

Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C

Marcela Mataveli¹, Gentil Vanini de Moraes^{2*}, Danilo Pedro Streit Junior³, Ricardo Pereira Ribeiro² e Eliane Gasparino²

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio Branco, Acre, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ³Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
*Autor para correspondência. E-mail: gvmoraes@uem.br

RESUMO. A vitamina C atua na proteção de danos celulares provocados pelos radicais livres, sendo a suplementação considerada essencial para a maioria das espécies de peixes, uma vez que não a sintetizam em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase. Assim, avaliou-se o efeito da suplementação de 0, 75, 150 e 225 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração na qualidade do sêmen em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os parâmetros quali-quantitativos do sêmen não foram influenciados pela suplementação de vitamina C, exceto a motilidade progressiva que aumentou linearmente com adição de vitamina C. Conclui-se que os reprodutores de tilápias do Nilo devem ser suplementados com 225 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração.

Palavras-chave: antioxidante, radicais livres, reprodução, suplementação.

ABSTRACT. Semen quality in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), fed with diets containing different vitamin C levels. Vitamin C acts as cellular protection from damage by free radicals, and vitamin C supplementation is considered essential for most fish species, as they do not synthesize it due to the absence of enzyme L-gulonolactone oxidase. Thus, the effect of supplementation with 0, 75, 150 and 225 mg of vitamin C kg⁻¹ of ration was evaluated in the semen quality in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Seminal parameters were not influenced by vitamin C supplementation except progressive motility, which increased linearly with the addition of vitamin C. It was concluded that Nile tilapia reproducers should be supplemented with 225 mg vitamin C kg⁻¹ ration.

Key words: antioxidant, free radicals, reproduction, supplementation.

Introdução

A vitamina C assume importância considerável na vida animal em razão de ação em vários processos metabólicos. Esta vitamina é considerada essencial para a maioria das espécies de peixes, uma vez que não a sintetizam em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase (BARROS et al., 2002). A tilápia do Nilo não tem a capacidade de biossintetizar a vitamina C, portanto, esta, deve ser acrescentada à dieta (NSONGA et al., 2009).

As exigências nutricionais dos peixes por vitamina C são influenciadas por fatores como idade, tamanho, estado reprodutivo, estresse, entre outros (TOYAMA et al., 2000). Para Halver (1972), quando os peixes são expostos a situações estressantes, os requerimentos de vitamina C podem dobrar ou triplicar. Segundo Sönmez et al. (2005), o estresse oxidativo prejudica a qualidade do sêmen, estando associado à fertilidade do macho.

A quantidade de vitamina C necessária para o crescimento normal da tilápia do Nilo é de 50 mg de ácido ascórbico kg⁻¹ de dieta (NSONGA et al., 2009). No entanto, Verlhac e Gabaudan (1994) recomendaram, para tilápias, a utilização de 150 a 250 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração.

A vitamina C é essencial para a síntese, desenvolvimento e manutenção do sêmen normal, reduzindo as aglutinações dos espermatozoides (CHINOY et al., 1986). Para Sönmez et al. (2005), a deficiência de vitamina C causa redução na performance reprodutiva.

De acordo com Luck et al. (1995), a vitamina C atua na proteção de danos celulares provocados pelos radicais livres, que são partículas moleculares desequilibradas, geradas em reações com interferência do oxigênio, que podem prejudicar as células. Ainda, o autor afirmou que os radicais livres podem desencadear reações nocivas que podem ser prevenidas mediante a presença de vitaminas.

Segundo Ciereszko e Dabrowski (2000), a vitamina C protege o DNA do espermatozoide contra danos oxidativos. Sönmez et al. (2005) relataram que a produção de oxigênio reativos oriundos da atividade metabólica é um evento normal que contribui, fisiologicamente, para o funcionamento de vários órgãos, incluindo a mesma atividade no tecido testicular. Contudo, a membrana plasmática do espermatozoide contém altas quantidades de ácidos graxos insaturados susceptíveis à peroxidação lipídica e esta, leva à desestabilização da estrutura lipídica da membrana plasmática do espermatozoide, estando associada à queda da motilidade progressiva. Segundo Guerra et al. (2004), os lipídeos encontrados nas membranas plasmáticas, acrossomal e da gota citoplasmática, são os principais alvos de ataque de espécies de oxigênios reativos. Para Dalvit et al. (1998), a geração de peróxidos lipídicos dificulta a fusão entre o espermatozoide e oócito, por ocasionarem alteração na membrana plasmática. Recentemente, descobriu-se de maneira casual que a vitamina C protege o espermatozoide de humanos contra danos genéticos e tende a evitar os defeitos congênitos (COLAGAR; MARZONY, 2009; SITIOS, 2001), fator destacado por Dabrowski e Moreau (1996) ao notarem o desenvolvimento de gametas de alta qualidade e resistentes ao estresse mediante à suplementação de vitamina C.

Dietas sem a suplementação de vitamina C resultaram na diminuição da concentração espermática, motilidade espermática progressiva e habilidade de fertilização (CIERESZKO; DABROWSKI, 2000). Sitios (2001) observou, por meio de experimentos científicos realizados com humanos, na Califórnia - Estados Unidos, que a diminuição na quantidade diária de vitamina C gerava sêmen de pior qualidade e que homens que ingeriram 60 mg dia⁻¹ de vitamina C apresentaram melhoria na qualidade do sêmen em relação aos que ingeriram valores inferiores. O autor demonstrou também que a concentração de vitamina C, no sêmen de humanos, é oito vezes maior que no sangue.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das diferentes concentrações de vitamina C, implementadas na dieta, sobre a qualidade do sêmen de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Material e métodos

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (Codapar/UEM), situada no distrito de Floriano, Município de Maringá, Estado do Paraná, de 1º de

fevereiro de 2005 a 21 de março de 2005, totalizando 48 dias de suplementação de vitamina C.

Foram utilizados 48 machos de tilápias do Nilo, com peso médio inicial de 301,46 ± 80,93 g. Os peixes foram, aleatoriamente, distribuídos em quatro tratamentos, com 12 animais por tratamento, divididos em seis repetições, com dois indivíduos cada.

A estufa continha 24 caixas d'água de fibra de vidro, com capacidade para 250 litros cada, com taxas de renovação diária de água de 50%.

Após a implantação do experimento, diariamente, foram aferidas as medidas de temperatura da água com termômetro Incoterm comum e, semanalmente, foram medidos o pH com pHmetro portátil Máster F-1002, a condutividade elétrica com medidor de condutividade modelo DC-860 e o oxigênio dissolvido com oxímetro F-5050, de uma amostra aleatória de três caixas d'água por tratamento, abrangendo as duas estufas. Foram avaliados um controle e três diferentes suplementações de ácido ascórbico monofosfato (Rovimix C - EC® a 98%, da Roche do Brasil S/A): 1) sem suplementação de vitamina C; 2) com 75 mg de vitamina C; 3) com 150 mg de vitamina C; e 4) com 225 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração.

Os animais foram alimentados com ração peletizada contendo 28% de proteína bruta e 3.000 kcal kg⁻¹ de energia digestível, mas o suplemento vitamínico foi formulado sem vitamina C, com a finalidade de destacar os efeitos da vitamina C, nos tratamentos (Tabela 1).

As dietas foram oferecidas, diariamente, às 10 e às 15h, com base em 1% da biomassa total de cada caixa d'água até a colheita do sêmen e a desova.

O sêmen foi colhido com os animais retirados dos recipientes de cultivo e enrolados em uma toalha úmida e apoiado sobre uma porção de espuma de densidade 30, sobre uma mesa de manipulação. Em seguida, a região genital e as nadadeiras anal foram enxutas com toalha de papel, e realizada a extrusão, comprimindo-se a região abdominal, no sentido céfalocaudal (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

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

Ingrediente ¹	Quantidade (%)
DL-metionina	0,15
BHT ²	0,02
Farinha de peixe	8,00
Fosfato bicalcítico	2,50
Farelo de trigo	15,00
L-Lisina	0,10
Milho moído	24,48
Farelo de soja	46,00
Óleo de soja	3,00
Suplemento mineral e vitamínico ³	0,50
Sal comum	0,25

¹Valores expressos em 100% de matéria seca. ²BHT: di-terc-butil metil fenol. ³Formulado sem vitamina C.

A papila urogenital foi seca com toalha de papel para reduzir o risco de contaminação do sêmen (GODINHO et al., 2003). O sêmen foi coletado em seringas de insulina, devidamente identificadas, enquanto os ovócitos foram coletados em bacias plásticas identificadas.

Do sêmen colhido de cada tilápia do Nilo foram analisados o volume, a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático e o pH no Laboratório da Estação Experimental (Codapar/UEM), enquanto a concentração e a morfologia espermática foram analisadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Em relação à avaliação do sêmen, adotaram-se os procedimentos de Sörensen Jr. (1979), adaptados para peixes (MATAVELI et al., 2007), descritos como segue:

Volume: foi realizada a massagem na região abdominal céfalo-caudal até esgotar a liberação do sêmen, coletado em seringas de insulina, nas quais se fez a leitura do volume.

Concentração espermática: o sêmen foi diluído em um bécker, utilizando a pipeta de Shalli (0,02 mL) e 10 mL de formol-salina tamponada, resultando a diluição de 1:500. Após a diluição, a solução sêmen solução⁻¹ diluente foi armazenada em recipientes devidamente identificados e levados ao laboratório para a realização desta análise. A câmara de Neubauer foi preenchida, por capilaridade, e foram contados os espermatozoides de cinco quadrados maiores do campo de 1 mm². Os espermatozoides contados nos referidos quadrados foram somados, divididos por 80 quadrados pequenos, multiplicados por 400 quadrados pequenos, pela diluição e pela altura da câmara, para que se pudesse obter a quantidade de espermatozoides por mm³ de sêmen.

Motilidade espermática progressiva e vigor espermático: em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída uma gota de sêmen em seis a oito gotas de bicarbonato de sódio a 1% e, deste diluído, colocou-se uma gota (0,03 mL - pipeta de Pasteur) sobre outra lâmina e sobre a gota colocou-se uma lamínula e levada ao microscópio de contraste de fase em aumento de 400x e avaliadas, subjetivamente, ambas as variáveis. Para avaliar a motilidade espermática progressiva foi utilizado um escore de 0 a 100% e para vigor espermático um escore de 0 a 5 pontos.

pH: foi utilizado papel de tornassol, colocando uma gota de sêmen sobre a fita, efetuando a leitura em escala própria.

Cor: para esta variável foi utilizado um escore de 1 a 3 pontos, e um representou a coloração branco cremoso, dois branco leitoso e três branco aquoso.

Morfologia espermática: para esta análise foram feitos dois esfregaços com sêmen diluído em formol-salina tamponada, na proporção de 1:500 (sêmen solução⁻¹ diluente, respectivamente). Os esfregaços foram corados pelo método Rosa de Bengala e depois de secos, levados ao microscópio de contraste de fase de 1000x. Foram consideradas anormalidades primárias cauda quebrada, enrolada, degenerada, macrocefalia, microcefalia e inserção abaxial de cauda e anormalidades secundárias cauda dobrada, cabeça solta, gotas citoplasmáticas proximal e distal, realizando a contagem de 200 espermatozoides entre as lâminas feitas de cada ejaculado.

Foi calculado o número total de espermatozoides com os valores dos volumes individuais e da concentração espermática.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado e os parâmetros volume de sêmen, concentração de espermatozoides, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e número total de espermatozoides no sêmen colhido, foram submetidos ao procedimento dos modelos lineares generalizados (SAS, 1992), considerando-se que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função de ligação canônica.

Resultados e discussão

Os valores médios obtidos de temperatura foram de $23,71 \pm 1,66$ e $29,28 \pm 1,59^\circ\text{C}$, no período da manhã e da tarde, respectivamente. O valor médio de pH foi $7,14 \pm 0,06$, o de condutividade elétrica de $0,31 \pm 0,02 \mu\text{S cm}^{-1}$ e o valor médio de oxigênio dissolvido foi $2,92 \pm 2,04 \text{ mg L}^{-1}$.

A motilidade espermática progressiva aumentou ($p < 0,05$) linearmente com adição de vitamina C (Figura 1), resultado que está de acordo com as observações de Dabrowski e Ciereszko (2001), que afirmaram que a motilidade progressiva é sensivelmente reduzida na ausência de vitamina C na ração de peixes.

A melhoria na motilidade espermática progressiva com a suplementação de vitamina C também foi verificada por Salem et al. (2001), ao administrarem, oralmente, 20 mg de vitamina C kg⁻¹ de peso vivo, para coelhos Nova Zelândia Branco. Guerra et al. (2004) afirmaram que o estresse oxidativo causa diminuição da motilidade espermática, e a habilidade em contrapor este estresse oxidativo depende da quantidade de antioxidantes celulares.

Entretanto, Ciereszko e Dabrowski (2000) observaram que a suplementação de 50 mg de vitamina C L⁻¹ de água, para truta arco-íris

(*Oncorhynchus mykiss*), durante 14 dias de estocagem, não melhorou a motilidade progressiva.

Os mesmos autores acreditaram que este fato possa estar relacionado ao curto período de suplementação de vitamina C, que pode não ter favorecido a espermatogênese.

O volume de sêmen, o vigor espermático, a concentração espermática, o número de espermatozoides colhidos, o percentual de espermatozoides normais, o percentual de anormalidades primárias e secundárias, o pH e a cor do sêmen não foram influenciados ($p > 0,05$) pela adição de vitamina C (Tabela 2).

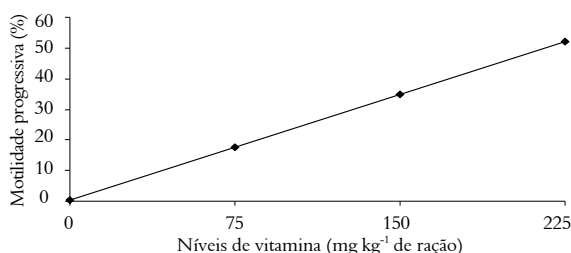


Figura 1. Motilidade espermática progressiva do sêmen em tilápia do Nilo, 48 dias após o início de suplementação de vitamina C. Motilidade espermática progressiva: $\hat{y} = 0,5 + 0,2286x$.

Mataveli et al. (2007) não observaram a influência da vitamina C no volume de sêmen, no vigor espermático, na concentração espermática e no número de espermatozoides colhidos no sêmen de tilápias do Nilo, quando alimentadas com rações contendo 0, 75, 150, 225 e 300 mg de ácido ascórbico monofosfatado a 35% kg⁻¹ de ração. Além disto, estes resultados estão de acordo com os encontrados nesta pesquisa na qual foi fornecido ácido ascórbico monofosfatado a 98%. Contudo, Yousef (2005) verificou que a administração de 40 mg de vitamina C kg⁻¹ de peso vivo dia⁻¹ aumentou o volume de sêmen em coelhos. Com relação à concentração espermática, a suplementação de vitamina C não resultou no aumento da mesma, mas Dabrowski e Ciereszko

(2001) verificaram que a ausência de vitamina C na alimentação de salmões reduziu a concentração de espermatozoides.

Sönmez et al. (2005) também verificaram que adição de 500 e 250 mg de vitamina C kg⁻¹ de peso vivo dia⁻¹, para ratos, aumentou a concentração espermática. Estes autores sugeriram que o aumento da concentração espermática pode ser explicado pela ativação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) mediante a presença do ácido ascórbico, visto que estes hormônios estimulam a espermatogênese, aumentando a concentração espermática.

Quanto à morfologia espermática não se observou diferença ($p > 0,05$) no percentual de espermatozoides normais e, nas anormalidades primárias e secundárias, entre os tratamentos. Este fato está de acordo com as observações de Mataveli et al. (2007), ao suplementarem tilápias do Nilo com 0, 75, 150, 225 e 300 mg de vitamina C por kg⁻¹. Yousef (2005) observou aumento no percentual de espermatozoides normais no ejaculado de coelhos, quando estes foram suplementados com 40 mg de vitamina C kg⁻¹ de peso vivo dia⁻¹. Diferentemente dos resultados observados nesta pesquisa, Dawson et al. (1992), administrando de 200 a 1.000 mg de vitamina C dia⁻¹ para humanos, Thiele et al. (1995), também trabalhando com humanos, com baixo teor de vitamina C no sêmen e Salem et al. (2001), trabalhando com coelhos Nova Zelândia Branco que receberam, via oral, 20 mg de vitamina C kg⁻¹ de peso vivo, verificaram efeito positivo de vitamina C na redução do índice de anormalidades, em especial das primárias.

Contudo, Mataveli et al. (2007) associaram, de um modo geral, a coloração branca cremosa a um sêmen que apresenta maior concentração de espermatozoides em relação às colorações branca leitosa e branca aquosa.

Tabela 2. Média estimada e o intervalo de confiança do volume de sêmen, vigor espermático, concentração espermática (CE), número de espermatozoides colhidos (NEC), índices de espermatozoides normais e anormalidades primárias e secundárias, pH e cor do sêmen em tilápia do Nilo, 48 dias após o início da suplementação de vitamina C.

Parâmetros	Média estimada	Distribuição de probabilidade	Intervalo de confiança	
Volume (mL)	0,352	Binomial	0,091	- 0,877
Vigor espermático (pontos)*	2,024	Poisson	1,261	- 2,965
CE (espermatozoides mL ⁻¹) x 10 ⁹	0,584	Binomial	0,217	- 1,203
NEC X 10 ⁹	0,092	Binomial	0,003	- 0,449
Espermatozoides normais (%)	16,852	Binomial	1,914	- 58,818
Anormalidades primárias (%)	38,697	Binomial	10,823	- 92,782
Anormalidades secundárias (%)	23,998	Binomial	4,285	- 70,559
pH	8,143	Normal	7,578	- 8,707
Cor (pontos)**	1,628	Binomial	0,952	- 2,502

*0 ponto indica ausência de vigor; 5 pontos indicam vigor máximo; **1 ponto indica a cor branca cremosa; 2 pontos, branco leitosa; 3 pontos, branco aquoso.

Conclusão

A suplementação de vitamina C aumentou a motilidade progressiva do sêmen de tilápias do Nilo. Portanto, recomenda-se a adição de 225 mg de vitamina C kg⁻¹ na alimentação de tilápias do Nilo, na fase reprodutiva.

Referências

- BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEEMANN, G. K.; HISANO, H.; ROSA, G. J. M. Níveis de vitamina C e ferro em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.
- CHINOY, N. J.; MEHTA, R. R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J. D.; CHINOY, M. R. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **International Journal of Fertility**, v. 31, n. 3, p. 232-239, 1986.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Effect of ascorbic acid supplement *in vitro* on rainbow trout sperm viability. **Aquaculture International**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2000.
- COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 144-149, 2009.
- DABROWSKI, K.; MOREAU, R. Do all fish need ascorbic acid? **Aquaculture magazine**, v. 22, n. 5, p. 96-98, 1996.
- DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 8, p. 623-638, 2001.
- DALVIT, G. C.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T. Effect of α -tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 619-627, 1998.
- DAWSON, E. B.; HARRIS, W. A.; TETER, M. C.; PWELL, L. C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 5, p. 1034-1039, 1992.
- GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003. (Supl. 1).
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HALVER, J. E. **Fish nutrition**. Orlando: Academic Press, 1972.
- LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLES, R. A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 262-266, 1995.
- MATAVELI, M.; MORAES, G. V.; STREIT JUNIOR, D. P.; VARGAS, L. D. M.; SAKAGUTI, E. S.; TONIATO, J. C.; BARBOSA, R. C.; MERLINI, L.

Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2007.

NSONGA, A. R.; KANG'OMBE, J.; MFITILODZE, W.; SOKO, C. K.; MTETHIWA, A. H. Effect of varying levels of dietary vitamin C (ascorbic acid) on growth, survival and hematology of juvenile tilapia, *Oreochromis karongae* (Trewavas 1941) reared in aquária. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 17-23, 2009.

SALEM, M. H.; KAMEL, K. I.; YOUSEF, M. I.; HASSAN, G. A.; EL-NOUTY, F. D. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. **Toxicology**, v. 162, n. 3, p. 209-218, 2001.

SAS-Institute Analyses System. **Software**: changes and enhancements, release 6.07. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1992. (ch. 16, p. 287-366. SAS Technical Report, p. 229).

SITIÓS. **Protección a la semilla**. 2001. Disponível em: <<http://www.lacuarta.cl/sitios/vas/2001/01/14/sexil.html>>. Acesso em: 18 mar. 2003.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 2063-2072, 2005.

SÖRENSEN JR., A. M. **A laboratory for animal reproduction**. 4. ed. Massachusetts: American Press, 1979.

THIELE, J. J.; FREISLEBEN, H. J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 110-155, 1995.

TOYAMA, G. N.; CORRENTE, J. E.; CYRINO, J. E. P. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Saint-Louis Cedex: Société Chimique Roche, 1994.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Tradução Vera Lúcia Mixtra Chame. Brasília: Escopo. 1983. (Tradução de "The artificial propagation of warm – water finfishes").

YOUSEF, M. I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. **Toxicology**, v. 207, n. 1, p. 81-89, 2005.

Received on July 31, 2009.

Accepted on April 30, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.