

## Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui<sup>(1)</sup>

Edsandra Campos Chagas<sup>(2)</sup> e Adalberto Luís Val<sup>(3)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietária com ácido L-ascórbico (vitamina C) no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Após dez semanas, em que foram alimentados com dietas contendo 0, 100 e 500 mg de ácido L-ascórbico por kg de ração, os peixes foram capturados e imediatamente anestesiados para a coleta de sangue da veia caudal e determinação dos parâmetros hematológicos. Animais alimentados com maiores níveis de ascorbato mostraram pesos corpóreos maiores, melhores taxas de conversão alimentar e sobrevivência. A ausência de ácido L-ascórbico na ração, além de causar redução nos valores de hematócrito e no número de eritrócitos, que caracteriza anemia, provocou aumento no volume corpuscular médio, na hemoglobina corpuscular média e na concentração de hemoglobina corpuscular média. Esses resultados revelam a importância do ácido L-ascórbico na dieta dos juvenis de tambaqui. O nível de 100 mg de ácido L-ascórbico/kg de ração é adequado, garantindo bom ganho de peso e manutenção da homeostase do organismo.

Termos para indexação: *Colossoma macropomum*, suplemento alimentar, nutrição animal, piscicultura.

### Effect of vitamin C on weight and hematology of tambaqui

Abstract – The objective of this work was to estimate the effect of L-ascorbic acid (vitamin C) dietary supplementation on the body weight and on the hematology of juveniles tambaqui, *Colossoma macropomum*. After ten weeks receiving diets containing 0, 100 and 500 mg of L-ascorbic acid per kg of food, the fish were netted from the tanks, immediately anesthetized and blood was withdrawn from caudal vein for analysis of hematological parameters. Animals fed on higher ascorbate levels showed higher final body weight, better feed conversion rate and survival. Also, the L-ascorbic acid free-diet resulted in reduction of hematocrit and red blood cell count, characterizing anemia, and an increase of mean cell volume, mean cellular hemoglobin and mean cellular hemoglobin concentration. These results show the importance of L-ascorbic acid supplementation in the diet of juveniles tambaqui. The level of 100 mg of L-ascorbic acid/kg diet is adequate, guaranteeing better body weight gain and maintenance of organic homeostasis.

Index terms: *Colossoma macropomum*, supplements, animal nutrition, fish culture.

### Introdução

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe teleósteo de água doce pertencente à ordem Characiformes, família Serrasalminae (Géry, 1977), nativo das bacias do Amazonas, Orinoco e afluen-

tes. Atinge a maturidade sexual entre o terceiro e o quarto ano de vida, apresenta desova total, alta fecundidade e ovos semipelágicos (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Sua dieta natural inclui zooplâncton, frutos e sementes, sendo considerado um onívoro com tendência a frugívoro (Honda, 1974). É uma espécie com excelente potencial para cultivo por apresentar bom crescimento, hábito gregário, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente utilização de alimentos (Saint-Paul, 1986; Val et al., 1998).

O conhecimento das exigências nutricionais de espécies de peixes de clima temperado de interesse

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 29 de novembro de 2002.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental, Caixa Postal 319, CEP 69011-970 Manaus, AM. E-mail: edsandra@cpaa.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, CEP 69083-000 Manaus, AM. E-mail: dalval@inpa.gov.br

para a aqüicultura está bem estabelecido. Espécies como o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), entre outras, têm suas exigências vitamínicas, inclusive por ácido ascórbico, bem estudadas (Gouillou-Coustans et al., 1998; Li & Robinson, 1999; Lovell, 2000). Porém, em relação às espécies de peixes tropicais, a adição de nutrientes à ração segue orientação do manual "Nutrient Requirements of Fish" (National Research Council, 1993), que se baseia nas exigências nutricionais de espécies de peixe de clima temperado. Esse procedimento tem sido adotado, principalmente, pela falta de estudos com espécies tropicais que apresentem potencial para criação.

As exigências nutricionais de vitaminas, incluindo ácido ascórbico, são específicas e dependem de vários fatores ambientais e fisiológicos (Li & Robinson, 1999; Lovell, 2000), que incluem ontogenia (Woodward, 1994; Dabrowski et al., 1996), reprodução (Blom & Dabrowski, 1995) e função metabólica (Blom & Dabrowski, 1995; Gouillou-Coustans et al., 1998).

A importância da suplementação de ácido ascórbico na dieta de animais cultivados deve-se à incapacidade dos peixes teleósteos em sintetizar esta vitamina por causa da ausência da enzima gulonolactona oxidase (Touhata et al., 1995); o tambaqui está incluído neste grupo (Fracalossi et al., 2001).

Espécies brasileiras como os ciclídeos acará-açu (*Astronotus ocellatus*) e acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) e o serrasalmídeo pacu (*Piaractus mesopotamicus*) têm as exigências de ácido ascórbico estabelecidas em 25, 360 e 139 mg/kg, respectivamente, utilizando fontes estabilizadas e protegidas (Martins, 1995; Fracalossi et al., 1998; Blom & Dabrowski, 2000). A suplementação dietária adequada de ácido ascórbico para os peixes sob criação controlada é essencial na promoção de melhor crescimento, reprodução, resposta ao estresse e resistência às doenças (Martins et al., 1995; Li & Robinson, 1999; Lovell, 2000). Por sua vez, a ausência do ácido na dieta pode promover o aparecimento de deficiências em várias espécies de peixes, como lordose e escoliose, crescimento reduzido, erosão das nada-

deiras, anemia, hemorragia, displasia, hiperplasia, hipertrofia e aumento na taxa de mortalidade (Martins, 1995; Fracalossi et al., 1998; Li & Robinson, 1999; Adham et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietária com o ácido L-ascórbico (vitamina C) no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa) durante dez semanas. Foram utilizados tanques de 250 L, dotados de um sistema de filtro biológico, com permanente circulação da água e expostos a fotoperíodo regular de 12 horas claro/escuro. A temperatura, os níveis de oxigênio dissolvido (método de Winkler) e valores de pH da água dos tanques experimentais foram continuamente avaliados. Os valores registrados desses parâmetros durante o período experimental foram  $28,36 \pm 0,14^\circ\text{C}$ ,  $5,67 \pm 0,10$  mg/L e  $5,92 \pm 0,08$ , respectivamente.

Os juvenis de tambaqui foram adquiridos em uma fazenda comercial, com peso médio de  $33,77 \pm 0,74$  g, e distribuídos, segundo delineamento inteiramente casualizado, em nove tanques, sendo dez peixes por tanque e três repetições por tratamento.

Três dietas experimentais foram formuladas usando a dieta basal, diferindo apenas quanto à suplementação de ácido L-ascórbico (0, 100 e 500 mg/kg de ração) (Tabela 1). Os peixes foram alimentados com as dietas-teste por dez semanas, uma vez ao dia, até a saciedade, e a quantidade consumida foi registrada para o cálculo da conversão alimentar. Tanto no início quanto no final do período experimental foram registrados o peso e dados de sobrevivência.

Ao final do experimento, oito peixes de cada tratamento foram sacrificados para avaliação do estado de saúde por meio da determinação de parâmetros hematológicos. Após serem anestesiados com 100 mg/L de benzocaína, procedeu-se à coleta de sangue mediante punção de vasos caudais com seringas heparinizadas; as amostras foram acondicionadas em gelo fundente, até o momento de uso.

O hematócrito (Ht) foi obtido pelo método de Goldenfarb et al. (1971); a concentração de hemoglobina (Hb), segundo o método da cianometahemoglobina (Kampen & Zijlstra, 1964); e a contagem do número de eritrócitos (RBC) em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico com objetiva de 40 vezes, após diluição do sangue em solução de formol citrato. O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular

média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados conforme Brow (1976).

Os resultados obtidos foram expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão da média. As diferenças obtidas entre as médias dos diferentes tratamentos foram estabilizadas por análise de variância de um fator (one way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Zar, 1999).

### Resultados e Discussão

Os tambaquís alimentados com as dietas suplementadas com ácido L-ascórbico apresentaram ganho de peso significativamente maior ao final das dez semanas do que o grupo alimentado com ração isenta desta vitamina, com valores diretamente proporcionais ao nível de ácido L-ascórbico empregado na dieta (Tabela 2).

As taxas de conversão alimentar aparente foram significativamente melhores nos grupos de animais alimentados com dietas com ácido L-ascórbico em comparação ao grupo que não recebeu esse suplemento (Tabela 2). Naqueles, a conversão alimentar foi melhor no grupo que recebeu a maior quantidade

de (500 mg/kg), tendo sido observado o mesmo padrão já relatado no ganho de peso (Tabela 2).

A necessidade de suplementar adequadamente a dieta do tambaqui com ácido ascórbico, decorre principalmente do fato de essa espécie, assim como outras, ser incapaz de sintetizar esta vitamina (Fracalossi et al., 2001), pela falta da enzima L-gulonolactona oxidase, que catalisa o último passo da produção de ascorbato (Touhata et al., 1995).

As dietas suplementadas com ácido L-ascórbico na proporção de 100 e 500 mg/kg promoveram melhor desenvolvimento do tambaqui, o que, segundo Koenig (1984), pode ser atribuído ao seu efeito na síntese de proteínas. A suplementação dietária de ácido ascórbico implica, também, incremento de ganho de peso, melhor taxa de conversão alimentar e maiores taxas de sobrevivência, como relatado com *Clarias gariepinus* e *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (híbridos de tilápia) (Shiau & Hsu, 1999; Adham et al., 2000). Com relação à espécie *Astronotus ocellatus*, Fracalossi et al. (1998) relataram ganho de peso significativamente menor, apenas 37% do seu peso inicial, no grupo de animais que não recebeu o ácido ascórbico polifosfato, em comparação com os animais alimentados com 25, 75 e 200 mg/kg, com ganho de peso de 112%, 102% e 91%, respectivamente.

Com base nos dados de crescimento e sobrevivência dos peixes ao final do período experimental, cuja avaliação é uma prática comum nesses estudos, pode-se sugerir a adoção de uma suplementação mínima de ácido L-ascórbico de 100 mg/kg na dieta para tambaquís cultivados. Este resultado está entre

**Tabela 1.** Formulação e composição química das dietas experimentais de juvenis de tambaquís.

Ingrediente	Teor na ração (%)
Fubá de milho	55
Farelo de soja	10
Farinha de peixe	29
Farinha de trigo	5
Premix vitamínico <sup>(1)</sup> e mineral <sup>(2)</sup> isento de ácido L-ascórbico	1
Composição química	Teor (g/100 g de matéria seca)
Proteína bruta	27,5
Lipídios	6,4
Carboidratos	59,2
Mínerais	6,2
Fibra bruta	0,7
Energia bruta (kcal EB/100 g)	406,0

<sup>(1)</sup>Vit. A, 8,0.10<sup>6</sup> UI; Vit. D<sub>3</sub>, 1,8.10<sup>6</sup> UI; Vit. E, 66,66 g; Vit. B<sub>1</sub>, 6,66 g; Vit. B<sub>2</sub>, 13,33 g; Pantotenato de Ca, 33,33 g; Biotina, 533,3 mg; Ácido fólico, 2,66 g; Ácido nicotínico, 100,0 g; Vit. B<sub>12</sub>, 20,0 mg; Vit. K<sub>3</sub>, 6,66 g; veículo q.s.p., 1,0 kg. <sup>(2)</sup>Composição por 100 g: Mg, 1,0; Zn, 16,0; Fe, 4,0; Cu, 1,0; I, 0,5; Se, 0,05; Co, 0,01.

**Tabela 2.** Ganho de peso final, conversão alimentar e sobrevivência de tambaquís após dez semanas de alimentação com dietas contendo diferentes concentrações de ácido L-ascórbico<sup>(1)</sup>.

Ácido L-ascórbico (mg/kg)	Ganho de peso final (%)	Conversão alimentar <sup>(2)</sup>	Sobrevivência (%)
0	45,02a	3,97a	100a
100	82,74b	2,54b	100a
500	99,85b	1,76b	100a

<sup>(1)</sup>Nas colunas, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>(2)</sup>Quantidade de alimento consumido/ganho de peso.

os observados para espécies brasileiras, como o pacu e o acará-açu, cujas exigências são de 139 e 25 mg/kg, respectivamente, utilizando fontes estabilizadas e protegidas de ácido ascórbico (Martins, 1995; Fracalossi et al., 1998).

Sintomas de deficiência como escoliose, lordose ou mortalidade, não foram registrados nos tambaquis que receberam dietas isentas de ácido ascórbico. Resultados semelhantes foram constatados em truta arco-íris e acará-bandeira, os quais não apresentaram qualquer sinal de deficiência que pudesse ser atribuído à ausência do ácido ascórbico na dieta (Matusiewicz et al., 1995; Blom & Dabrowski, 2000). Crescimento reduzido, todavia, que é um sintoma de deficiência de ácido ascórbico, por causa da inadequada síntese de colágeno, tem sido observado em várias espécies de peixes (Li & Robinson, 1999; Shiau & Hsu, 1999; Adham et al., 2000), como o foi em relação ao tambaqui.

A taxa de hematócrito e o número de eritrócitos foram diretamente proporcionais aos níveis de ácido L-ascórbico da dieta (Tabela 3). Uma redução discreta, porém significativa, nos valores de hematócrito e RBC foi observada nos animais do grupo que não recebeu ácido L-ascórbico, principalmente em comparação aos animais do grupo que recebeu 500 mg/kg (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram constatados em relação à truta arco-íris, carpa indiana (*Cirrhina mrigala*), bagre de canal, pacu, acará-açu e *Clarias gariepinus* (Agrawal & Mahajan, 1980; Martins et al., 1995; Fracalossi et al., 1998; Li & Robinson,

1999; Adham et al., 2000). Por sua vez, não foram observadas alterações nos valores de hematócrito e RBC com suplementação com ácido L-ascórbico de 100 e 500 mg/kg.

É comum a diminuição do hematócrito em animais que não receberam suplementação vitamínica de ácido ascórbico (Adham et al., 2000), e a redução no Ht, Hb e RBC pode ser caracterizada como anemia. Isso mostra que o ácido ascórbico é um nutriente indispensável na manutenção dos processos fisiológicos de diferentes animais, incluindo os peixes, e que uma das suas funções está relacionada ao metabolismo do ferro (National Research Council, 1983; Lim et al., 2000).

Os valores de hemoglobina no grupo que recebeu dieta isenta de vitamina C foram significativamente maiores em comparação ao tratamento que recebeu a suplementação de 100 mg/kg (Tabela 3). Os resultados com o tambaqui contrastam com os dados apresentados na literatura de redução nos valores de hemoglobina nesta condição experimental (Adham et al., 2000), pela redução na absorção e redistribuição de Fe e, conseqüentemente, na síntese de hemoglobina.

O aumento na concentração de hemoglobina foi responsável pelos maiores valores observados em relação às constantes corpusculares HCM e CHCM nos animais do grupo que não recebeu ácido L-ascórbico, cujos valores foram significativamente diferentes dos observados nos tratamentos que receberam 100 e 500 mg/kg (Tabela 3). Quanto ao VCM, observou-se aumento nesta constante no grupo que recebeu dieta isenta de ácido L-ascórbico, porém esses valores não diferiram significativamente dos demais tratamentos (Tabela 3). Essas variáveis do sangue periférico sugerem uma condição anêmica com tendência normocrômica/normocítica. Os incrementos nos valores de VCM verificados nos tambaquis alimentados sem ácido L-ascórbico são semelhantes aos relatados em relação à carpa indiana (Agrawal & Mahajan, 1980), e os incrementos observados nos valores de HCM e CHCM são similares aos relatados com o pacu do Pantanal (Martins et al., 1995). Desta forma, as alterações fisiológicas observadas neste trabalho, refletidas em alguns índices hematológicos, são importantes indicadores de deficiências alimentares bem como de mudanças na

**Tabela 3.** Níveis de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tambaquis alimentados com ácido L-ascórbico. Os valores expressam a média±desvio-padrão da média<sup>(1)</sup>.

Parâmetros hematológicos	Ácido L-ascórbico (mg/kg na dieta)		
	0	100	500
Ht (%)	27,94±1,60a	31,50±0,89ab	32,75±1,01b
Hb (g/dL)	10,05±0,58a	8,11±0,58b	9,04±0,32ab
RBC (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,30±0,10a	1,60±0,13ab	1,74±0,08b
VCM (µm <sup>3</sup> )	232,44±35,63a	202,23±11,47a	190,01± 6,07a
HCM (pg)	83,09±12,18a	51,70±4,20b	52,75±2,89b
CHCM (%)	36,20±1,50a	25,85±1,81b	27,68±0,90b

<sup>(1)</sup>Nas linhas, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

homeostase orgânica do tambaqui, ressaltando-se a importância do fornecimento de uma suplementação adequada de ácido L-ascórbico para prevenir patologias.

### Conclusões

1. A suplementação com vitamina C (ácido L-ascórbico) é indispensável em dietas para o tambaqui, e a dose mínima recomendada na ração é de 100 mg/kg.

2. A presença de ácido L-ascórbico na dieta do tambaqui proporciona melhor ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência.

3. A ausência do ácido L-ascórbico na dieta do tambaqui causa redução do hematócrito e do número de eritrócitos, que caracteriza anemia, com tendência normocrômica/normocítica.

### Referências

- ADHAM, K. G.; HASHEM, H. O.; ABU-SHABANA, M. B.; KAMEL, A. H. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 6, p. 129-139, 2000.
- AGRAWAL, N. K.; MAHAJAN, C. L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp, *Cirrhina mrigala* Hamilton, due to avitaminosis C during early growth. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 3, p. 231-248, 1980.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: Sociedade Civil Mimirauá/CNPq, 1998. 186 p.
- BLOM, J. H.; DABROWSKI, K. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 1073-1080, 1995.
- BLOM, J. H.; DABROWSKI, K. Vitamin C requirements of the Angelfish *Pterophyllum scalare*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, n. 1, p. 115-118, 2000.
- BROW, B. A. **Hematology: principles and procedures**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1976. 504 p.
- DABROWSKI, K.; MOREAU, R.; EL SAIDY, D.; EBELING, J. Ontogenetic sensitivity of channel catfish to ascorbic acid deficiency. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 8, p. 22-27, 1996.
- FRACALLOSSI, D. M.; ALLEN, M. E.; NICHOLS, D. K.; OFTEDAL, O. T. Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 1745-1751, 1998.
- FRACALLOSSI, D. M.; ALLEN, M. E.; YUYAMA, L. K.; OFTEDAL, O. T. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 192, p. 321-332, 2001.
- GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune: Tropical Fish Hobbyist, 1977. 672 p.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, T.; BROSIUS, E. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.
- GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; BERGOT, P.; KAUSHIK, S. J. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 161, p. 453-461, 1998.
- HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas – II: alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 4, p. 47-53, 1974.
- KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Erythrocytometric methods and their standardization. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 6, p. 538-542, 1964.
- KOENING, J. Importance of vitamin C in ichthyophysiology and practice of pisciculture. **Ichthyophysiological Acta**, Lion, v. 8, p. 41-57, 1984.
- LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 9, n. 2, p. 53-79, 1999.
- LIM, C.; KLESZIUS, P. H.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 185, p. 313-327, 2000.
- LOVELL, R. T. Dietary requirements for ascorbic acid by warmwater fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). **Ascorbic acid in aquatic organisms: status and perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 97-103.
- MARTINS, M. L. Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry

- (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 563-568, 1995.
- MARTINS, M. L.; CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F.; URBINATI, E. C. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Curitiba, v. 12, p. 609-618, 1995.
- MATUSIEWICZ, M.; DABROWSKI, K.; VOLKER, L.; MATUSIEWICZ, K. Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, p. 3055-3061, 1995.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Washington, Estados Unidos). **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academy Press, 1993. 114 p.
- SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 54, p. 205-240, 1986.
- SHIAU, S. Y.; HSU, T. S. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 175, p. 317-326, 1999.
- TOUHATA, K.; TOYOHARA, H.; MITANI, T.; KINOSHITA, M.; SATOU, M.; SAKAGUCHI, M. Distribution of L-gulono-1,4-lactone oxidase among fishes. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 729-730, 1995.
- VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, Pretoria, v. 33, p. 107-114, 1998.
- WOODWARD, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 124, p. 133-168, 1994.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.