in tilápia (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). **General and Comparative Endocrinology**, v.139, p.251–265, 2004.

PINNELL, S.R. Ascorbyl-6-Palmitate is not Ascorbic Acid. **The Society for Investigative Dermatology, Inc.** p. 1103-1103, 2002.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; HERTRAMPF, E.; NUNEZ, S.; TAPIA, M.; CORI, H.; ROMANA, D.L. Ascorbyl palmitate enhances iron bioavailability in iron-fortified Bread. **American Journal Clinical Nutrition**, v.84, p.830-834, 2006.

POKORSKI, M.; MARCZAK, M.; DYMECKA, A.; SUCHOCKI, P. Ascorbyl palmitate as a carrier of ascorbate into neural tissues. **Journal Biomedical Science**, v.10, p.193-198, 2003.

POKORSKI, M.; RAMADAN, A.; MARCZAK, M. Ascorbyl palmitate augments hypoxic respiratory response in the cat. **Journal Biomedical Science**, v.11, p.465-471, 2004.

QMCWEB. O que é a dor? Os nociceptores e o mecanismo da dor. Disponível em: <quark.qmc.ufsc.br/.../dor/o_que_é_dor.htm>. Acesso em: 25 maio 2005.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.120, p.1-27, 1998.

RÍOS-DURÁN, M.G.; HERNÁNDEZ-TÉLLEZ, A.R.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C.A.; ROSS, L.G. The effect of transportation stress on tissue ascorbic acid levels of Mexican silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1979). **BIOCELL**, v.30, n.1, p.149-155, 2006.

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

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Revista Biotemas**, v.19, p.41-50, 2006.

RODRÍGUEZ, G.P. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. **Rev. Cubana Aliment. Nutr.**, v.11, p.46-57, 1997.

ROSS, D.; MENDIRATTA, S.; QU, Z.; COBB, C.E.; MAY, J.M. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.1/2, p.81-89, 1999.

ROTTA, M.A. **Utilização do ácido ascórbico (Vitamina C) pelos peixes**. Embrapa – pantanal, Brasil, 2003. (Documentos 49).

RUANE, N.M.; CARBALLO, E.C.; KOMEN, J. Increase stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, v.33, p.777-784, 2002.

RUANE, N.M.; CARBALLO, E.C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, v.33, p.777-784, 2002.

RUFF, N.; FITZGERALD, R.D.; CROSS T, F.; HAMRE, K.; KERRY J.P. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, v.9, p.91-103, 2003.

SCHRECK, C.B.; WILFRIDO, C.S.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v.197, p.3-24, 2001.

SCHUHMACHER, A.; GROPP, J.M. Short communication carnitine - a vitamin for rainbow trout? **Journal Applied Ichthyol.**, v.14, p.87-90, 1998.

SEALEY, W.M.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 748-755, Jan. 2002.

SHIAU, S.Y.; HSU, C.Y. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*. **Aquaculture**, v.210, p.335-342, 2002.

SMART, R.C.; CRAWFORD, C.L. Effect of ascorbic acid and its synthetic lipophilic derivative ascorbyl palmitate on phorbol ester-induced skin-tumor promotion in mice". **American Journal Clinical Nutrition**, v.54, p.1266-1273, 1991.

SMITH, G.G.; BROWN, M.R.; RITAR, A.J. Feeding juvenile *Artemia* enriched with ascorbic acid improves larval survival in the spiny lobster *Jasus edwardsii*. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.105-112, 2004b.

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

TAVARES, M.D.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: USP, 2004. 144p.

TESSER, M.B.; FLORES-QUINTANA, C.I.; CARNEIRO, D.J.; JUNIOR, J.M.P.; PORTELLA, M.C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2211-2218, 2006.

THAMILSELVAN, S.; KHAN, S.R.; MENON, M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. **Urol Res.**, v.31, p.3-9, 2003.

THAMILSELVAN, S.; MENON, M. Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. **Bjinternational**, v.96, p.117-126, 2005.

TOCHER, D.R.; MOURENTE, G.; EECKEN, A.V.D.; EVJEMO, J.O. DIAZ, E. BELL, J.G.; GEURDEN, I.; LAVENS, P.; OLSEN, Y. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture Nutrition**, v.8, p.195-207, 2002.

VAN ENCKEVORT, F.H.J.; PEPELS, P.P.L.M.; LEUNISSEN, J.A.M.; MARTENS, G.J.M. *Oreochromis mossambicus* (tilapia) corticotropin-releasing hormone: cDNA sequence and bioactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, v.12, p.177-186, 2000.

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

VAN-DEN-THILLART1, G.; VIANEN1, G.; ZAAGSMA, J. Adrenergic regulation of lipid mobilization in fishes; a possible role in hypoxia survival. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.27, p.189-204, 2002.

VAN-HEESWIJK, J.C.F.; VAN-PELT, J.; VAN-DEN-THILLART, G.E.E.J.M. Free fatty acid metabolism in the air-breathing African catfish (*Clarias gariepinus*) during asphyxia. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.141, p.15-21, 2005.

VAN-HEESWIJK, J.C.F.; VIANEN, G.J.; VAN-DEN-THILLART, G.E.E.J.M. The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*): Increased sensitivity to adrenergic stimulation with fasting. **General and Comparative Endocrinology**, v.145, p.51–61, 2006.

VEGA-ORELLANA, O.M.; FRACALOSSO, D.M.; SUGAI, J.K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases, **Aquaculture**, v. 252, p. 484– 493, 2006.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.F. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids . **Aquaculture and Fisheries management**, n.25, p.21-36, 1994.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comp. Biochemistry Physiology**, v.116C, p.89-95, 1997.

WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLIK, G.; VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. Interactions between the immune system and the hypothalamus-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.1-20, 1999.

XIE, Z.; NIU, C. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Aquaculture Nutrition**, v.12, p.151–156, 2006.

9 LISTA DOS ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A	Analise de variância da concentração de ascorbil palmitato analisado no corpo inteiro do peixe.....	91
TABELA 2A	Analise de variância da concentração de ácido ascórbico analisado no corpo inteiro do peixe.....	91
TABELA 3A	Analise de variância da concentração de ácido dehidroascórbico analisado no corpo inteiro do peixe.....	92
TABELA 4A	Analise de variância da concentração de vitamina C total analisado no corpo inteiro do peixe.....	92
TABELA 5A	Analise de variância da concentração de vitamina C reduzida analisado no corpo inteiro do peixe.....	93
TABELA 6A	Analise de variância do comprimento total das larvas de dourado.....	93
TABELA 7A A	Analise de variância da altura da cabeça das larvas de dourado.....	94
TABELA 8A	Analise de variância do peso das larvas de dourado.....	94

ANEXO B

TABELA 1B	Analise de variância da concentração de ascorbil palmitato analisado no corpo inteiro do peixe.....	95
TABELA 2B	Analise de variância da concentração de ácido ascórbico analisado no corpo inteiro do peixe.....	95
TABELA 3B	Analise de variância da concentração de ácido dehidroascórbico analisado no corpo inteiro do peixe.....	96
TABELA 4B	Analise de variância da concentração de vitamina C total analisado no corpo inteiro do peixe.....	96
TABELA 5B	Analise de variância da concentração de vitamina C reduzida analisado no corpo inteiro do peixe.....	97
TABELA 6B	Analise de variância da concentração de cortisol analisado no corpo inteiro do peixe.....	97

ANEXO C

FIGURA 1C Cromatograma dos padrões de ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico.....	98
FIGURA 2C Cromatograma dos padrões de ascorbil palmitato, alfa-tocoferol e do tocoferol acetato.....	98
TABELA 1C Análise de variância para a regressão do ascorbil palmitato.....	99
TABELA 2C Teste de regressão para o ascorbil palmitato.....	99
TABELA 3C Pontos da reta analítica do ascorbil palmitato.....	99
FIGURA 3C Equação linear do ascorbil palmitato.....	100
TABELA 4C Análise de variância para a regressão do ácido ascórbico.....	100
TABELA 5C Teste de regressão para o ácido ascórbico.....	100
TABELA 6C Pontos da reta analítica do ácido ascórbico.....	101
FIGURA 4C Equação linear do ácido ascórbico.....	101
TABELA 7C Análise de variância para a regressão do ácido dehidroascórbico.....	101
TABELA 8C Teste de regressão para o ácido dehidroascórbico.....	102
TABELA 9C Pontos da reta analítica do ácido dehidroascórbico.....	102
FIGURA 5C Equação linear do ácido dehidroascórbico.....	102

ANEXO D

TABELA 1D Análise de variância para a regressão do cortisol.....	103
TABELA 2D Teste de regressão para o cortisol.....	103
TABELA 3D Médias da curva analítica do cortisol.....	103
FIGURA 1D Equação quadrática do cortisol.....	104

ANEXO A

TABELA 1A Análise de variância da concentração de ascorbil palmitato no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	46,085	23,042	17,236	0,000
VITE	1	4,812	4,812	3,600	0,073
VITC*VITE	2	0,720	0,360	0,270	0,766
Erro 1	18	24,064	1,336		
PERIODO	1	116,556	116,556	111,326	0,000
PERIODO*VITC	2	10,749	5,374	5,134	0,017
PERIODO*VITE	1	3,276	3,276	3,130	0,093
PERIODO*VITC*VITE	2	0,609	0,304	0,291	0,751
Erro 2	18	18,845	1,046		
Total corrigido	47	225,720			
CV* 1 (%) =	6,24				
CV* 2 (%) =	5,52				
Média geral:	18,531	Número de observações:		48	

*Coeficiente de variação.

TABELA 2A Análise de variância da concentração de ácido ascórbico no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	65,096	32,548	6,830	0,006
VITE	1	7,323	7,323	1,537	0,231
VITC*VITE	2	13,889	6,944	1,457	0,259
Erro 1	18	85,774	4,765		
PERIODO	1	25,409	25,409	3,457	0,079
PERIODO*VITC	2	30,200	15,100	2,055	0,157
PERIODO*VITE	1	0,973	0,973	0,132	0,720
PERIODO*VITC*VITE	2	3,870	1,935	0,263	0,771
Erro 2	18	132,296	7,349		
Total corrigido	47	364,833			
CV* 1 (%) =	11,05				
CV* 2 (%) =	13,72				
Média geral:	19,753	Número de observações:		48	

*Coeficiente de variação

TABELA 3A Análise de variância da concentração de ácido dehidroascórbico no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	2356,192	1178,096	19,677	0,000
VITE	1	454,372	454,372	7,589	0,013
VITC*VITE	2	88,880	44,440	0,742	0,490
Erro 1	18	1077,707	59,872		
PERIODO	1	818,424	818,424	7,458	0,013
PERIODO*VITC	2	86,479	43,239	0,394	0,680
PERIODO*VITE	1	32,819	32,819	0,299	0,591
PERIODO*VITC*VITE	2	108,869	54,434	0,496	0,617
Erro 2	18	1975,353	109,741		
Total corrigido	47	6999,100			
CV* 1 (%) =	55,76				
CV* 2 (%) =	75,49				
Média geral:	13,876	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 4A Análise de variância da concentração de vitamina C total no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	3953,578	1976,789	27,059	0,000
VITE	1	432,782	432,782	5,924	0,025
VITC*VITE	2	43,790	21,895	0,300	0,744
Erro 1	18	1315,003	73,055		
PERIODO	1	163,106	163,106	1,187	0,290
PERIODO*VITC	2	203,521	101,760	0,740	0,490
PERIODO*VITE	1	72,683	72,683	0,529	0,476
PERIODO*VITC*VITE	2	85,861	42,930	0,312	0,735
Erro 2	18	2474,037	137,446		
Total corrigido	47	8744,367			
CV* 1 (%) =	16,39				
CV* 2 (%) =	22,48				
Média geral:	52,162	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 5A Análise de variância da concentração de vitamina C reduzida no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	219,290	109,645	22,635	0,000
VITE	1	0,262	0,262	0,054	0,818
VITC*VITE	2	8,426	4,213	0,870	0,435
Erro 1	18	87,192	4,844		
PERIODO	1	250,808	250,808	29,545	0,000
PERIODO*VITC	2	58,912	29,456	3,470	0,053
PERIODO*VITE	1	7,821	7,821	0,921	0,349
PERIODO*VITC*VITE	2	1,465	0,732	0,086	0,917
Erro 2	18	152,804	8,489		
Total corrigido	47	786,984			
CV* 1 (%) =	5,75				
CV* 2 (%) =	7,61				
Média geral:	38,285	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 6A Análise de variância do comprimento total das larvas de dourado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	0,666	0,333	7,713	0,003
VITE	1	0,011	0,011	0,271	0,608
VITC*VITE	2	0,055	0,027	0,640	0,538
Erro 1	18	0,778	0,043		
PERIODO	1	18,812	18,812	846,221	0,000
PERIODO*VITC	2	0,184	0,092	4,151	0,032
PERIODO*VITE	1	0,041	0,041	1,863	0,189
PERIODO*VITC*VITE	2	0,004	0,002	0,107	0,899
Erro 2	18	0,400	0,022		
Total corrigido	47	20,955			
CV* 1 (%) =	5,87				
CV* 2 (%) =	4,21				
Média geral:	3,540	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 7A Análise de variância da altura da cabeça das larvas de dourado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	0,021	0,010	5,954	0,010
VITE	1	0,000	0,000	0,075	0,787
VITC*VITE	2	0,001	0,000	0,498	0,615
Erro 1	18	0,032	0,001		
PERIODO	1	0,452	0,452	536,629	0,000
PERIODO*VITC	2	0,005	0,002	3,027	0,073
PERIODO*VITE	1	0,002	0,002	2,530	0,129
PERIODO*VITC*VITE	2	0,000	0,000	0,166	0,848
Erro 2	18	0,015	0,000		
Total corrigido	47	0,530			
CV* 1 (%) =	6,45				
CV* 2 (%) =	4,43				
Média geral:	0,655	Número de observações:		48	

*Coeficiente de variação.

TABELA 8A Análise de variância do peso das larvas de dourado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	0,042	0,021	3,020	0,074
VITE	1	0,007	0,007	1,070	0,314
VITC*VITE	2	0,008	0,004	0,639	0,539
Erro 1	18	0,125	0,006		
PERIODO	1	2,771	2,771	627,402	0,000
PERIODO*VITC	2	0,032	0,016	3,641	0,047
PERIODO*VITE	1	0,003	0,003	0,832	0,373
PERIODO*VITC*VITE	2	0,001	0,000	0,124	0,883
Erro 2	18	0,079	0,004		
Total corrigido	47	3,071			
CV* 1 (%) =	18,43				
CV* 2 (%) =	14,67				
Média geral:	0,45	Número de observações:		48	

*Coeficiente de variação.

ANEXO B

TABELA 1B Análise de variância da concentração de ascorbil palmitato no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	46,688	23,344	10,065	0,001
VITE	1	8,391	8,391	3,618	0,073
VITC*VITE	2	0,571	0,285	0,123	0,884
Erro 1	18	41,749	2,319		
PERIODO	1	48,734	48,734	27,072	0,000
PERIODO*VITC	2	11,327	5,663	3,146	0,067
PERIODO*VITE	1	1,225	1,225	0,681	0,420
PERIODO*VITC*VITE	2	0,701	0,350	0,195	0,824
Erro 2	18	32,403	1,800		
Total corrigido	47	191,793			
CV* 1 (%) =	7,98				
CV* 2 (%) =	7,03				
Média geral:	19,082	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 2B Análise de variância da concentração de ácido ascórbico no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	160,374	80,187	10,086	0,001
VITE	1	10,407	10,407	1,309	0,267
VITC*VITE	2	100,757	50,378	6,337	0,008
Erro 1	18	143,101	7,950		
PERIODO	1	61,904	61,904	12,417	0,002
PERIODO*VITC	2	4,044	2,022	0,406	0,672
PERIODO*VITE	1	24,461	24,461	4,906	0,039
PERIODO*VITC*VITE	2	57,496	28,748	5,766	0,011
Erro 2	18	89,739	4,985		
Total corrigido	47	652,287			
CV* 1 (%) =	13,04				
CV* 2 (%) =	10,33				
Média geral:	21,617	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 3B Análise de variância da concentração de ácido dehidroascórbico no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	15673,216	7836,608	23,422	0,000
VITE	1	271,788	271,788	0,812	0,379
VITC*VITE	2	1610,542	805,271	2,407	0,118
Erro 1	18	6022,529	334,584		
PERIODO	1	7702,838	7702,838	34,309	0,000
PERIODO*VITC	2	6402,754	3201,377	14,259	0,000
PERIODO*VITE	1	111,488	111,488	0,497	0,490
PERIODO*VITC*VITE	2	1924,819	962,409	4,287	0,030
Erro 2	18	4041,224	224,512		
Total corrigido	47	43761,201			
CV* 1 (%) =	81,60				
CV* 2 (%) =	66,85				
Média geral:	22,415	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 4B Análise de variância da concentração de vitamina C total no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	19829,756	9914,878	32,178	0,000
VITE	1	511,159	511,159	1,659	0,214
VITC*VITE	2	1319,778	659,889	2,142	0,146
Erro 1	18	5546,274	308,126		
PERIODO	1	7859,318	7859,318	33,962	0,000
PERIODO*VITC	2	5646,891	2823,445	12,201	0,000
PERIODO*VITE	1	45,159	45,159	0,195	0,663
PERIODO*VITC*VITE	2	1677,525	838,762	3,625	0,047
Erro 2	18	4165,449	231,413		
Total corrigido	47	46601,313			
CV* 1 (%) =	27,81				
CV* 2 (%) =	24,10				
Média geral:	63,114	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 5B Análise de variância da concentração de vitamina C reduzida no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	355,067	177,533	25,421	0,000
VITE	1	37,489	37,489	5,368	0,032
VITC*VITE	2	95,348	47,674	6,826	0,006
Erro 1	18	125,708	6,983		
PERIODO	1	0,786	0,786	0,083	0,776
PERIODO*VITC	2	25,391	12,695	1,342	0,286
PERIODO*VITE	1	14,735	14,735	1,558	0,227
PERIODO*VITC*VITE	2	60,686	30,343	3,209	0,064
Erro 2	18	170,226	9,457		
Total corrigido	47	885,439			
CV* 1 (%) =	6,49				
CV* 2 (%) =	7,56				
Média geral:	40,699	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

TABELA 6B Análise de variância da concentração de cortisol no corpo inteiro do peixe.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
VITC	2	0,070	0,035	4,419	0,027
VITE	1	0,005	0,005	0,740	0,401
VITC*VITE	2	0,016	0,008	1,053	0,369
Erro 1	18	0,143	0,007		
PERIODO	1	0,435	0,435	75,747	0,000
PERIODO*VITC	2	0,002	0,001	0,255	0,777
PERIODO*VITE	1	0,005	0,005	0,928	0,348
PERIODO*VITC*VITE	2	0,015	0,007	1,391	0,274
Erro 2	18	0,103	0,005		
Total corrigido	47	0,799			
CV* 1 (%) =	33,30				
CV* 2 (%) =	28,30				
Média geral:	0,267	Número de observações:	48		

*Coeficiente de variação.

ANEXO C

Foram utilizados padrões individuais para a determinação do tempo de retenção das vitaminas analisadas. O tempo de retenção do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico foi, respectivamente, igual a 6,17 e 10,483 minutos (Figura 1B) e do ascorbil palmitato, alfa-tocoferol e do tocoferol acetato foi, respectivamente, igual a 2,211, 6,356 e 9,434 minutos (Figura 2B).

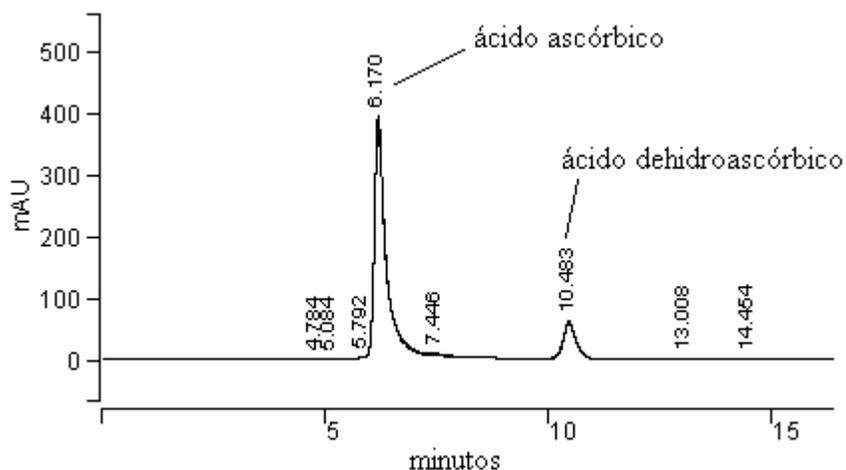


FIGURA 1C Cromatograma dos padrões de ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico.

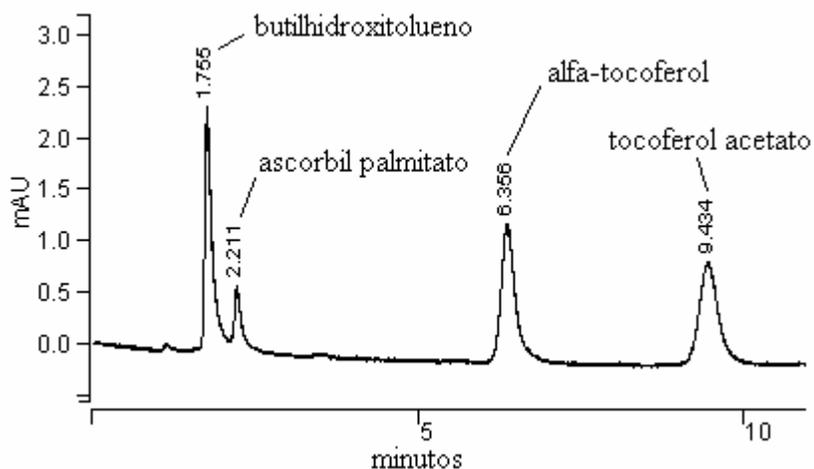


FIGURA 2C Cromatograma dos padrões de ascorbil palmitato, alfa-tocoferol e do tocoferol acetato.

Para a quantificação das vitaminas foram analisadas diferentes concentrações de cada padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote computacional Sistema para Análise de Variância(Sisvar), descrito por Ferreira (2000). Com a análise de variância, determinou-se a equação analítica de melhor ajuste para a conversão de área dos picos para µg de vitamina.

TABELA 1C Análise de variância para a regressão do ascorbil palmitato

FV	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Gramas	4	5,617298819x10 ¹²	1,40432470x10 ¹²	3585,534	0,0125
Erro	1	391664072	391664072		
Total corrigido	5	5,617690483x10 ¹²			
CV* (%) = 2,17					
Média geral: 912382,6666667			Número de observações: 6		

*Coeficiente de variação,

TABELA 2C Teste de regressão para o ascorbil palmitato

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Linea	1	6052325986345,849	6052325986345,849	15452,850	0,005
Quadrática	1	49833378977,63908	49833378977,639083	127,235	0,056
Desvio	2	14186490508,95641	7093245254,478209	18,111	0,164
Resíduo	1	391664072,0000000	391664072,0000000		
R ² = 98,95% (linear)					

TABELA 3C Pontos da reta analítica do ascorbil palmitato

µg de ascorbil palmitato	Áreas observadas	Áreas estimadas
0,000854	19225	91860
0,004270	20978	130138
0,008540	243252	177985
0,085400	1218688	1039227
0,244000	2753465	2816395

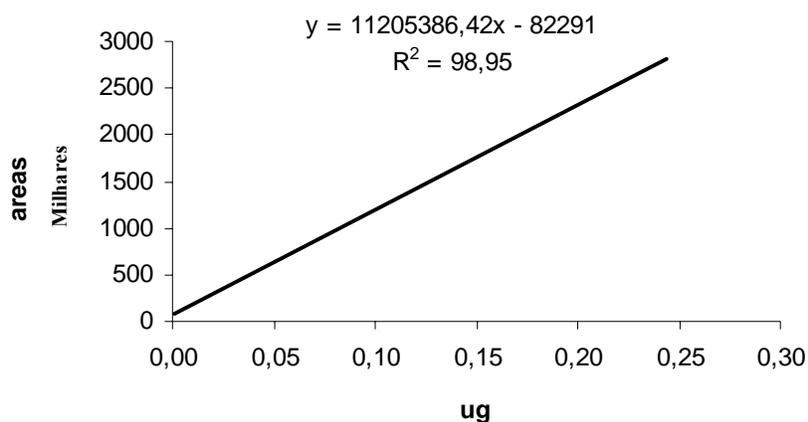


FIGURA 3C Equação linear do ascorbil palmitato

TABELA 4C Análise de variância para a regressão do ácido ascórbico

FV	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Gramas	4	$1,522893596 \times 10^{13}$	$3,80723399 \times 10^{12}$	226,145	0,0498
Erro	1	$1,683539101 \times 10^{10}$	$1,683539101 \times 10^{10}$		
Total corrigido	5	$1,524577136 \times 10^{13}$			

CV* (%) = 8,55

Média geral: 1518323,1666667

Número de observações: 6

*Coeficiente de variação.

TABELA 5C Teste de regressão para o ácido ascórbico

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Linea	1	9978281924423,37854	9978281924423,37854	592,697	0,026
Quadrática	1	372965309781,54113	372965309781,54113	22,154	0,133
Desvio	2	164074088447,52533	82037044223,76266	4,873	0,305
Resíduo	1	16835391008,00000	16835391008,00000		

$R^2 = 94,89\%$ (linear)

TABELA 6C Pontos da reta analítica do ácido ascórbico.

µg de ácido ascórbico	Áreas observadas	Áreas estimadas
0,03523	15428	64041,740971
0,17613	18036	78065,326425
0,35226	547122	255704,203503
1,76130	1108969	1676815,220130
3,52260	3710192	3453203,990913

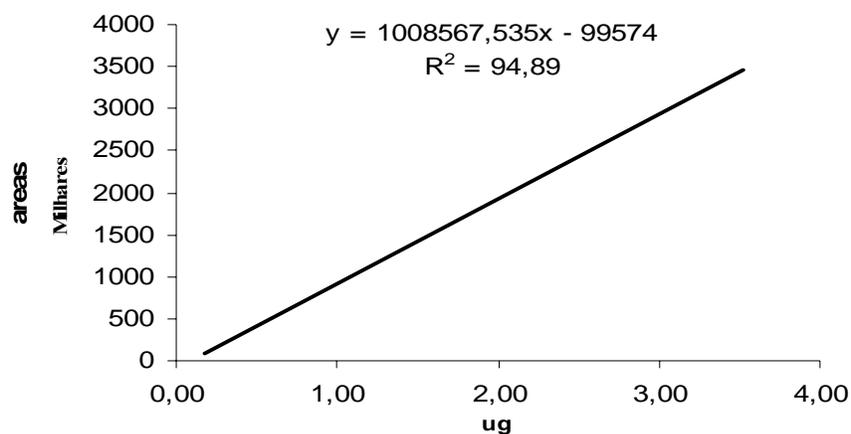


FIGURA 4C Equação linear do ácido ascórbico.

TABELA 7C Análise de variância para a regressão do ácido dehidroascórbico

FV	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Gramas	3	$1,286053028 \times 10^{10}$	$4,28684343 \times 10^9$	9322,457	0,0076
Erro	1	459840,5	459840,5		
Total corrigido	4	$1,286099012 \times 10^{10}$			

CV* (%) = 1,98
Média geral: 34220,8 Número de observações: 5

*Coeficiente de variação.

TABELA 8C Teste de regressão para o ácido dehidroascórbico.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
Linea	1	12903013757,98	12903013757,98	28059,759	0,004
Quadrática	1	390796347,18	390796347,18	849,852	0,022
Desvio	1	11143200,19	11143200,19	24,233	0,128
Resíduo	1	459840,5	459840,50		
R2 96,98% (linear)					

TABELA 9C Pontos da reta analítica do ácido dehidroascórbico.

µg de ácido dehidroascórbico	Áreas observadas	Áreas estimadas
0,000174	1211	8922,772559
0,003480	2996	10111,205145
0,017400	30643	15115,131825
0,348000	133257	133958,390471

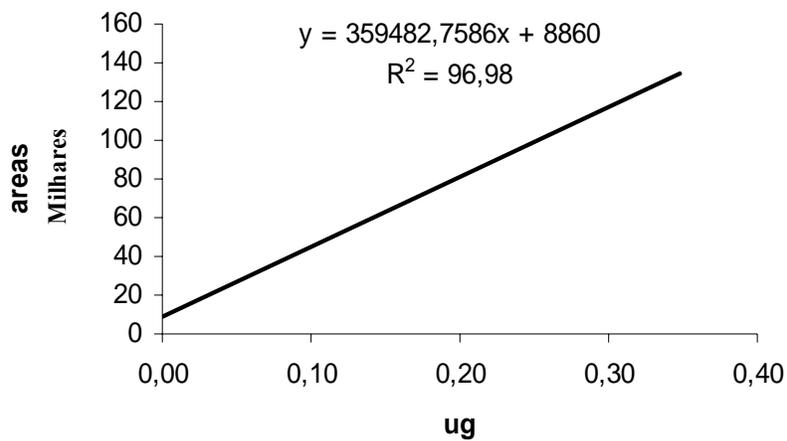


FIGURA 5C Equação linear do ácido dehidroascórbico.

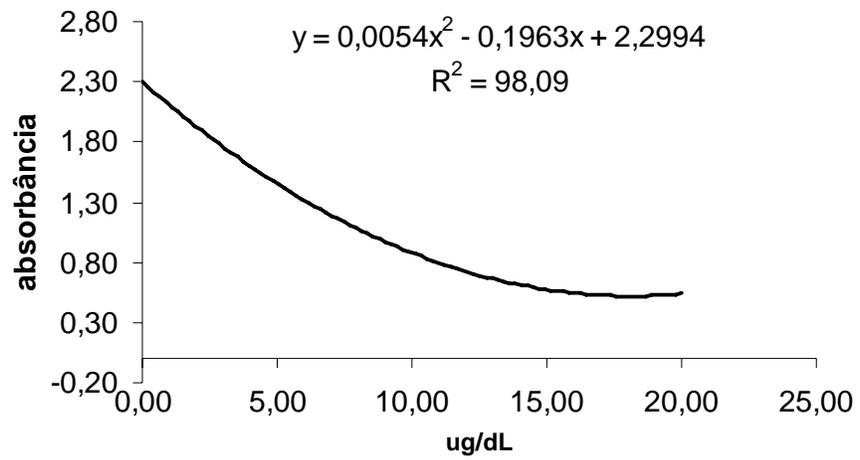


FIGURA 1D Equação quadrática do cortisol.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)