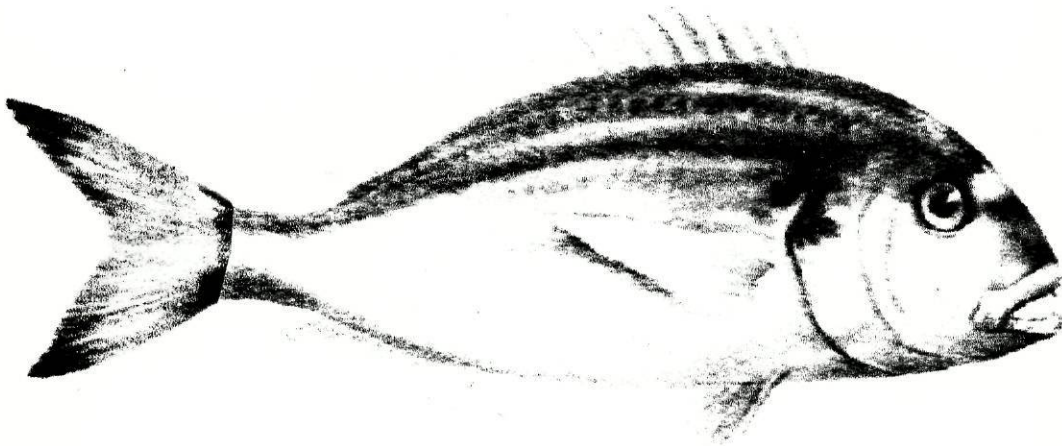


MARIA MANUELA FERREIRA HENRIQUE

IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SUA
INFLUÊNCIA NA FISIOPATOLOGIA DO STRESS EM DOURADA
(*SPARUS AURATA*)



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO, 2000

MARIA MANUELA FERREIRA HENRIQUE

IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SUA
INFLUÊNCIA NA FISIOPATOLOGIA DO STRESS EM DOURADA
(*SPARUS AURATA*)

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE NUTRIÇÃO.



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO, 2000

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas e instituições que de algum modo contribuíram para que este trabalho fosse possível quero manifestar aqui os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família pelo apoio incondicional que me deram durante o tempo de realização deste estudo. Sem eles teria sido impossível a sua realização. Quero agradecer muito especialmente ao meu irmão Dr. Rui Henrique. Não só sempre foi um amigo muito especial e sempre presente, como me ajudou na realização de trabalho de microscopia electrónica.

Ao Prof. Eng. Emídio Gomes, orientador deste trabalho, pela sua amizade e dedicação indispensáveis à realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Marie Françoise Guillou-Coustans, co-orientadora desta tese, pela sua amizade, paciência, crítica construtiva e disponibilidade que me dispensou durante a realização da tese.

Ao Prof. Doutor Simon Davies, co-orientador, pela sua ajuda na idealização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Aires Oliva-Teles pela disponibilização das instalações de aquário e de laboratório.

À Prof. Doutora Jeanine Person-Le Ruyet, pela sua amizade, orientação e ajuda prática que tão gentilmente me dispensou.

À Doutora Graça Casal, uma amiga muito especial que, para além da sua amizade, dispensou-me a sua preciosa ajuda no trabalho de microscopia Electrónica.

Gostaria também de agradecer à minha amiga Prof. Doutora Helena Péres pela sua amizade e ajuda nos longos períodos de experimentais que passamos juntas no Instituto de Zoologia Marinha Dr. Augusto Nobre, na Foz. Sem a tua ajuda esses tempos teriam sido muito mais difíceis...

Ao meu amigo Dr. Jorge Dias queria também agradecer-lhe por todo o apoio e amizade que dispensou durante os períodos que passei em França. Foste bestial!

À Doutora Karine Pichavan, pela amizade que me dispensou e à ajuda fundamental que me concedeu na realização do estudo de hipóxia intermitente.

A todos aqueles que me ajudaram no trabalho prático deste estudo, para o qual o trabalho de equipa é indispensável, aqui vai o meu sincero obrigado. Desta equipa fizeram parte a Dr.^a Renata Serradeiro, o Dr. Tiago Aires os técnicos das instalações da Foz na cidade do Porto. No centro de Brest do IFREMER, os meus agradecimentos vão para todo o pessoal da Unidade Mista de Nutrição de peixes INRA/IFREMER e do Laboratório de Investigação Aquícola, especialmente aos técnicos Hervé Chartois, Hervé Le Delliou, Christine Huelvan, Elizabeth Desbruyères, Patrick Kasuguel e Nicholas Le Bayon. Para além de excelentes técnicos revelaram ser excelentes amigos!

Aos amigos que fiz durante a realização deste trabalho, alguns já mencionados, quero agradecer por terem tornado este período da minha vida tão mais “interessante”...

Ao ICBAS, por me ter aceite como aluna de Doutoramento, à Faculdade de Ciências do Porto e Ao IFREMER quero agradecer por terem dispensado gentilmente as suas instalações e facilidades para a realização deste projecto.

Este trabalho foi financiado pela JNICT, Programa PRAXIS XXI (BD/4562/94).

RESUMO

A produção comercial de espécies aquícolas implica a sujeição destas a manipulações e perturbações constantes, bem como a alterações das condições ambientais do meio aquático onde se encontram. Todos estes factores provocam stress, o qual induz perdas económicas significativas. Deste modo, já que não é possível evitar a aplicação de factores de stress aos animais de cultura, torna-se necessário encontrar formas de aumentar a resistência destes ao stress.

O ácido ascórbico (AA) é um nutriente, essencial para a maior parte das espécies de peixes, a quem têm sido atribuídas propriedades anti-stress. Dado que é um nutriente acessível e de administração fácil (é incluído no alimento), é ideal para o uso em aquacultura. No entanto, apesar dos estudos efectuados, a relação entre o AA e a resistência dos peixes ao stress ainda não está completamente esclarecida. Deste modo, este estudo pretende dar mais um passo no esclarecimento deste tema. Neste intuito, foi determinado que se utilizaria o stress ambiental, uma vez que é mais o mais corrente em condições de aquacultura, e aquele em que os resultados são menos esclarecedores. A hipóxia e a amónia são 2 dos principais factores de stress ambiental a que os peixes estão sujeitos em condições de cultura, pelo foram os escolhidos para este estudo. A dourada (*Sparus aurata*) escolhida como modelo, já que é uma das espécies de cultura mais importantes do nosso país.

A dourada foi, em primeiro lugar, sujeita a hipóxia aguda (1.2 mg OD/l; 24h) depois de um período de 12 semanas de alimentação com um alimento suplementado com 0, 25, 50, 100 ou 200 mg AA/kg. Na experiência seguinte a dourada foi submetida a hipóxia intermitente (25% OD, 1 vez/semana) durante 13 semanas, ao mesmo tempo que era alimentada com diferentes concentrações de AA (0, 50 ou 100 mg/kg alimento).. durante esta experiência os peixes foram infectados inadvertidamente com um parasita branquial, o *Diplectanum aequans*, o que causou mortalidades aumentadas nos grupos alimentados sem suplementação de AA. Seguidamente, a dourada foi sujeita a hipóxia crónica (55% OD) durante 8 semanas, período durante o qual foi alimentada com uma ração (baseada no nível de saciedade dos peixes stressados) contendo 0, 10, 25 ou 50 mg AA/kg alimento. Durante esta experiências foi avaliado o crescimento dos peixes, foram procurados sintomas exteriores de deficiência em AA, bem como foram monitorizados os níveis de AA no fígado, rim e baço (apenas fígado e baço na 1ª experiência). Na experiência de hipóxia crónica também foi determinado o nível de hidroxiprolina da pele. Finalmente, a dourada foi sujeita a uma concentração subletal de amónia (1.48 mg UIA-N/l), depois de 5 meses de crescimento com alimentos contendo 0, 10, 25 ou 50 mg AA/kg. Esta última experiência durou 4 dias, tendo os peixes estado em jejum durante este período, bem como nas 24h anteriores ao seu início.

As experiências efectuadas no âmbito deste trabalho mostraram que:

- A ausência de suplementação do alimento em AA não produziu diferenças nos parâmetros de crescimento nem sintomas de deficiência na dourada, mesmo após 5 meses de crescimento., excepto quando na presença do parasita *Diplectanum aequans*.
- A ausência de AA no alimento diminuiu a capacidade de resistência da dourada ao parasita *Diplectanum aequans*, o que se traduziu num aumento significativo da mortalidade.
- A suplementação do alimento com 10 mg AA/kg alimento é suficiente para o crescimento máximo da dourada.
- O stress de hipóxia agudo, intermitente ou crónico não produziu alterações no crescimento nem do teor em AA no fígado, rim e baço da dourada.
- O stress de hipóxia intermitente não aumentou a susceptibilidade da dourada ao parasita *Diplectanum aequans*.
- A exposição da dourada a concentrações subletais de amónia provocou um aumento do nível de AA no fígado rim e baço.

A comparação destes resultados com os da bibliografia conduziu às seguintes conclusões:

- Os requisitos de AA dos peixes diminuem com o aumento do tamanho dos peixes.
- O AA não aumenta a resistência dos peixes a todos os factores de stress.
- O AA só parece aumentar a resistência àqueles factores de stress que provocam alterações fisiológicas que aumentem a utilização desta vitamina por parte dos peixes. Um exemplo são os poluentes.

SUMMARY

Commercial aquaculture implies the application of several stressors to the cultivated animals, such as handling, crowding, disease treatments and water quality changes. These stressors are responsible for important economical losses in fish farming and, since they cannot be avoided, the increase of fish resistance to stressors is a major field of research.

Ascorbic acid, which is a vitamin for most fish species, has been widely studied as having the ability to increase fish resistance to stress. However, results are contradictor and no definite conclusions can be withdrawn. The present study is a further step on the clarification of the AA role on fish resistance to stress. For this purpose it was chosen environmental stress, since it is the kind of stress where it is more difficult to find a link between AA and resistance to stress. Hypoxia and ammonia are 2 of the most common stressors in aquaculture and an increased resistance to them would be very welcome by fish farmers. For the experiments seabream (*Sparus aurata*) was chosen as a model, because it is one of the most important cultured species in Portugal.

Seabream was subjected primarily to acute hypoxia (1.2 mg OD/l; 24 h) after 12 weeks of feed with a diet containing 0, 25, 50, 100 or 200 mg AA/kg. In the following experiment, fish were subjected to a weekly hypoxia (25% OD) for 13 weeks, while fed different amounts of AA (0, 50 or 100 mg/kg diet). During this experiment fish were infected with a gill parasite, *Diplectanum aequans*, which caused increased mortality in the fish fed the unsupplemented diet. Subsequently, seabream was subjected to chronic hypoxia (55% OD) for 8 weeks, at the same time they were fed a ration (based on the stressed fish satiation) with 0, 10., 25, or 50 mg AA/kg diet. In all experiments fish growth was evaluated and it was searched for AA deficiency symptoms. Liver, kidney and spleen AA status was monitored as well (liver and spleen only in the 1st experiment). In the chronic hypoxia experiment, skin hydroxipropine status was also determined. Finally, seabream were submitted to sublethal ammonia concentration (1.48 mg UIA-N/l), after 5 months of feeding with the experimental diets (0, 10, 25 or 50 mg AA/KG). The ammonia challenge lasted for 4 days and fish were starved 24h prior to it and throughout the challenge.

The experiments made in this study have shown that:

- Lack of dietary AA supplementation did not significantly changed seabream growth nor led to the development of deficiency symptoms, even after 5 months of growth, except when the parasite *Diplectanum aequans* was present.
- Lack of dietary AA supplementation decrease the seabream resistance to the presence of the parasite *Diplectanum aequans*.
- 10 mg AA/kg diet was sufficient to allow seabream's maximum growth and prevent the onset of scurvy.
- Acute, intermittent or chronic hypoxic stress did not altered seabream's growth nor the liver, kidney and spleen AA content.
- Intermittent hypoxia did not increase susceptibility of the seabream to the parasite *Diplectanum aequans*.
- Exposure to sublethal level of ammonia increased AA concentration in the liver, kidney and spleen of the seabream.

In conclusion, ascorbic acid appears to increase resistance only to some stressors. These stressors are those that increase AA utilisation, such as pollutants and increased temperature, among others.

RÉSUMÉ

L'aquaculture commerciale implique l'application de plusieurs facteurs de stress aux animaux cultivés, tels que la manipulation, la densité élevée, les traitements des maladies et les changements de la qualité de l'eau. Ces facteurs de stress sont responsables par des pertes économiques importantes dans la pisciculture et, puisqu'elles ne peuvent pas être évitées, l'augmentation de la résistance de poissons aux facteurs de stress est un thème de recherche importante.

L'acide ascorbique, qui est une vitamine pour la plupart des espèces de poissons, a été largement étudié en tant qu'ayant la capacité d'augmenter la résistance de poissons au stress. Cependant, les résultats sont contradictoires et les conclusions sont pas claires. Le présente étude est une autre étape sur la clarification du rôle de le AA sur la résistance des poissons au stress. Pour ce but était choisi le stress de l'environnement, depuis est le genre de stress où il plus difficile de trouver un lien entre le AA et la résistance au stress. L'hypoxie et l'ammoniaque sont 2 des plus commun facteur de stress en aquaculture et une augmentation de la résistance à ces facteurs serait très bienvenu par des aquaculteurs. Pour cette étude la daurade (*Sparus aurata*) a été choisi comme modèle, parce que est une des espèces de culture plus importantes au Portugal.

La daurade a été soumis en première à l'hypoxie aiguë (1,2 mg OD/l; 24 h) après 12 semaines d'alimentation avec un régime contenant 0, 25, 50, 100 ou 200 mg AA/kg. Dans l'expérience suivante, des poissons ont été soumis à une hypoxie intermittent (25% OD) pendant 13 semaines, alors qu'ils étés nourris avec différentes quantités de AA (0, 50 ou 100 mg AA/kg). Pendant cette expérience les poissons ont été infectés avec un parasite branchial, le *Diplectanum aequans*, qui a provoqué l'augmentation de la mortalité dans les poissons nourris avec le régime sans supplementation de AA. Ultérieurement, la daurade a été soumis a l'hypoxie chronique (55% OD) pendant 8 semaines, en même temps ils ont été alimentés avec une ration (basée sur le niveaux de satiété des poissons stressés) avec 0, 10., 25, ou 50 mg AA/kg. Dans toutes les expériences la croissance des poissons a été évaluée et les symptômes carence en AA ont été recherchés; aussi bien que la teneur en AA du foie, du rein et de la rate ont été surveillé (foie et rate seulement dans la 1ère expérience). Dans l'expérience d'hypoxie chronique, la teneur en hydroxyproline de la peau a été également déterminé. En conclusion, la daurade a été soumis à la concentration sous-léthale de ammoniaque (1,48 mg UIA-N/l), après 5 mois d'alimentation avec les régimes expérimentaux (0, 10, 25 ou 50 mg AA/kg). Le défi d'ammoniaque a duré pendant 4 jours et les poissons étaient soumis a jeune pendant 24h avant le défi.

Les expériences faites dans cette étude ont montré cela:

- Le manque de supplémentation diététique de AA n'a pas sensiblement changée la croissance de la daurade, ni mené au développement des symptômes de carence, même après 5 mois de croissance, excepte quand le parasite *Diplectanum aequans* était présent.
- Le manque de supplémentation de l'aliment en AA a diminué la résistance de la daurade à la présence du parasite *Diplectanum aequans*.
- 10 mg AA/kg était suffisant pour permettre la croissance maximal de la daurade et pour empêcher le début du scorbut.
- Le stress hypoxique aigu, intermittent ou chronique n'ont pas modifié la croissance ni le contenu de AA du foie, du rein ou de la rate.
- L'hypoxie intermittente n'a pas augmenté la susceptibilité de la daurade au parasite *Diplectanum aequans*.
- L'exposition au niveau sous-léthale de l'ammoniaque a augmenté la concentration de AA dans le foie, le rein et la rate de la daurade.

En conclusion, l'acide ascorbique semble augmenter la résistance seulement à quelques facteurs de stress. Ces facteurs de stress sont ceux qui augmentent l'utilisation de AA, telle que des polluants et la température accrue, d'entre autres.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. AS VITAMINAS	3
1.2.1. Definição de vitamina	3
1.2.2. Classificação das vitaminas	5
1.2.3. Biodisponibilidade	6
1.2.4. Deficiência vitamínica	6
1.2.5. Requisitos vitamínicos	7
1.2.6. Ingestão Recomendada	9
1.2.7. Quasi-vitaminas	11
1.3. A VITAMINA C	12
1.3.1. História	12
1.3.2. Estrutura e propriedades físico-químicas	12
1.3.3. Evolução e capacidade de biossíntese	13
1.3.4. Absorção, transporte e absorção celular	17
1.3.5. Distribuição nos tecidos	18
1.3.6. Funções metabólicas	20
1.4. STRESS	28
1.4.1. Definição do termo stress	28
1.4.2. Respostas fisiológicas ao stress	32
1.5. VITAMINA C E STRESS NOS PEIXES	37
2. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS	39
2.1. FACTORES DE STRESS	39
2.2. DIETAS EXPERIMENTAIS	40
2.3. ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA	41
2.4. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	42
2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	43
2.5.1. Métodos de determinação da composição corporal e dos alimentos	43
2.5.2. Análises plasmáticas	44
2.5.3. Teor em ácido ascórbico nos tecidos	44
2.5.4. Teor em hidroxiprolina na pele	45
2.5.5. Concentração de azoto amoniacal total na água do mar	45
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	46

3. INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE ALIMENTOS COMPOSTOS COM ÁCIDO ASCÓRBICO NO CRESCIMENTO E RESPOSTA A HIPÓXIA AGUDA EM DOURADA, <i>Sparus aurata</i>	47
3.1. INTRODUÇÃO	47
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.3. RESULTADOS	51
3.4. DISCUSSÃO	56
4. EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO ALIMENTAR E DO STRESS DE HIPÓXIA INTERMITENTE NO CRESCIMENTO E NAS RESERVAS DE VITAMINA C DA DOURADA	63
4.1. INTRODUÇÃO	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
4.3. RESULTADOS	67
4.4. DISCUSSÃO	73
5. EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO ALIMENTAR E DO STRESS DE HIPÓXIA CRÔNICA NO CRESCIMENTO E NAS RESERVAS DE VITAMINA C DA DOURADA	79
5.1. INTRODUÇÃO	79
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	80
5.3. RESULTADOS	83
5.4. DISCUSSÃO	88
6. RESISTÊNCIA DA DOURADA ALIMENTADA COM DIFERENTES NÍVEIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO A UMA CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE AMÔNIA. EFEITO SOBRE O ESTATUTO VITAMÍNICO.	93
6.1. INTRODUÇÃO	93
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	94
6.3. RESULTADOS	96
6.4. DISCUSSÃO	99
7. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	105
7.1. DISCUSSÃO GERAL	105
7.1.1. Crescimento e requisitos de AA	106
7.1.2. Ácido ascórbico e stress	110
7.2. CONCLUSÕES	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
9. ANEXOS	137

ABREVIATURAS

AA, Ácido ascórbico

ADA, Ácido desidroascórbico

ACTH, Corticotropina

ANOVA, Análise de variância

CAV, Consumo alimentar voluntário

CEP, Coeficiente de eficácia proteica

CRF, Factor libertador de corticotropina

ENC, Necrose eritrocitrica

eq., equivalente

GABA, Ácido γ -amino butírico

GLO, L-gulonolactona oxidase

HDL, lipoproteínas de alta densidade

ICA, Índice de conversão alimentar

ICD, Índice de crescimento diário

IHS, Índice hepatossomático

LC50, Concentração letal para 50% da população exposta

LTD50, Tempo necessário para a morte de 50% da população exposta

MS, Matéria seca

NRC, "National research council"

OD, Oxigénio dissolvido

PMF, Peso médio final

PMI, Peso médio inicial

RDA, "Recommended daily/dietary amount"

RDI, "Recommended daily/dietary intake"

RNI, "Recommended nutrient intake"

SNC, Sistema nervoso central

TAN, Azoto amoniacal total

TEC, Taxa de crescimento específico

UIA-N, Azoto amoniacal não-ionizado

ESPÉCIES CITADAS

Carpa comum, *Cyprinus carpio*
Dourada, *Sparus aurata*
Enguia japonesa, *Anguilla japonica*
Esturjão, *Acipenser transmontanus*
Lampreia marinha, *Petromyzon marinus*
Linguado, *Solea solea*
Linguado japonês, *Paraclichthys olivaceus*
Mugem, *Mugil cephalus*
Peixe-espinho, *Terapon jarbua*
Peixe-gato, *Ictalurus punctatus*
Peixe-gato de água-doce, *Heteropneustes fossilis*
Peixe-papagaio Japonês, *Oplegnathus fasciatus*
Peixe-papagaio pintalgado, *Oplegnathus punctatus*
Red sea Bream, *Pagrus major*
Robalo, *Dicentrarchus labrax*
Robalo *Lates calcarifer*
Rodovalho, *Scophthalmus maximus*
Salmão Atlântico *Salmo salar*
Salmão chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*
Salmão chum, *Oncorhynchus keta*
Salmão coho, *Oncorhynchus kisutch*
Salmão sockey, *Oncorhynchus nerka*
Serióla, *Seriola quinqueradiata*
Tambaqui, *Colossoma macropomum*
Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*
Tilápia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*
Tilápia *Oreochromis spirulus*
Truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*
Truta do lago Americana, *Salvelinus namaycush*
Aeromonas salmonicida
Anachanthorus penilabiatus
Catla catla
Cirrhina mrigala
Channa punctatus
Cryptobia salmositica
Diplectanum aequans
Edwardsiella tarda
Edwardsiella ictaluri
Fundulus heteroclitus
Ichthyophonus hoferi
Ichthyophthirius multifiliis
Labio rohita
Labeo calbasu
Nemacheilus sinuatus
Piaractus mesopotamicus
Plecoglossus altivelis
Vibrio anguillarum

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) parece ser um componente de presença constante em todos os organismos vivos, indicando que este nutriente tem um papel importante no metabolismo. Nos vertebrados, o ácido ascórbico encontra-se presente em todos os tecidos, dependendo a sua concentração da espécie e do tecido em causa. As funções metabólicas desta vitamina têm sido profusamente estudadas nos mamíferos, tendo sido demonstrada a sua essencialidade para a normal formação de colagénio, o seu envolvimento no metabolismo do colesterol, na função dos granulócitos, na resistência ao stress, na absorção de sais minerais, na síntese das catecolaminas e o seu envolvimento em alguns mecanismos de desintoxicação (Thomas, 1984).

No caso específico dos peixes, as funções metabólicas desta vitamina não têm sido tão profundamente estudadas. No entanto, alguns dos seus papéis foram já elucidados, tais como o seu papel na biossíntese do colagénio (Halver *et al.*, 1975), o seu envolvimento na absorção de minerais e a sua interacção com pesticidas e metais pesados (provavelmente actuando como adjuvante dos mecanismos de desintoxicação), o seu envolvimento na vitelogénese e embriogénese (Carragher *et al.*, 1990; Masumoto *et al.*, 1991), na síntese de catecolaminas e na prevenção da peroxidação dos lípidos nos tecidos animais. Quando alimentados com dietas deficientes em ácido ascórbico, os peixes desenvolvem sintomas de deficiência (escorbuto), os quais incluem lordose, escoliose, paralisia dos músculos dos segmentos do tronco, distorção da cartilagem de suporte, hiperplasia do tecido branquial, desaceleração dos processos de cicatrização, redução do crescimento, aumento da actividade das HDL (lipoproteínas de alta densidade) plasmáticas e diminuição do conteúdo em hemoglobina (Akand *et al.*, 1987; Halver, *et al.*, 1975; Sato *et al.*, 1978).

Presentemente, um dos campos de investigação que se encontra em franca expansão, em termos do papel das vitaminas em nutrição de peixes, é a relação entre a ingestão de certas vitaminas e a resistência a factores de stress e a doenças, factores estes de importância vital em situação de cultura. Operações de manejo em aquacultura tais como manipulação, aplicação de tratamentos profilácticos e terapêuticos, transporte, calibragem, confinamento são stressantes para os peixes (Donaldson, 1981; Barton *et al.*, 1991; Sandnes, 1991) e estão muitas vezes associados com o aumento da susceptibilidade a doenças, bem como a uma redução da capacidade de manter a homeostasia interna e de resistir a factores de stress adicionais (Wedemeyer & McLeay, 1981; Robertson *et al.*, 1987). Estudos efectuados até ao presente parecem indicar a existência de uma relação entre stress e o metabolismo do ácido ascórbico, incluindo um aumento de resistência a doenças e da eficácia do sistema imunitário (Hardie *et al.*, 1991; Navarre *et al.*, 1989), protecção em casos de exposição a substâncias poluentes (Agrawal *et al.*, 1978) e resistência a situações de hipóxia (Ishibashi *et al.*, 1992a; Ishibashi *et al.*, 1992b). No entanto, esta relação ainda não é clara e os resultados são contraditórios.

Actualmente, a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) são espécies que, devido à sua cada vez maior procura e rapidez de crescimento em condições de cultura, têm ganho importância económica na aquacultura europeia, na qual Portugal se integra. Desta feita, é premente a realização de extensivos estudos de fisiologia e nutrição, por forma a permitir que os problemas criados pela situação de cultura possam ser ultrapassados, melhorando a eficiência da produção e, ao mesmo tempo, melhorar a qualidade do peixe produzido.

O objectivo deste estudo foi a determinação da existência de uma relação entre o consumo quantitativo de vitamina C e a resistência a factores de stress existentes em condições de aquacultura em dourada. Para tal, foi observado o efeito do stress sobre as reservas de AA de órgãos alvo, bem como o seu efeito sobre o crescimento. A variação da intensidade e tempo de exposição a um mesmo factor de stress foi a linha seguida, dado que qualquer alteração destes parâmetros poderia resultar em níveis diferentes de utilização do AA.

1.2. AS VITAMINAS

1.2.1. DEFINIÇÃO DE VITAMINA

As vitaminas são um grupo heterogêneo de substâncias. Ao contrário de outros nutrientes, as vitaminas não têm funções estruturais nem fornecem energia em quantidade significativa. A sua utilidade é muito específica, pelo que são necessárias em pequenas quantidades na dieta.

Apesar de possuírem características comuns, que as agrupam no mesmo grupo de nutrientes, as vitaminas têm pouco em comum entre si do ponto de vista químico e da sua funcionalidade metabólica. Algumas vitaminas têm funções como co-factores enzimáticos, outras agem como antioxidantes biológicos, outras ainda têm funções como co-factores das reacções metabólicas de oxidação-redução, algumas funcionam como hormonas e uma actua como co-factor de fotorrecepção na função visual.

Por forma a definir de uma forma clara o que é uma vitamina, Combs (1998) descreve as suas características comuns:

- é um composto orgânico distinto dos lípidos, hidratos de carbono e proteínas;
- é um componente natural dos alimentos, nos quais estão geralmente presentes em pequeníssimas quantidades;
- é essencial, embora em quantidades diminutas, para o metabolismo normal (i.e., manutenção, crescimento, desenvolvimento e/ou reprodução);
- a sua ausência ou subutilização causa um síndrome específico de deficiência;

- não é sintetizada pelo organismo em quantidades adequadas para cobrir as necessidades fisiológicas normais.

Um total de 13 grupos de substâncias são actualmente classificadas como vitaminas. Como a Tabela 1.1 indica, o nome comum de algumas vitaminas é, na realidade, uma descrição genérica de uma família de compostos que possuem uma actividade metabólica qualitativamente comparáveis. As substâncias que possuem a mesma actividade vitamínica são designados por vitámeros (origem anglo-saxónica) ou por compostos de acção vitamínica (Gouillou-Coustans *et al.*, 1999). Para além destes, há ainda substâncias que, após serem metabolizadas no organismo, produzem uma forma activa de acção vitamínica. Tal precursor designa-se por pró-vitamina. Exemplos de pró-vitaminas são alguns carotenoides, precursores da vitamina A

Tabela 1.1. As vitaminas. (Adaptado de Combs, 1998 e Gouillou-Coustans & Guillaume, 1999).

Vitamina	vitámeros	Pró-vitaminas	Funções metabólicas
A	Retinol	β -caroteno	Pigmentos visuais
	Retinal	Criptoxantina	Diferenciação das células epiteliais
	Ácido retinoico		Pró-hormona
	Palmitato ou acetato de retinil*		
D	Colecalciferol (D3)		Homeostasia do cálcio
	Ergocalciferol (D2)		Metabolismo ósseo Pró-hormona
E	α -Tocoferol		Antioxidante membranar
	γ -Tocoferol		
	Acetato de α -Tocoferol*		
K	Filoquinonas (K1)		Coagulação sanguínea
	Menaquinonas (K2)		Metabolismo do cálcio
	Menadiona (K3)*		
B1	Tiamina		Co-enzima para a descarboxilação dos ácidos 2-ceto (ex. piruvato) e transcetolações
	Cloridrato de tiamina*		
B ₂	Riboflavina		Co-enzima nas reacções redox dos ácidos gordos e do ciclo do TCA
Niacina (PP)	Ácido nicotínico		Co-enzimas de diversas desidrogenases
	Nicotinamida		

Ácido Pantoténico (B ₅)	Ácido pantoténico Pantotenato de cálcio*	Co-enzima no metabolismo dos ácidos gordos
Piridoxina (B ₆)	Piridoxol Piridoxal Piridoxamina Cloridrato de piridoxina*	Co-enzima no metabolismo dos aminoácidos
Biotina (B ₈)	Biotina	Co-enzima para as carboxilações
Ácido Fólico (B ₉)	Ácido fólico Poliglutamatos	Co-enzima no metabolismo das unidades C1
B ₁₂	Cobalaminas	Co-enzima no metabolismo do propionato, dos aminoácidos e das unidades C1
Ácido Ascórbico (C)	Ácido ascórbico Ácido desidroascórbico Fosfato de ascorbil*	Redutores nas hidroxilações do metabolismo do colagénio e carnitina e no metabolismo das drogas e esteróides

* Vitámero de síntese.

1.2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS VITAMINAS

As vitaminas são frequentemente descritas de acordo com a sua solubilidade. Deste modo, elas são em geral classificadas em dois grupos: as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (complexo B, niacina e vitamina C). As vitaminas hidrossolúveis tendem a possuir 1 ou mais grupos polares ou ionizáveis (carboxil, ceto, hidroxil, amino ou fosfato), enquanto as lipossolúveis têm características predominantemente aromáticas ou alifáticas (Combs, 1998). As vitaminas lipossolúveis são absorvidas no intestino conjuntamente com os lípidos alimentares, pelo que a existência de condições favoráveis à absorção de lípidos afecta positivamente a absorção destas vitaminas. Quando a sua ingestão supera a sua necessidade, estas são armazenadas pelo organismo, pelo que há a possibilidade da sua acumulação excessiva nos tecidos, o que produz toxicidade (hipervitaminose) (NRC, 1993). As vitaminas hidrossolúveis, por seu lado, não são armazenadas em tão grande quantidade pelo organismo, sendo o seu excesso excretado através da urina. A absorção de pelo menos 3 das vitaminas hidrossolúveis (Vitamina C, riboflavina e vitamina B₆) parece ser regulada, em parte, pela concentração fornecida pela

alimentação, num mecanismo de “feedback”, questionando-se, desta forma, a utilização de mega-doses destas vitaminas, já que tais concentrações podem antagonizar a sua absorção (Combs, 1998).

1.2.3. BIODISPONIBILIDADE

Dado que as vitaminas contidas nos alimentos não são completamente utilizadas pelo organismo, a quantificação do teor bruto em vitaminas dos alimentos é insuficiente para compreender o valor nutricional real dessas fontes vitamínicas. A taxa real e a extensão da absorção e utilização de uma vitamina ao nível celular denomina-se **biodisponibilidade**. Esta depende de vários factores: diferenças de biopotência; perdas por armazenamento e/ou processamento; efeito alimentares, dado que a composição alimentar pode afectar a absorção de algumas vitaminas; efeitos fisiológicos, como a diminuição da função gastrointestinal no idoso; e o estado geral de saúde, já que algumas doenças podem afectar a absorção e a utilização de certas vitaminas (Combs, 1998).

1.2.4. DEFICIÊNCIA VITAMÍNICA

A **deficiência vitamínica** refere-se à condição de **hipovitaminose**, a qual conduz a manifestações clínicas típicas resultantes de perturbações bioquímicas induzidas pela ausência de quantidades suficientes de determinada vitamina. Os sinais clínicos de deficiência são o resultado de uma cadeia de eventos que se inicia com a diminuição da forma activa da vitamina ao nível celular e tecidual. Assim, podem ser observados 4 estádios de deficiência vitamínica, os quais variam em severidade e nas suas manifestações:

Estádio de depleção das reservas ao nível dos órgãos: É o estágio menos severo de deficiência. Não existem alterações clínicas nem metabólicas, mas as enzimas podem estar menos saturadas com as suas co-enzimas do que o normal. As concentrações plasmáticas da

vitamina e dos seus metabolitos podem ser inferiores ao normal e a excreção urinária pode ser muito baixa.

Estádio de deficiência metabólica: É um estágio ainda menos severo de deficiência. Não envolve lesões anatómicas ou funcionais visíveis, embora haja alterações bioquímicas ou metabólicas que não impedem, aparentemente, a capacidade metabólica normal

Estádio de deficiência encoberta: Um baixo consumo da vitamina é, aparentemente, adequado para satisfazer os requisitos, até algum tipo de stress revelar o perigoso estado das reservas corporais.

Estádio severo de deficiência: Aparecem os sinais e sintomas clínicos de deficiência. A prevenção destes fornece um critério mínimo para a determinação dos requisitos (Bender, 1992).

Os sinais e sintomas clínicos de deficiência vitamínica nos peixes são apresentados a título informativo em anexo.

1.2.5. REQUISITOS VITAMÍNICOS

O requisito de um nutriente descreve a quantidade desse nutriente que satisfaz certos critérios, relacionados com a actividade metabólica desse nutriente ou com a sua função fisiológica geral. Deste modo, para determinar o requisito de uma vitamina é necessário definir primeiro o propósito para o qual se pretende determinar esse requisito e, só então, determinar a ingestão necessária para satisfazer esse propósito. Normalmente são utilizados como critérios de adequação os estádios de deficiência vitamínica referidos acima.

Para que a estimativa dos requisitos seja relevante, esta tem de ser baseada em respostas de importância fisiológica óbvia. Esta quantificação faz-se, em geral, com a ajuda de curvas dose-resposta. Para tal faz-se um estudo experimental no qual os indivíduos experimentais são alimentados com uma dieta base deficiente no nutriente em estudo, mas equilibrada no que respeita aos demais nutrientes, sendo esta suplementada com quantidades conhecidas do nutriente em estudo. A resposta fisiológica escolhida para avaliar os efeitos individuais aos diferentes níveis de suplementação desse nutriente, depende da acção específica desse nutriente no organismo, sendo utilizadas, por exemplo, respostas como o crescimento, a concentração desse nutriente em órgãos específicos e a actividade de determinadas reacções metabólicas dependentes desse nutriente. A curva dose-resposta difere para um mesmo nutriente, em função da resposta escolhida como medida (Fig. 1.1).

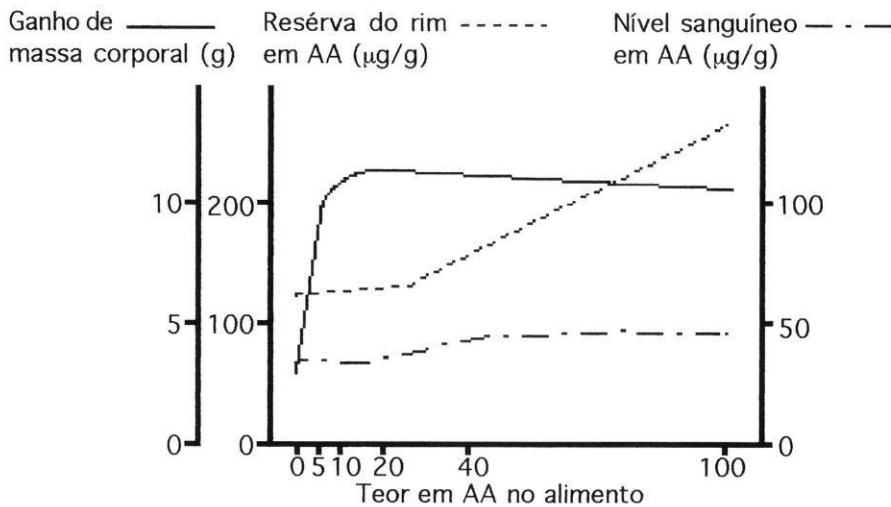


Fig.1.1. Curvas dose-resposta obtidas para o ácido ascórbico na truta arco-íris indicando a discordância entre os critérios escolhidos (obtido através dos dados de Halver, 1972 por Gouillou-Coustans & Guillaume, 1999)

A resposta dos indivíduos, com as reservas de determinado nutriente esgotadas, à ingestão desse mesmo nutriente parece ser curvilínea (Fig. 1.2); no entanto, na maior parte dos estudos de determinação dos requisitos nutricionais tanto os modelos curvilíneos como os rectilíneos parecem ser adequados (Combs, 1998)

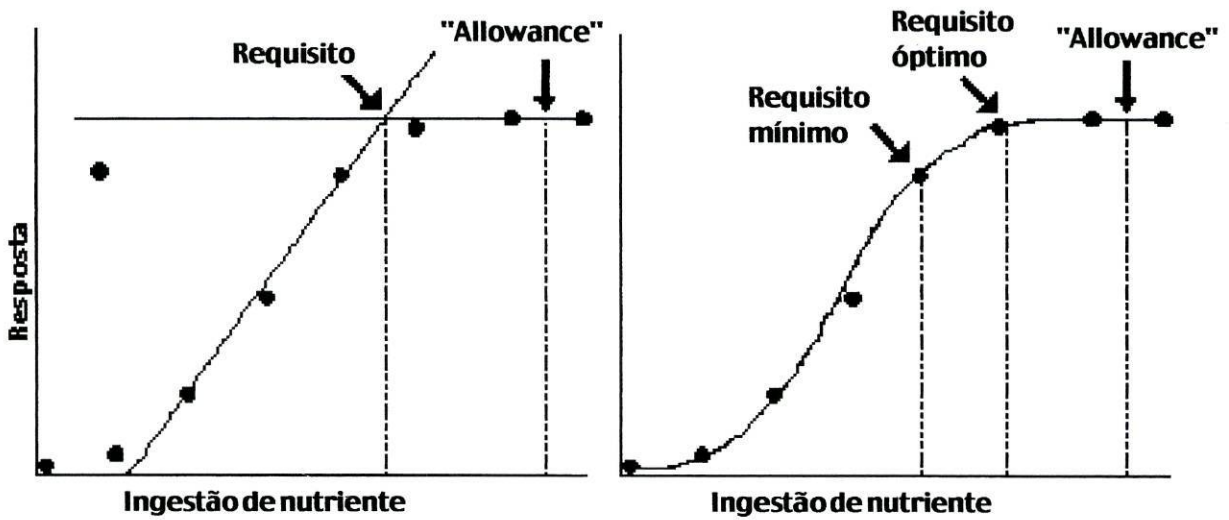


Fig. 1.2. Requisitos e "allowances" são determinados a partir de respostas fisiológicas significativas em relação ao nível de ingestão do nutriente (Combs, 1998).

Os requisitos vitamínicos podem ser afetados por diversos factores, tais como a variação individual, crescimento, gravidez/produção de gâmetas, doenças, cirurgias, poluição e outras. Para a maior parte dos nutrientes, os requisitos individuais de uma dada população parecem ter uma distribuição normal. No caso das vitaminas pode-se assumir o mesmo modelo de distribuição.

1.2.6. INGESTÃO RECOMENDADA

Os requisitos vitamínicos, dada a sua grande variação, têm pouca utilidade prática. Os níveis de ingestão recomendados são mais úteis, uma vez que são calculados para cobrir as necessidades das populações. Os níveis de ingestão recomendados excedem o requisito médio estimado para a população numa quantidade referida como margem de segurança. Estes níveis são calculados estatisticamente a partir de estudos de determinação de requisitos. Tal como foi referido acima, os requisitos vitamínicos individuais seguem uma distribuição normal. Desta forma, sabe-se que 95% da população tem um requisito de uma determinada vitamina dentro do intervalo da média do requisito ± 2 vezes o desvio padrão. Assim uma ingestão do valor

médio do requisito mais 2 vezes o desvio padrão será suficiente para cobrir os requisitos dessa vitamina de 97.5% dos indivíduos da população (Fig. 1.3).

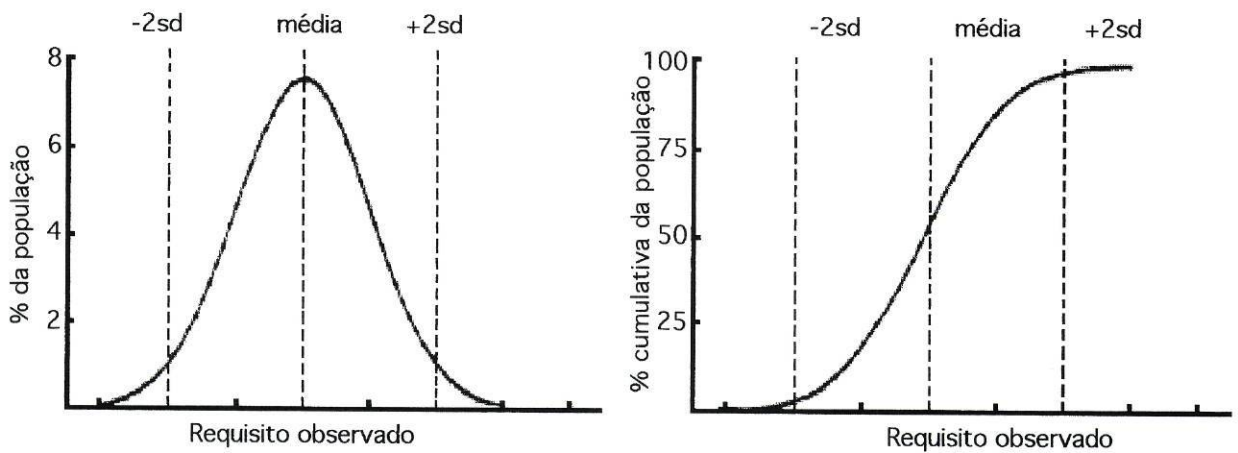


Fig.1.3. Distribuição dos requisitos de um nutriente e cálculo do seu nível ingestão recomendado. (sd-desvio padrão).

Os níveis de ingestão recomendados variam, tal como os requisitos, em função dos critérios de adequação utilizados. Nos humanos esta situação é mais clara, dada a existência de 3 níveis de ingestão recomendados de vitaminas apresentadas por diferentes organismos. Podem-se, assim encontrar os RDA (Recommended daily/dietary amount), publicado pelo “U. S. National Research Council”; os RDI (Recommended daily/dietary intake), estabelecidos pela FAO/WHO; e os RNI (Recommended nutrient intake), fornecidos pelo “Committee for the Revision of the Dietary Standard for Canada”. Todas estas recomendações tendem a ser semelhantes, mas não são idênticas, pois são baseadas em critérios diferentes. No entanto, todos estes índices têm a mesma base estatística e são todos definidos como uma quantidade de vitamina adequada para assegurar que os requisitos de todas as pessoas saudáveis são satisfeitos.

O “Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture - National Research Council”, um organismo Norte Americano, revê regularmente os estudos efectuados a nível de requisitos dos vários nutrientes em diversas espécies animais, compilando e analisando os resultados, produzindo assim Tabelas de recomendações. No que respeita aos peixes, têm sido feitos estudos por forma a calcular os seus requisitos e níveis de ingestão recomendados, tendo o organismo acima citado, editado uma publicação (NRC, 1993) com as recomendações para várias espécies

aquícolas. Em anexo encontra-se a Tabela com as recomendações vitamínicas sugeridas pelo (NRC, 1993).

1.2.7. QUASIVITAMINAS

Para além das 13 famílias de compostos já classificadas como vitaminas, existem outras substâncias com função vitamínica duvidosa para os humanos e que são designadas como quasivitaminas. Estas são a colina, o mio-inositol, o ácido *p* - aminobenzoico, os bioflavonóides, as ubiquinonas, o ácido lipóico, a carnitina e a pirroloquinolina quinona. No entanto, a colina e o mio-inositol parecem enquadrar-se na definição de vitamina, no que refere aos peixes.

Kitamura *et al.* (1967a) descreveu sintomas de deficiência em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada com um alimento deficiente em colina. Em Truta do lago Americana, *Salvelinus namaycush* (Ketola, 1976), na enguia japonesa, *Anguilla japonica*, (Arai *et al.*, 1972), na carpa comum, *Cyprinus carpio* (Ogino *et al.*, 1970), no peixe-gato, *Ictalurus punctatus* (Wilson & Poe, 1988) e no esturjão, *Acipenser transmontanus* (Hung, 1989) foram também descritos sintomas de deficiência em colina.

No que respeita ao mio-inositol, sabe-se que existe nas membranas biológicas sob a forma de fosfatidilinositol. Segundo Mathews & van Holde (1990) o fosfatidilinositol está envolvido na transdução de sinal de diversos processos metabólicos. Tal como no caso da colina, também a insuficiência de mio-inositol na alimentação de várias espécies de peixes provoca sintomas de deficiência. Entre as espécies para as quais foi demonstrado o síndrome de deficiência em mio-inositol contam-se a truta arco-íris (Kitamura *et al.*, 1967b); *Pagrus major* (Yone *et al.*, 1971); enguia Japonesa (Arai *et al.*, 1972); peixe-papagaio Japonês, *Oplegnathus fasciatus*, (Ikeda *et al.*, 1988); serióla, *Seriola quinqueradiata*, (Hosokawa, 1989); e carpa comum (Aoe & Masuda, 1967).

1.3. A VITAMINA C

1.3.1. HISTÓRIA

O ácido ascórbico só foi isolado em 1928, apesar do escorbuto, a doença desenvolvida pelos indivíduos com carência de vitamina C, existir há milhares de anos. Os primeiros escritos sobre a doença datam de cerca do ano de 1500 A. C., sendo descrita em 450 A. C. por Aristóteles como um síndrome caracterizado pela falta de energia, inflamação das gengivas, perda dos dentes, e problemas hemorrágicos. No séc. XVIII uma grande percentagem dos marinheiros morria de escorbuto, até que, em 1747, James Lind efectuou uma experiência humana com indivíduos afectados pelo escorbuto e descobriu que o sumo de limão e laranja era o tratamento mais eficaz para esta doença. Alguns anos mais tarde, os marinheiros passaram a consumir sumo de limão ou lima para evitarem o desenvolvimento do escorbuto, tendo-se assistido a uma diminuição drástica do número de casos.

No início deste século fizeram-se as primeiras tentativas de estudo do escorbuto em animais de experiência, nomeadamente com o porquinho-da-índia, por Bolle em 1903, Bartenstein em 1905 e Holst e F röllich em 1907 e 1912 (Chick, 1975). O ácido ascórbico foi isolado a partir da couve, sumo de limão e glândulas adrenais em 1928 por Szent-György, sendo identificado como o factor anti-escorbútico no mesmo ano por Waugh e King. Já em 1933, Haworth e colegas estabeleceram a sua estrutura e nesse mesmo ano, Haworth em Birmingham e Reichstein na Suíça conseguiram sintetizar esta vitamina (Bender, 1992).

1.3.2. ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Vitamina C é o descritor genérico para todos os compostos que exibem qualitativamente a actividade biológica do ácido ascórbico. Este último é o nome comum do composto 2,3-didehidro-L-treo-hexano-1,4-lactona, anteriormente designado por ácido hexurónico. O ácido L-

ascórbico tem 3 isómeros: o ácido D-ascórbico, o ácido L-isoascórbico e o ácido D-isoascórbico, que possuem actividade vitamínica de 0 a 5% da actividade do ácido L-ascórbico. O AA pode ser oxidado transformando-se em ácido desidroascórbico (ADA), passando por uma fase de radical livre, o ácido monodesidroascórbico (ou semidesidroascórbico), possuindo ambos actividade vitamínica, pelo que são vitámeros de vitamina C (Fig. 1.4). Estas 3 formas de vitamina C formam um sistema redox reversível, já que são interconvertíveis.

$C_6H_8O_6$ (PM=176.1)

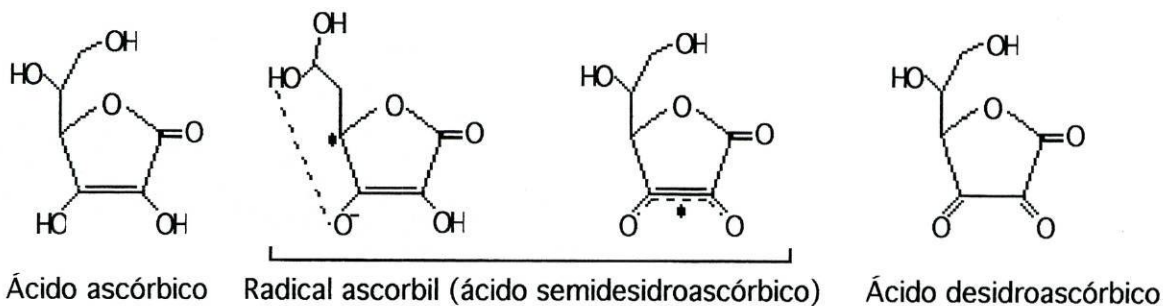


Fig.1.4. Fórmula bruta e estrutura química dos vitámeros da vitamina C.

Na presença de oxigénio, em condições alcalinas ou na presença de iões de metais pesados, o ADA é instável e sofre oxidação formando-se o ácido 2,3-dioxo-L-gulonico, o qual não tem actividade biológica.

1.3.3. EVOLUÇÃO E CAPACIDADE DE BIOSÍNTESE

Apenas alguns animais são incapazes de sintetizar AA, nomeadamente o Homem, os outros primatas, o cobaio, os mamíferos voadores, algumas espécies altamente evoluídas de pássaros, a maior parte dos peixes, os invertebrados e os insectos (Chatterjee, 1978; Chatterjee *et al.*, 1975). Para estes animais, as suas necessidades de AA têm de ser colmatadas pela sua ingestão na alimentação, pelo que para estes o AA é uma vitamina.

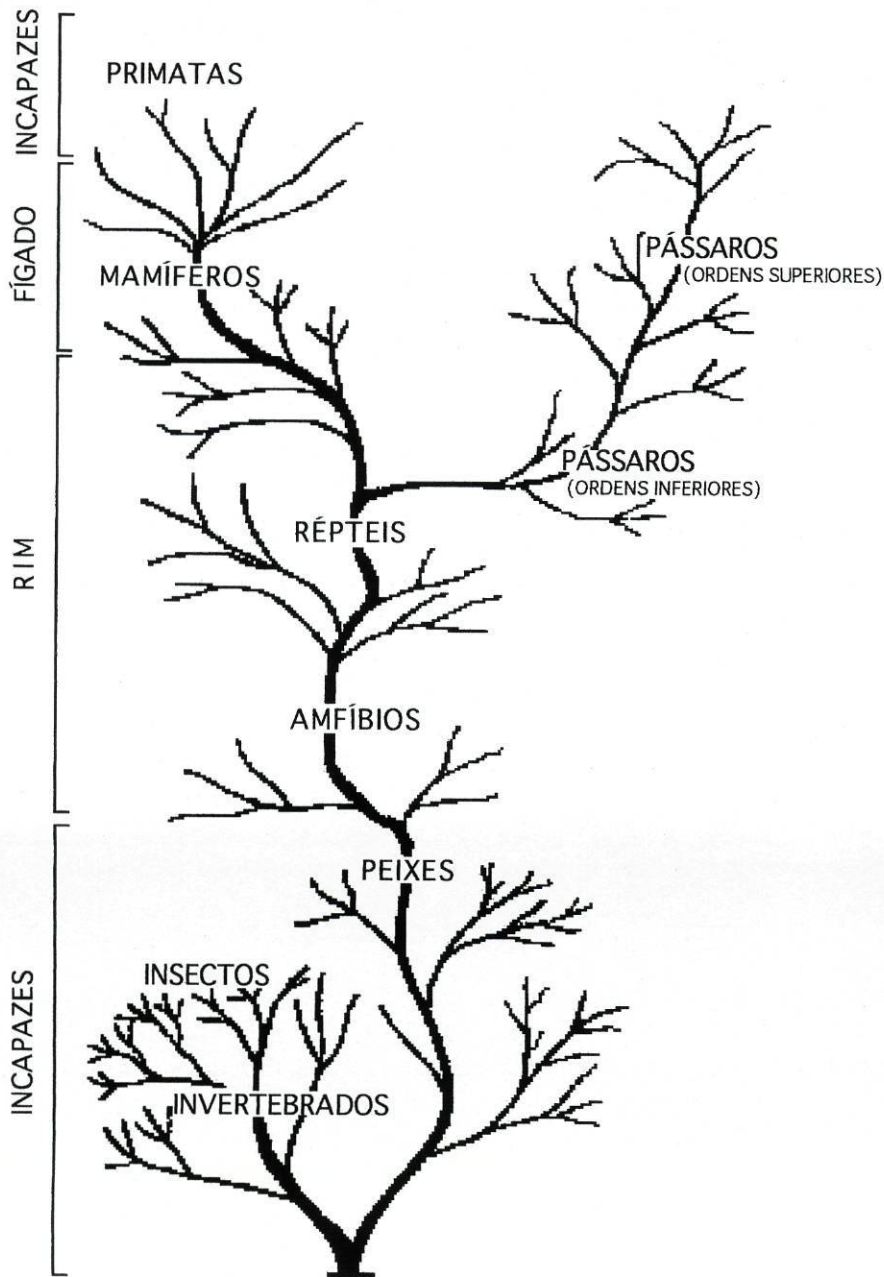


Fig. 1.5. Evolução da capacidade biossintética do AA de várias espécies de animais em relação à sua filogenia (Chatterjee, 1973).

Tal como se pode observar na Fig. 1.5, Chatterjee (1973) sugere que a biossíntese do AA se iniciou no rim dos anfíbios, manteve-se no mesmo órgão dos répteis e dos pássaros das ordens inferiores e passou para o fígado dos mamíferos, acabando por desaparecer nos primatas e algumas outras espécies de mamíferos já referidas. O mesmo autor (Chatterjee, 1978) sugere que a emergência da capacidade de biossíntese de AA nos anfíbios poderá ter a ver com um

aumento dos requisitos de AA devido à evolução dos vertebrados do meio aquático para o meio terrestre, já que esta transição envolveu a sujeição dos indivíduos a factores de stress.

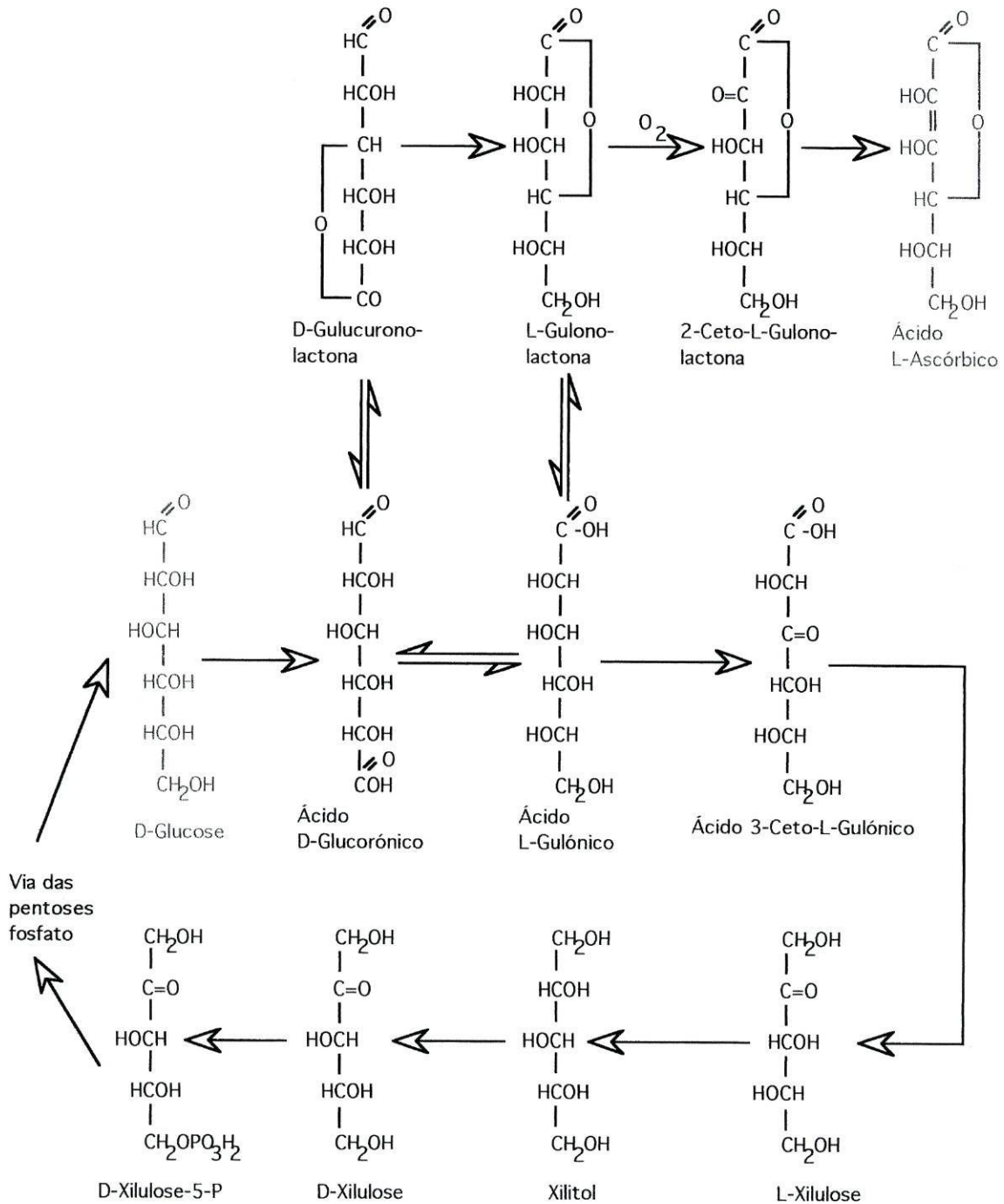


Fig. 1.6. Biossíntese do ácido ascórbico, nos animais, a partir da glucose, através da via do ácido glucorónico (Burns, 1960 em: Chatterjee, 1978).

A incapacidade de sintetizar AA dos pássaros superiores e de alguns mamíferos é devida à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase (GLO), que catalisa o passo terminal da conversão da glucose em AA. Nestas espécies o ácido gulónico é reduzido e descarboxilado directamente

formando xilulose (Fig. 1.6). A ausência desta enzima chave parece dever-se à falta de expressão do seu gene codificador (Sato *et al.*, 1976; Sato & Udenfriend, 1978).

No caso específico dos peixes, os resultados divergem em função da espécie. Vários autores investigaram a capacidade de biossíntese de AA em diversas espécies de peixes, tendo encontrado uma diversidade de resultados (Dabrowski, 1994; Krasnov *et al.*, 1998; Mæland *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1996; Soliman *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1985; Touhata *et al.*, 1995; Wilson, 1973; Yamamoto *et al.*, 1978), os quais se encontram sumarizados em anexo. Os diversos trabalhos mostram que existem espécies capazes de sintetizar AA em quantidade suficiente para satisfazer os seus requisitos, outras possuem apenas uma capacidade limitada de sintetizar AA, dependendo parcialmente do fornecimento alimentar, e outras ainda parecem ser completamente incapazes de sintetizar este composto, dependendo totalmente da ingestão alimentar. Mais ainda, nos peixes capazes de sintetizar AA, a actividade biossintética existe no rim e/ou fígado, dependendo da espécie, facto que contraria a teoria da emergência da síntese de AA no rim. Moreau & Dabrowski, 1998 sugerem que os ancestrais dos vertebrados actuais não possuíam predisposição para o escorbuto e que a perda da actividade da GLO se deu subsequentemente em vários momentos da filogenia dos vertebrados (Fig. 1.7), o que contraria as teorias de Chatterjee (Chatterjee, 1973; Chatterjee, 1978). No trabalho referido, os autores demonstraram a existência de actividade da GLO na lampreia marinha, *Petromyzon marinus*, na fracção microsomal do rim. Krasnov *et al.* (1998) forneceram maior suporte a esta hipótese ao demonstrarem que o rim e o fígado da truta arco-íris (que os mesmos autores demonstraram não possuírem actividade de GLO) eram capazes de converter o ácido L-glucurónico em AA quando uma fonte exógena de GLO era adicionada, o que leva a supor, como os próprios autores descrevem, que nos peixes incapazes de sintetizar AA possuem todas as enzimas para a sua síntese, excepto a GLO.

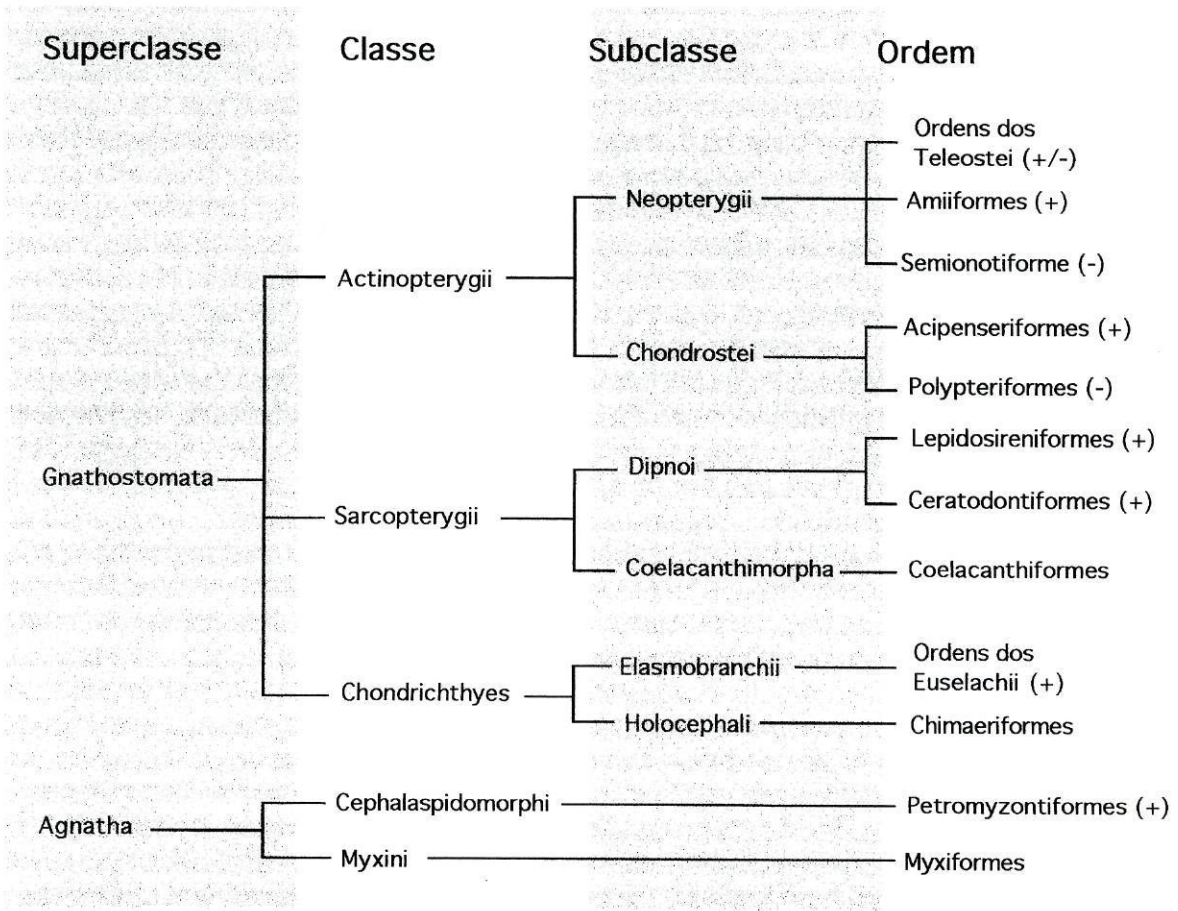


Fig. 1.7. Hierarquia dos peixes actuais. O símbolo + significa a existência de pelo menos 1 espécie de uma dada ordem com capacidade de biossíntese de AA *de novo* devido à presença de GLO. O símbolo - denota a incapacidade de biossíntese de AA como resultado da perda de actividade enzimática (Moreau & Dabrowski, 1998).

1.3.4. ABSORÇÃO, TRANSPORTE E ABSORÇÃO CELULAR

As espécies incapazes de sintetizar AA absorvem este composto no intestino através de um mecanismo saturável de transporte activo dependente de um transportador, o Na^+ , o qual é inibido pelo ácido acetilsalicílico. o ADA, por seu lado, parece ser absorvido através de um mecanismo diferente, sendo depois reduzido a ascorbato pela enzima ácido desidroascórbico redutase. Estes mecanismos de absorção de vitamina C parecem ser muito importantes quando são ingeridas pequenas doses desta vitamina. No entanto, quando são ingeridas doses elevadas de Vitamina C, esta parece ser igualmente absorvida por transporte passivo através da mucosa intestinal. No caso das espécies capazes de biossintetizar AA a absorção desta vitamina é feita

exclusivamente por transporte passivo. É de salientar, no entanto, que a eficiência de absorção da vitamina C diminui com o aumento da ingestão desta. Assim, e no caso dos humanos, para doses de vitamina C até 100 mg/dia são absorvidos 80-95%, para doses de 1.5 g/dia cerca de 50%, apenas 25% para doses de 6 g/dia e 16g para doses de 12 g/dia (Rivers, 1987).

A vitamina C é transportada no plasma principalmente sob a forma de AA, sendo o ADA apenas cerca de 5%. Ambas as formas circulam quer livres em solução, quer ligadas à albumina. A absorção celular do AA e do ADA é efectuada utilizando mecanismos diferentes. O AA é transportado activamente para o interior das células através de um transportador dependente de Na^+ e de energia, enquanto o ADA é transportado através de vários transportadores dependentes de glucose.

Na maior parte dos tecidos o AA é a forma preferida para a absorção de vitamina C a partir do plasma, mas para os eritrócitos e leucócitos o ADA é forma preferida. O ADA é reduzido a AA nos eritrócitos por uma ADA redutase dependente da glutathione, enquanto nos leucócitos esta redução é NADPH-dependente (Hornig, 1975; Stankova *et al.*, 1975)

1.3.5. DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS

A vitamina C concentra-se em muitos órgãos vitais com metabolismo activo, bem como nas células sanguíneas, entre as quais se destacam os leucócitos mononucleares (Tabela 1.2). Um dos órgãos com maior concentração de vitamina C são as glândulas adrenais e, nestas, a vitamina C é rapidamente esgotada por diversas formas de stress (Levine & Morita, 1985).

Tabela 1.2. Concentração de AA em tecidos humanos (Hornig, 1975; Evans *et al.*, 1982).

Tecido	Ácido Ascórbico (mg/kg tecido)
Plasma	4-10
Músculo esquelético	30-40
Rim	50-150
Coração	50-150
Cérebro	30-150
Pulmões	70
Timo	100-150
Fígado	100-150
Pâncreas	100-150
Cristalino (olho)	250-310
Adrenais	300-400
Pituitária	400-500
	pmol/10 ⁶ células
Eritrócitos	3.9
Plaquetas	30
Granulócitos	530
Leucócitos mononucleados	1370

A Fig. 1.8 mostra um exemplo da distribuição da vitamina C nos peixes, neste caso específico trata-se da truta arco-íris. Nos peixes, a concentração desta vitamina nos órgãos depende da quantidade ingerida na alimentação (Al-Amoudi *et al.*, 1992; Dabrowski *et al.*, 1996a; Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998; Sandnes *et al.*, 1992; Sandnes *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1993). A bibliografia existente sobre a distribuição de AA nos tecidos de peixes é escassa e não permite tirar conclusões definitivas. No entanto, parecem existir diferenças entre espécies no que respeita à distribuição desta vitamina nos diferentes órgãos. Nos salmonídeos o cérebro parece ser um dos órgãos com maior concentração de AA, seguido pelo rim e pelo fígado (Dabrowski *et al.*, 1990; Hilton *et al.*, 1979a; Gabaudan & Verlhac, 1992). Em robalo Alexis *et al.* (1990) observou uma distribuição de AA nos tecidos similar à observada nos salmonídeos. Já nos ciprinídeos esta relação não é a mesma. Agrawal *et al.* (1980) estudaram a distribuição

do AA em diversos tecidos de 4 espécies de carpa de importância comercial (*Labeo rohita*, *Labeo calbasu*, *Cirrhina mrigala* e *Catla catla*) e mostrou que os níveis de AA era mais elevados no baço, seguido pelo rim anterior, gónadas, fígado, rim posterior, cérebro e/ou olho e sangue. Estas diferenças na distribuição do AA pelos tecidos dos peixes podem ser devidas ao tipo de alimentação das diferentes espécies bem como à sua capacidade de biossíntese, daí as diferenças encontradas entre as espécies carnívoras (salmonídeos e robalo) e as espécies herbívoras (ciprinídeos).

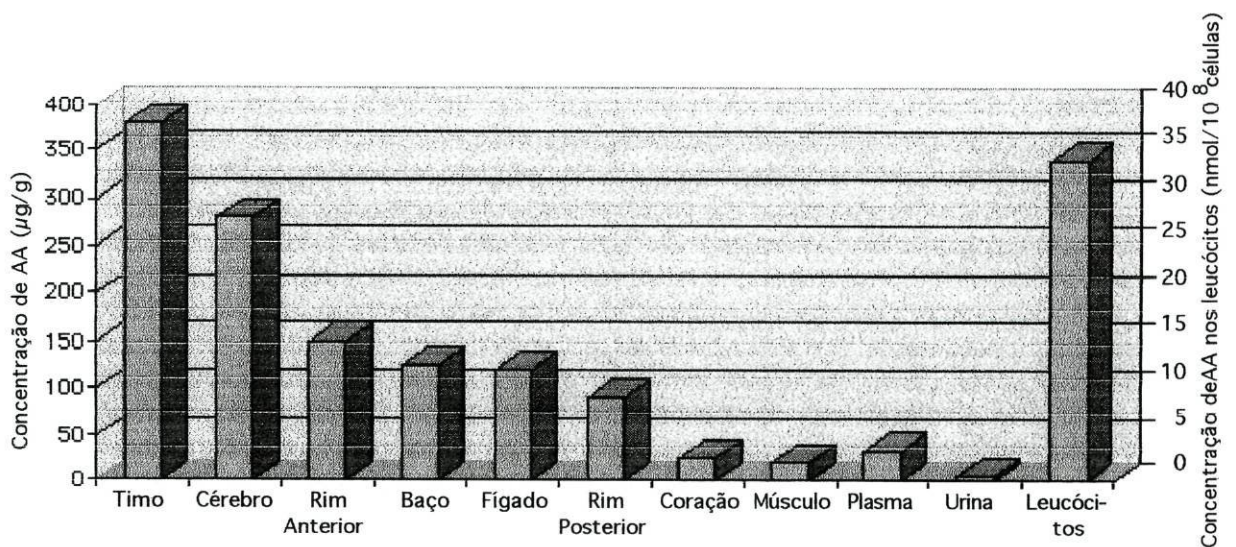


Fig. 1.8. Concentração de AA em vários tecidos de Truta arco-íris (Gabaudan & Verlhac, 1992).

1.3.6. FUNÇÕES METABÓLICAS

A vitamina C tem múltiplas funções no organismo tais como actuar como co-factor em diversas reacções enzimáticas e proteger as células contra a acção de radicais livres. A dupla AA - ADA apresenta propriedades de oxi-redução que permitem a transferência de 1 ou 2 electrões. Todas as funções da vitamina C parecem envolver directamente estas propriedades de oxidação-redução.

O AA pode actuar como um antioxidante devido à sua capacidade de reagir com radicais livres, sofrendo uma oxidação mono-electrónica e produzindo assim um intermediário pouco

reactivo, o radical ascorbil, que se transforma em AAe ADA. Desta forma, o AA pode reagir com as espécies tóxicas e reactivas de oxigénio, como o anião superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH). Estes radicais livres são inevitavelmente produzidos durante a produção aeróbia (dependente do O_2) de energia. Dada a sua grande reactividade, os radicais livres de oxigénio provocam graves danos celulares, pelo que a acção antioxidante do AA é essencial como meio de defesa celular contra a acção destrutiva destes radicais.

Uma das funções mais importantes do AA como antioxidante parece ser a sua capacidade de “poupar” a vitamina E (α -Tocoferol). O α -Tocoferol actua predominantemente como um antioxidante, sendo responsável por parar reacções em cadeia de radicais livres resultantes da oxidação de ácidos gordos poli-insaturados, formando o radical α -Tocoferoxil. Estudos *in vitro* com modelos de sistemas membranares sugerem que o AAe, em menor grau, a glutathione, podem regenerar o α -Tocoferol. Halpner *et al.* (1998) demonstraram, utilizando culturas de hepatócitos de rato, que o AA tinha a capacidade de proteger as células da perda de vitamina E por oxidação. Também em ratos, mas *in vivo*, Tanaka *et al.* (1997) evidenciaram o provável efeito “poupador” (sparing) de vitamina E do AA. Para tal usaram uma estirpe de ratos com deficiência de biossíntese de AA. Observaram, então, que os indivíduos sem suplementação de AA apresentavam uma menor concentração de vitamina E em diversos tecidos, quando comparados com os alimentados com suplemento de AA. Em salmão Atlântico Hamre *et al.* (1997) puseram em evidência a existência de uma interacção significativa, *in vivo*, entre as vitaminas C e E, aparentemente resultante de 2 mecanismos: um efeito sinérgico de protecção simultânea da fase aquosa e lipídica contra a oxidação e a regeneração da vitamina E a partir do radical tocoferoxil por parte da vitamina C.

A eficácia antioxidante do AA é maior para concentrações baixas da vitamina. Nestas condições, a reacção predominante é entre o AA e um radical peroxil para produzir hidroperóxido e radical ascorbil, reduzindo este último a um segundo radical peroxil produzindo ADA, a forma oxidada do AA. O balanço final da reacção é, nestas condições, a redução de 2 moles

de radicais peroxil por mol de AA consumida. No entanto, conforme a concentração de AA aumenta, o quociente molar da reacção diminui, devido a uma outra reacção, entre o AA e oxigénio moléculas (O_2), se tornar significativa. Nesta reacção é produzido ADA e anião superóxido, o qual pode reagir com o AA, produzindo o radical ascorbil. Pensa-se que, a concentrações elevadas de vitamina C, esta sequência de 2 reacções podem desenvolver-se num processo de autooxidação em cadeia, o qual consome AA desperdiçando, desta forma, a vitamina.

Na presença de iões metálicos oxidados, como o Fe^{3+} e o Cu^{2+} , o AA em concentração elevada pode ter um efeito pró-oxidante. Nestas condições o AA doa 1 electrão aos iões metálicos, os quais passam a poder reagir com o O_2 , originando radicais livres de oxigénio, os quais podem danificar os ácidos nucleicos, as proteínas e os ácidos gordos poli-insaturados.

O AA funciona como co-substrato para, pelo menos, 8 enzimas: 3 envolvidas na hidroxilação da lisina/prolina, 2 na biossíntese da carnitina, 2 na biossíntese de hormonas e 1 envolvida no metabolismo da tirosina.

Um dos principais papéis do AA é a sua participação na síntese do colagénio. O colagénio é uma molécula complexa sintetizada parcialmente pelos fibroblastos. Estas células sintetizam uma cadeia polipeptídica, o pró-colagénio. Para que este adquira a estrutura de tripla hélice, para poder ser secretada pelos fibroblastos, é necessário que se dê a hidroxilação de um certo número de moléculas de prolina. A hidroxilação da lisina, originando hidroxilisina, é igualmente importante, já que esta última forma ligações entre moléculas de colagénio, para lhe dar integridade estrutural. As enzimas prolil 4-hidroxilase, prolil 3-hidroxilase e lisina hidroxilase catalisam as reacções de hidroxilação de resíduos específicos de prolina e lisina. Estas enzimas são dioxigenases que requerem O_2 , Fe^{2+} e AA, e estão estequiometricamente ligadas à descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato. Conforme a reacção progride, o Fe^{2+} é oxidado em Fe^{3+} . Pensa-se que o papel da vitamina C na reacção é o de manter o ferro na forma reduzida

(Fig. 1.9). A sub-hidroxilação do pró-colagêneo, o qual se acumula e degrada, parece ser a base do escorbuto, o síndrome de deficiência em AA.

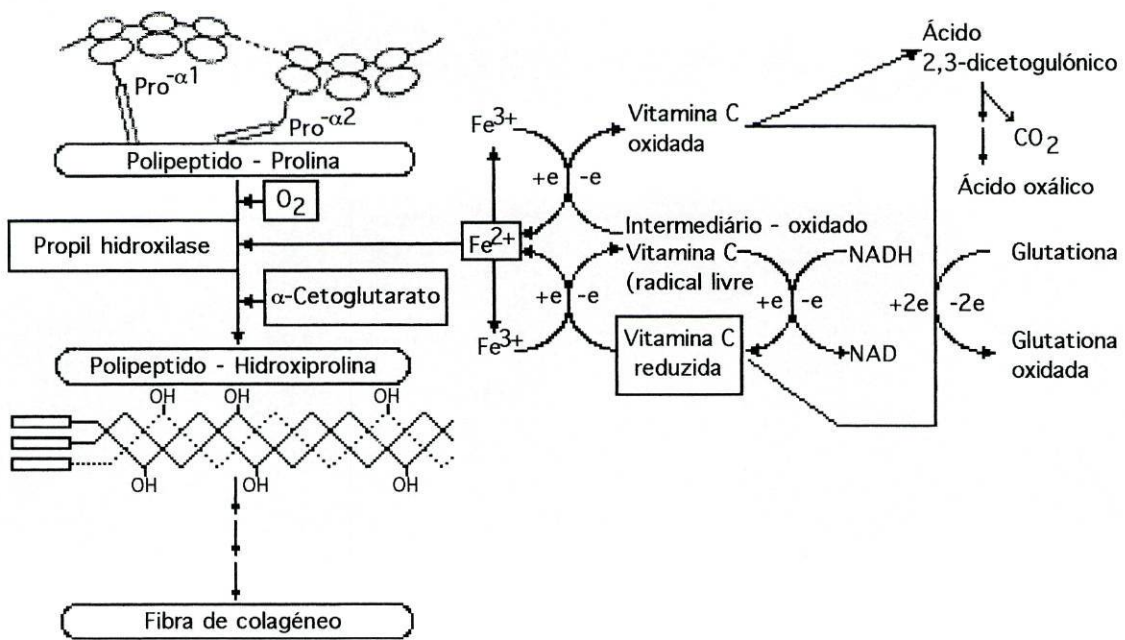


Fig. 1.9. Papel do AA na síntese do colágeno (Ikeda, 1988).

O AA tem um papel importante em hidroxilases envolvidas no metabolismo dos neurotransmissores, esteróides, drogas e lipídios. A dopamina β -hidroxilase é uma enzima contendo cobre envolvida na síntese das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, a partir da tirosina e que se localiza nas vesículas cromafins da medula adrenal e nas sinapses adrenérgicas do sistema nervoso central (SNC). A enzima activa contém Cu^+ , o qual é oxidado em Cu^{2+} durante a hidroxilação da dopamina em noradrenalina e, para que o cobre seja novamente reduzido à forma Cu^+ , é necessário AA. Uma enzima similar foi identificada na hipófise de ratos e gado. Esta é também uma enzima que contém cobre, a peptidilglicina α -amidase, e catalisa a ligação de um grupo amino a peptídeos biologicamente activos, tais como as melanotropinas e a calcitonina. Esta enzima requer ascorbato e O_2 para o seu funcionamento.

Para além do seu papel nestas 2 enzimas, o AA pode ter um papel de modulador da neurotransmissão no SNC. O neurotransmissor GABA (ácido γ -amino butírico) estimula a libertação de AA a partir de preparações de corpo estriado. Esta libertação de AA pode estar

envolvida na transmissão dopaminérgica, uma vez que o AA inibe a adenil ciclase dopamino-sensível (Bigelow *et al.*, 1984).

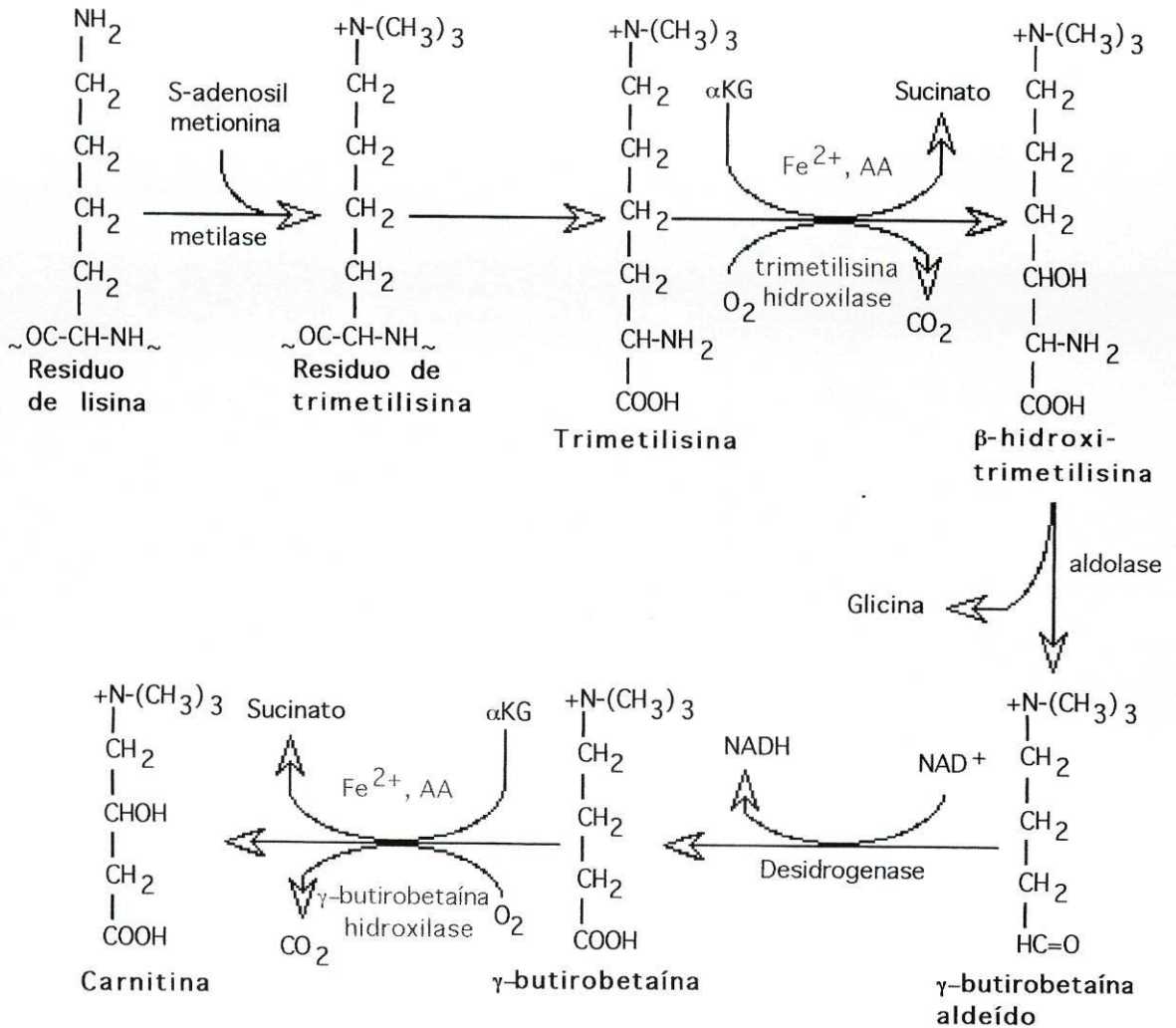


Fig. 1.10. Biossíntese da carnitina. ($\alpha\text{KG} = \alpha$ -cetogluturato)

A carnitina é sintetizada a partir da lisina e tem um papel central no transporte de ácidos gordos através da membrana mitocondrial, onde são oxidados para fornecerem energia (Fig. 1.10). A biossíntese da carnitina efectua-se no fígado e músculo estriado e envolve 2 enzimas que contêm Fe^{2+} , a ϵ -N-trimetilisina hidroxilase e a γ -butirobetáina hidroxilase, para as quais o AA é co-factor. A carnitina tem um papel importante na contracção muscular durante o esforço prolongado, pelo que, a deficiência desta molécula provoca sintomas que vão desde câibras ligeiras e recorrentes até fraqueza severa e morte. Em truta arco-íris Miyasaki *et al.* (1995) observou uma redução significativa da concentração da acilcarnitina de cadeia longa no fígados

dos animais alimentados sem suplementação de AA, em comparação os que receberam que AA no alimento, o que sugere a implicação desta vitamina no metabolismo da carnitina nos peixes.

O AA está envolvido no catabolismo da fenilalanina e da tirosina através de 2 enzimas contendo ferro que dependem da presença de da vitamina C: a *p*-hidroxifenilpiruvato hidroxilase (uma dioxigenase que catalisa a oxidação e a descarboxilação do ácido *p*-hidroxifenilpiruvato em homogentisato) e a homogentisato oxidase (outra dioxigenase que catalisa a oxidação do homogentisato em 4-maleilacetoacetato). A deficiência em AA pode alterar o funcionamento destas 2 enzimas, o que pode causar o aparecimento de tirosina no sangue (tirosinemia) bem como a excreção de produtos intermediários do catabolismo da tirosina.

Nos peixes, a deficiência em AA só produz alterações detectáveis ao nível do metabolismo da tirosina no rodvalho (*Scophthalmus maximus*). Esta espécie parece ser a única que não manifesta sintomas externos de deficiência aguda em AA, tal como acontece com as restantes espécies (Coustans *et al.*, 1990). Os sintomas que apresenta, nesta situação são melanose generalizada, opacificação do olho e deposição de cristais de tirosina, especialmente nos rins (doença granulomatosa), e hipertirosinemia (Coustans, *et al.*, 1990). Estes sintomas ligados ao catabolismo alterado da tirosina são completamente revertidos quando é distribuído um alimento suplementado com AA (Gouillou-Coustans, 1990).

Para além, destas funções, o AA também aumenta a biodisponibilidade do ferro dos alimentos, quando é ingerida em simultâneo, pois aumenta a sua absorção ao nível do intestino.

Outra função importante do AA tem a ver com o metabolismo de drogas e xenobióticos ao nível do fígado. Em animais com deficiência em AA há uma debilitação do metabolismo das drogas. Alguns autores descreveram uma diminuição da oxidação de agentes como a zoxazolamina, acetanilina, difenilhidramina e meperidina em microsomas de cobaios escorbúticos (Conney *et al.*, 1961; Kato *et al.*, 1969). Zannoni *et al.* (1972) verificou, em cobaios alimentados com

um alimento deficiente em AA durante 21 dias, que as actividades da anilina hidroxilase e aminopirina e *p*-nitroanisol desmetilases eram significativamente mais baixas e que possuíam concentrações mais baixas de citocromos P₄₅₀ e b₅, sendo o metabolismo destas drogas normalizado após administração de AA. Sato & Zannoni (1976) mostraram que o AA previne a perda de actividade do citocromo P₄₅₀ e da desmetilase e que protege o citocromo P₄₅₀ de reagentes quelantes do ferro, sendo o efeito máximo observado para um quociente de 2 mol de AA para 1 mol de citocromo. Zannoni *et al.* (1972; 1977) sugeriram que o AA protege o citocromo reduzindo o Ferro do grupo heme, o que leva a uma diminuição do catabolismo destas proteínas heme na presença de quantidades adequadas de AA.

As nitrosaminas são compostos cancerígenos que podem ser absorvidos directamente através da alimentação ou serem sintetizados a partir de nitritos e nitratos alimentares. O AA reage com nitritos, nitratos e outros compostos azotados capazes de produzir nitrosaminas formando NO, bloqueando, desta forma, a formação de nitrosaminas e, conseqüentemente, a carcinogénese induzida por estes compostos.

O AA é essencial para o funcionamento óptimo do sistema imunitário. O AA tem uma actividade bactericida e virucida contra diversos agentes patogénicos *in vitro*, especialmente na presença de iões metálicos. (White *et al.*, 1986; Ragab-Depre, 1982). A adição de AA a células infectadas com certos vírus resulta na cisão das cadeias de ADN ou ARN viral, o que conduz à perda de capacidade de infecção das partículas víricas (Morigaki & Ito, 1982; Blakeslee *et al.*, 1985; Salo & Cliver, 1978). A actividade virucida requer concentrações relativamente elevadas de AA (da ordem das mM), enquanto a actividade bactericida ocorre a concentrações da ordem das μ M (Ragab-Depre, 1982, Miller, 1969; Drath & Karnovsky, 1974). O AA também estimula a produção de interferon (proteínas que protegem as células contra infecções víricas) por parte de células infectadas com alguns tipos de vírus (Schwerdt & Schwerdt, 1975; Siegel, 1975). A deficiência em AA diminui a resposta quimiotáctica dos neutrófilos; aumenta a produção de radicais livres, os quais danificam os neutrófilos e as células circundantes; e

diminui a produção de HOCl, o principal agente microbicida (Bendich, 1992). Anderson *et al.* (1990 em: Lall *et al.*, 1993) sugeriu que uma função biológica primária do AA na defesa do hospedeiro pode envolver a neutralização do HOCl derivado dos granulócitos e a protecção do metabolismo energético celular contra o ataque oxidativo sustentando. Outros mecanismos do AA para a imunomodulação podem estar relacionados com as suas funções no metabolismo do ferro e do cobre. Em animais deficientes em AA tem sido relatada uma diminuição da produção de corticosteróides imunossupressivos (Lall & Olivier, 1993).

O papel do AA na resistência a doenças tem sido estudada em diversas espécies de peixes, mas os resultados variam muito e são contraditórios. Concentrações de AA superiores às necessárias para o crescimento normal têm sido referidas como tendo o efeito de aumentar a resistência do peixe-gato a infecções bacterianas como a *Edwardsiella tarda* e *E. ictaluri* (Durve & Lovell, 1982; Li & Lovell, 1985; Liu *et al.*, 1989). No entanto, no que respeita à resposta imunitárias humorais (título de anticorpos e actividade do complemento) Li & Lovell (1985) observaram um efeito positivo do AA alimentar, enquanto Liu *et al.* (1989) não. Mais tarde Li, *et al.* (1993), novamente em peixe-gato infectado com *E. ictaluri*, não observou qualquer efeito do AA na resistência a esta doença.

Nos salmonídeos os resultados são igualmente variáveis e inconclusivos. Em truta arco-íris, a suplementação do alimento com níveis de AA de 500 a 2000 mg de AA/Kg aumentou a resistência ao *Vibrio anguillarum* bem como melhorou a produção de anticorpos (Navarre & Halver, 1989). Satyabudhy *et al.* (1989) infectou truta arco-íris com o vírus IHN (necrose hematopoiética infecciosa) após os peixes terem sido alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de AA. Eles observaram que o aumento do AA alimentar produzia um efeito positivo na resistência à doença, mas não tinha qualquer efeito sobre a produção de anticorpos. Lall *et al.* (1989) e Hardie *et al.* (1991) não verificaram nenhum efeito significativo da ingestão de doses elevadas de AA na resistência e título de anticorpos em salmão Atlântico infectado com *Aeromonas salmonicida* ou *V. anguillarum*. No entanto, Hardie *et al.* (1991)

observou um efeito significativo de doses elevadas de AA alimentares na actividade sérica do complemento, resultado também observado por Verlhac *et al.* (1993). Sandnes *et al.* (1990) alimentou salmão Atlântico com dietas contendo concentrações equivalentes de AA e ascorbato-2-sulfato (0, 500 e 5000 mg/kg) durante 6 semanas e mediu a produção de anticorpos contra um antígeno solúvel (NIP₁₁-LPH). A respostas dos anticorpos estava ligeiramente diminuída nos peixes alimentados sem suplementação de AA, mas não haviam diferenças significativas entre os peixes alimentados com 500 e 5000 mg de AA/kg, independentemente da forma química de vitamina C fornecida.

Estes resultados demonstram a falta de clareza do papel do AA na função imune dos peixes. Li *et al.* (1993) considera que as diferenças encontradas nos vários estudos pode ser devida ao tamanho e história dos peixes experimentais, dos patógenos, dos métodos e patogenicidade da infecção, duração do período alimentar, o período de observação da mortalidade, do design experimental e das espécies estudadas. Segundo o mesmo autor, os peixes previamente expostos a patógenos podem ser mais sensíveis a alterações do conteúdo alimentar de vitamina C do que os nunca foram expostos, ou vice-versa; e que a infecção artificial por injeção ou imersão pode sobrepôr-se aos mecanismos naturais de defesa dos peixes.

1.4 STRESS

1.4.1. DEFINIÇÃO DO TERMO STRESS

A palavra stress é um termo largamente utilizado quer em linguagem corrente, quer em linguagem científica. No entanto, este termo gera grande confusão, pelo necessita de ser definido com clareza. Um peixe de uma dada espécie colocado num meio onde as características físico-químicas e biológicas são óptimas, não desenvolve qualquer reacção de adaptação, independentemente do tempo de exposição a esse meio. Se, no entanto, se produzirem alterações das características do meio que ultrapassem o intervalo de intensidade e/ou tempo ultrapassando

as capacidades de adaptação do organismo, fala-se então de stress. Comte (1995) esquematizou as zonas de reacção do organismo em função do estímulo (Fig. 1.11)

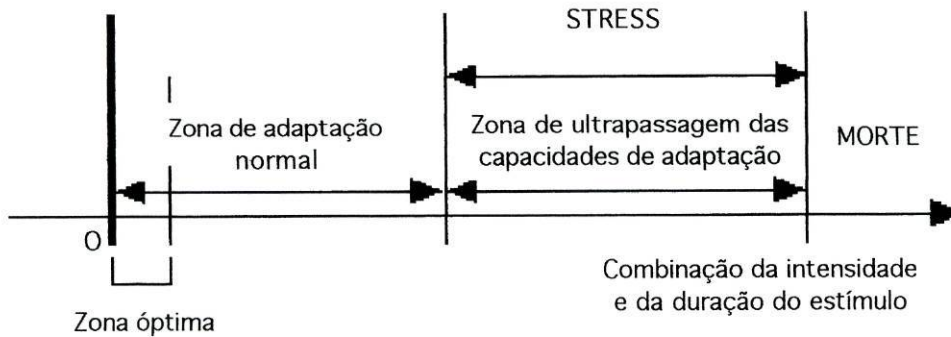


Fig. 1.11. Esquematização das zonas de reacção do organismo em função da combinação da intensidade e duração do estímulo (Comte, 1995).

Em biologia, a definição de stress é especificada pelo tipo de estudo efectuado, dando-se mais ênfase à noção de ultrapassagem das capacidades normais de adaptação ou à diminuição da sobrevivência do organismo a longo prazo. No entanto, como definição geral de stress em biologia, Brett (1958) parece ter feito a melhor descrição: “O stress é um estado produzido por factores ambientais, ou outros, levando à ultrapassagem da resposta adaptativa de um animal para além do normal, ou que perturba o seu funcionamento normal de tal forma que as hipóteses de sobrevivência são significativamente reduzidas”.

Quando um organismo é sujeito a stress, este sofre diversas alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Esta activação do organismo permite-lhe tentar adaptar-se às condições ambientais desfavoráveis. De acordo com o conceito proposto por Seyle (1936; 1950), um organismo stressado passa por 3 fases distintas, as quais designou por Síndrome Geral de Adaptação (SGA) (Fig. 1.9). As fases do SGA são as seguintes:

Fase de alarme: caracterizada principalmente por reacções morfológicas e fisiológicas reversíveis. No caso de factores de stress muito fortes e rápidos, esta fase termina, geralmente, com a morte do organismo.

Fase de resistência: durante a qual tem lugar a adaptação ou compensação das condições desfavoráveis para alcançar a homeostasia.

Fase de exaustão: durante a qual a adaptação deixa de ser possível e a homeostasia não pode ser alcançada. A maior parte destas alterações são irreversíveis e terminam com imunossupressão, diminuição do crescimento, diminuição da capacidade reprodutiva ou mesmo a morte.

Apesar da sua utilidade no estudo dos efeitos do stress em peixes, o SGA tem alguns problemas, pois generaliza a resposta dos organismos ao stress, pelo que não é adequada para todas as situações de stress (Schreck, 1981, 1982), já que algumas respostas são específicas em relação ao factor de stress (Leatherland, 1985). Moberg (1985 em: Barton & Iwama, 1991) propôs uma melhor descrição do stress, a qual está também dividida em 3 categorias: reconhecimento da ameaça à homeostasia; resposta ao stress propriamente dito; e consequências do stress. Cada categoria compreende eventos biológicos distintos que são iniciados pela percepção do factor de stress pelo SNC. A resposta culmina com o desenvolvimento de uma condição patológica, se as alterações fisiológicas provocadas pelo factor de stress forem suficientemente severas ou persistentes. Desta forma, a resposta dos peixes ao stress inclui componentes adaptativos e maladaptativos. Os peixes possuem uma capacidade natural para responderem fisiologicamente ao stress, de modo a ultrapassarem as condições adversas. Mas, quando os mecanismos de resposta são forçados para além dos seus limites normais, a resposta torna-se prejudicial para o peixe (maladaptativa). As respostas adaptativas e maladaptativas podem ocorrer sequencial ou simultaneamente no peixe (Fig. 1.12).

Na literatura científica o termo stress é utilizado para descrever o estímulo desequilibrador da homeostasia do organismo ou a resposta fisiológica a esse mesmo estímulo. No caso específico dos estudos em ictiologia, podemos encontrar autores que consideram o stress como o estímulo (Borger *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1994; Carragher *et al.*, 1994; Chien *et*

al., 1999; Mazeaud *et al.*, 1977; Montero *et al.*, 1999; Sunyer *et al.*, 1995; Tucker *et al.*, 1987; van Weerd *et al.*, 1998; Wedemeyer *et al.*, 1977; White *et al.*, 1989; Pickering, 1981) e outros que o consideram a resposta (Davis *et al.*, 1990; Flos *et al.*, 1988; Jarvis, 1990; Morales *et al.*, 1989; Morales *et al.*, 1990; Palace *et al.*, 1996; Waring *et al.*, 1992; Winkler, 1987). Barton & Iwama (1991) consideram o stress como sendo um estado causado por um factor de stress, que desvia o peixe do seu estado de homeostasia, pelo que concluem que, o stress em si mesmo não pode ser medido, podendo-se apenas determinar quantitativamente as respostas aos estímulos as quais reflectem o grau de severidade do stress experimentado.

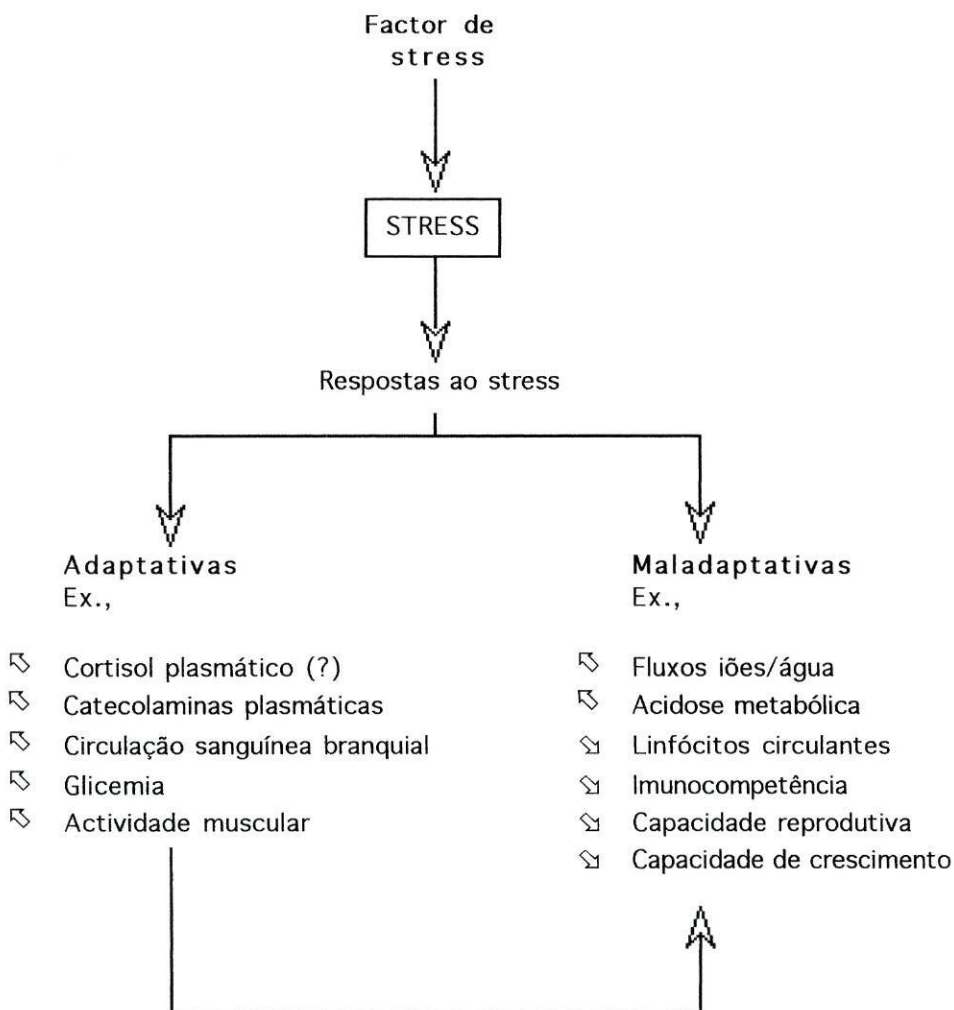


Fig. 1.12. Relação entre o factor de stress, o stress e as respostas adaptativas e maladaptativas mais representativas nos peixes. Apesar de a elevação do cortisol plasmático poder ser considerada como uma “resposta adaptativa”, devido à sua possível acção gluconeogénica, este papel do cortisol sob condições de stress ainda não foi conclusivamente confirmada (Barton & Iwama, 1991).

Para o presente estudo, esta última definição de stress foi considerada como a mais adequada, tendo sido a definição seguida.

1.4.2. RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO STRESS

As respostas ao stress têm sido classificadas em primárias, secundárias e terciárias, dependendo do que as desencadeia. Assim, as respostas primárias são aquelas que são desencadeadas directamente pelo estímulo; as secundárias são as que são provocadas pelas respostas primárias e as terciárias são o efeito das respostas secundárias. A cascata de acontecimentos provocados pelo stress é esquematizada na Fig. 1.13.

Os estímulos adversos (factores de stress) são detectados pelos órgãos sensoriais, que transportam a informação até ao hipotálamo, o centro de integração do cérebro. Vias neuronais aferentes partem do hipotálamo, através dos gânglios do sistema nervoso simpático, em direcção às células cromafins (homólogas da medula das glândulas supra-renais dos mamíferos), que usualmente recobrem as paredes das veias cardinais posteriores. Estas células cromafins segregam rapidamente catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) para a corrente sanguínea como resposta ao estímulo nefasto. Ao fim de alguns minutos os níveis plasmáticos de catecolaminas encontram-se elevados e podem manter-se assim durante várias horas (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Outros neurónios do hipotálamo, com axónios que terminam na vizinhança das células de corticotropina na parte anterior da pituitária (ou hipófise) crê-se que libertam, ao serem activados, um peptídeo, o factor libertador de corticotropina (“cortitropin releasing factor” - CRF), que provoca a libertação de corticotropina (ACTH - AdenoCorticoTropin Hormone) para o sangue (Donaldson, 1981). A corticotropina é transportada através da circulação periférica até à glândula interrenal (homóloga do córtex supra-renal dos mamíferos), onde estimula a produção e libertação de hormonas corticosteróides (predominantemente cortisol na maior parte das espécies de teleósteos- Thomas, 1990) para a corrente sanguínea.

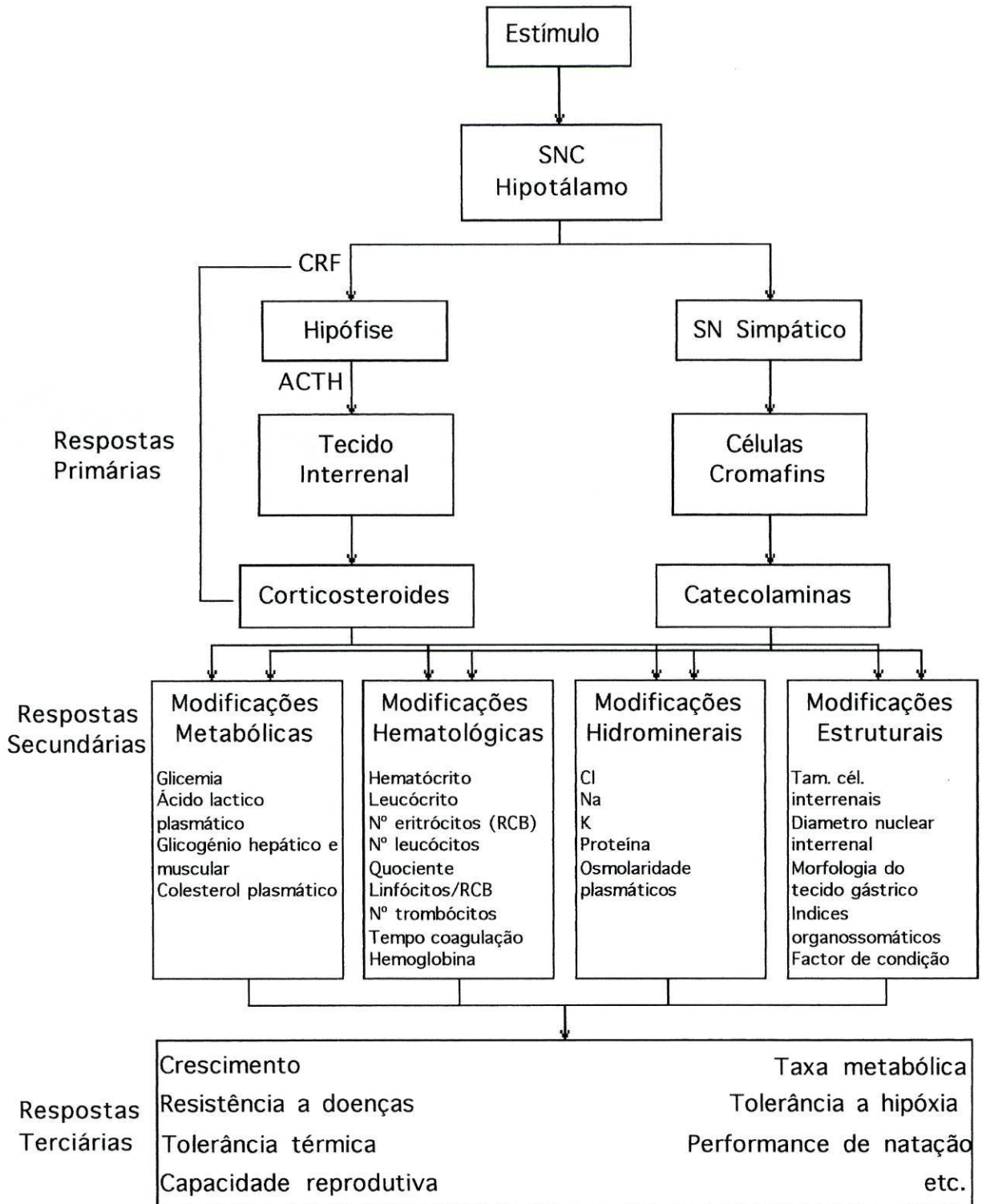


Fig. 1.13. Sequência das alterações fisiológicas e bioquímicas de um teleosteo desencadeadas pelo stress (modificado a partir de Mazeaud *et al.*, 1977; de acordo com Flos *et al.*, 1988 e Barton & Iwama, 1991).

A hipersecreção de catecolaminas e hormonas corticosteróides (respostas primárias) despoleta, por sua vez, uma vasta gama de alterações metabólicas, hematológicas, hidrominerais e estruturais (respostas secundárias), algumas das quais se encontram enumeradas na Fig.

1.13. Pensa-se que as catecolaminas causam o aumento inicial da glucose plasmática, através da mobilização das reservas de glicogénio hepático (glicogenólise) (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Nakano & Tomlinson, 1967), enquanto os corticosteróides mantêm a hiperglicemia, estimulando o catabolismo das proteínas e a gluconeogénese (Leach & Taylor, 1980). Também podem ocorrer perturbações do equilíbrio osmótico e iónico, resultando num aumento ou diminuição da osmolaridade plasmática conforme o ambiente é hiper ou hipotónico (Robertson *et al.*, 1988). Adicionalmente, os mecanismos de defesa imunitária podem ficar comprometidos devido à diminuição do número de leucócitos circulantes (leucopenia) e à diminuição da resposta imune a agentes infecciosos (Ellis, 1981).

Esta resposta endócrina generalizada, que resulta numa mobilização rápida das reservas energéticas, pensa-se que terá evoluído como um mecanismo adaptativo para possibilitar que o organismo satisfaça as suas necessidades acrescidas de energia durante a exposição e resistência a factores de stress. Quando o peixe é submetido a um factor de stress agudo, estas alterações persistem durante apenas alguns dias e não têm efeitos deletérios. Ao contrário, quando a exposição a um factor de stress é crónica, estas alterações prolongam-se, podendo induzir alterações patológicas, tais como diminuição do crescimento, da resistência a doenças e da capacidade reprodutiva, entre outras, que se designam por resposta terciárias (Wedemeyer & McCleay, 1981).

As respostas primárias, secundárias e terciárias são usadas frequentemente como indicadores de stress, sendo a sua quantificação muitas vezes utilizada como indicação da severidade do stress. A elevação da concentração das hormonas corticosteróides, principalmente o cortisol, nos peixes em resposta a factores de stress tem sido muito estudada (Avella *et al.*, 1990; Bandeen *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 1995; Bollard *et al.*, 1993; Brodeur *et al.*, 1998; Carragher & Sumpter, 1990; Cech *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1983; Fevolden *et al.*, 1993b; Leach *et al.*, 1980; Mazur *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1995; Schreck *et al.*, 1989; Sunyer *et al.*, 1995; van Ginneken *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1993). Geralmente nos peixes, os níveis

circulantes de corticosteróides são inferiores a 30-40 ng/ml (Wedemeyer *et al.*, 1990 in Barton & Iwama, 1991), mas idealmente deveria ser inferior a 5 ng/ml (Pickering & Pottinger, 1989). As variações consideráveis que se observam nos níveis de cortisol plasmático pode ser devido a outros factores que não sejam de stress, como é caso da smoltificação dos salmonídeos que pode provocar um aumento acentuado do cortisol circulante (Barton *et al.*, 1985; Langhorne *et al.*, 1986; Young *et al.*, 1989) e da migração reprodutiva (Audet *et al.*, 1986). Geralmente, os investigadores escolhem a quantificação do cortisol plasmático como resposta a factores de stress devido a ser um parâmetro fácil de medir e por ter um significado importante para os processos fisiológicos que afectam o equilíbrio dos peixes. De uma maneira geral, a magnitude e extensão da resposta dos corticosteróides a factores de stress reflecte, normalmente, a intensidade e duração destes (Barton *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 1998; Carragher & Rees, 1994; Flos *et al.*, 1988; Foo *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 1993a; Mesa *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1987; Roche *et al.*, 1989). Deste modo, pode-se assumir erradamente que, se o stress provoca uma subida anormal dos valores do cortisol circulante, a inexistência de hipercortisolémia significa a ausência de stress. Isto não é necessariamente verdade. A exposição dos peixes a certas substâncias tóxicas é certamente prejudicial, já que causa directamente alterações na saúde do peixe ou mesmo a sua morte, mas não provoca necessariamente um aumento do cortisol plasmático, como é esperado em resposta a um factor de stress. O mugem, *Mugil cephalus*, exposto a um ambiente contaminado com cádmio não apresentou qualquer elevação da concentração de cortisol circulante (Thomas & Neff, 1985). Anteriormente, Schreck & Lorz (1978) mostrou que este mesmo poluente não provocava hipercortisolémia no salmão coho, e Grant & Mehrle (1973) tiveram resultados semelhantes em truta arco-íris exposta ao poluente endrina. Também não foram encontrados aumentos do cortisol plasmático em truta arco-íris infectada com o parasita sanguíneo *Cryptobia salmositica* (Laidley *et al.*, 1988), nem com *Ichthyophonus hoferi* (Rand & Cone, 1990), nem em Salmão chum, *Oncorhynchus keta*, infectado com o vírus da necrose eritrocítica (ENC - Haney *et al.*, 1992). Também no que refere à utilização de anestésicos para bloquear ou diminuir o stress, os

resultados não são concordantes. O anestésico MS-222 (tricaina), que é utilizado com frequência em aquacultura, parece ter um efeito quer supressor quer indutor de stress (Molinerio *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1991) em função da sua aplicação, i. e., dependendoda dose e tempo de exposição, o que é evidenciado pela alteração da cortisolémia.

A glucose plasmática é outro parâmetro muito utilizado na avaliação da severidade do stress dadaa facilidade de medição. Tem sido observado, nos peixes, um aumento significativo da glicemia (hiperglicemia) em resposta a vários tipos de stress (Al-Akel, 1994; Brown *et al.*, 1995; Davis & Parker, 1990; Hemre *et al.*, 1991; Järvis, 1990; McDonald *et al.*, 1993b; Morata *et al.*, 1982; Muusze *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1995; Vijayan *et al.*, 1994; Waring *et al.*, 1992). No entanto, alguns estudos não encontraram este aumento da glicemia em resposta a alguns tipos de stress, apesar de apresentarem um aumento do cortisol plasmático (Rotllant *et al.*, 1997; Waring *et al.*, 1996). Deste modo, a ausência de hiperglicemia não pode ser considerada como a ausência de stress. Para além deste facto, quando se pretende interpretar a magnitude da hiperglicémia em função da severidade do factor de stress aplicado, deve-se ter em conta outros factores que interferem directamente com a glicemia, como é o caso da composição do alimento (Barton *et al.*, 1988; Hemre *et al.*, 1991) e as características genéticas da população em estudo (Fevolden *et al.*, 1993a; Fevolden & Røed, 1993b).

A maior limitação da utilização das respostas primárias e secundárias como indicadores de stress é a sua rápida indução durante a captura e recolha de sangue dos peixes. Em estudos de laboratório devem ser tomadas precauções para impedir a activação do eixo hipotalamico-pituitário- interrenal quando se pretende avaliar este tipo de respostas a factores de stress.

No caso de estudos de monitorização ambiental, principalmente quando se pretende observar o efeito de agentes poluentes sobre as populações naturais de peixes, são utilizados indicadores moleculares, bioquímicos e histopatológicos. As alterações bioquímicas e

moleculares são as primeiras a se manifestarem quando um peixe é sujeito a stress, pelo que podem ser particularmente úteis como indicadores precoces de alterações ambientais, de forma a que possam ser tomadas medidas de correcção antes que as condições desfavoráveis conduzam ao declínio permanente das populações piscícolas (Thomas, 1990). No entanto, têm a desvantagem terem algum grau de incerteza biológica e de relevância toxicológica (Thomas, 1990). No que respeita aos indicadores histopatológicos, as manifestações do stress ao nível dos tecidos são observáveis mais tardiamente do que no caso dos indicadores moleculares e bioquímicos, mas aparecem mais cedo do que as alterações do crescimento e reprodução, e são mais sensíveis do que estes. A revisão destes indicadores pode ser feita consultando a seguinte bibliografia: Hinton *et al.*, 1992; Teh *et al.*, 1997; Thomas, 1990.

1.5. VITAMINA C E STRESS NOS PEIXES

Os estudos relacionados com o AA e o stress nos peixes tem-se debruçado na possibilidade de este nutriente ser capaz de reduzir os impactos negativos causados pelo stress. O stress provoca diversas alterações fisiológicas, já descritas na secção anterior, e em aquacultura o manuseamento e as condições de cultura são fonte constante de stress, o qual produz grandes perdas económicas no sector. No entanto, os resultados obtidos nos estudos sobre a influência do AA na resistência ao stress são contraditórios e inconsistentes, o que torna difícil clarificar o verdadeiro papel desta vitamina na fisiologia do stress e, deste modo, utilizá-la de forma consistente em aquacultura.

Em 1969, Wedemeyer observou uma diminuição significativa da concentração de AA no rim anterior de truta arco-íris e salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*) em resposta a choque térmico e agitação da água do aquário, pelo que concluiu que a concentração de AA no referido órgão era marcadamente influenciada por stress não específico. Em peixe-gato o stress imposto por uma densidade de stockagem elevada indicou provocar um aumento dos requisitos de AA

(Lovell & Lim, 1978). A exposição de do mugem, quer de forma aguda quer crónica, a concentrações elevadas de cádmio provocou diminuição da concentração de AA no fígado, brânquias e cérebro (Thomas *et al.*, 1982). Os efeitos do stress de salinidade, temperatura e captura na concentração de AA da mesma espécie também foram investigados pelo mesmo autor (Thomas, 1984). Todos os tratamentos conduziram a alterações na concentração de AA no cérebro, brânquias, rim e fígado, mas o padrão das flutuações variou, observando-se quer aumentos quer diminuições significativas. Thomas (1987) demonstrou que a exposição a fracções hidrossolúveis de óleo causou uma diminuição do teor em AA do cérebro, brânquias, rim e fígado do mugem. A diminuição do teor em AA no cérebro como resposta ao stress foi estudada por Tucker *et al.* (1987) em truta arco-íris, mostrando que a perda de AA no cérebro, após a manutenção dos peixes em câmaras metabólicas durante 5 dias, era significativamente maior do que nos peixes mantidos como controlos. Já Palace *et al.* (1996) não encontrou qualquer diferença significativa na concentração de AA hepático da truta do lago Americana, *Salvelinus namaycush*, injectadas com PCB-126. De igual forma, o stress de confinamento do peixe-gato, não afectou a concentração de AA no fígado e plasma (Li *et al.*, 1998), tendo sido obtidos resultados semelhantes em truta arco-íris injectada com lindano, um insecticida organoclorado (Dunier *et al.*, 1995).

A grande variação dos resultados obtidos nos diversos estudos referidos, aponta para a necessidade de aprofundar mais os estudos nesta área de investigação, por forma a clarificar o real papel do AA na resistência a factores de stress.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. FACTORES DE STRESS

No intuito de verificar a eventual acção do AA na resposta fisiológica da dourada ao stress, foi escolhido um factor para ser estudado. Como factor de stress foi escolhida a hipóxia, a qual foi estudada em três situações distintas: hipóxia aguda, intermitente e crónica. A intensidade de hipóxia foi, desta forma, adaptada a cada um dos estudos, i. e., níveis muito baixos de OD (oxigénio dissolvido), da ordem de 20-25% da saturação, nos casos de hipóxia aguda e intermitente, e níveis médios de OD (aproximadamente 55% da saturação), no caso da hipóxia crónica.

Os critérios principais de escolha do factor de stress a ser aplicados foram o ser um factor ambiental, o qual não provocasse uma resposta fisiológica que envolvesse directamente nenhum dos mecanismos dependentes do AA (desintoxicação de xenobióticos, resposta imunitária e cicatrização), e ser facilmente aplicável. Desta forma, tornar-se-ia possível verificar se a acção do AA se exerce na resposta fisiológica geral ao stress, ou se só exerceria a sua influencia no caso de factores de stress que envolvam mecanismos específicos dependentes do AA, como os supracitados.

Dado o elevado grau de dificuldade técnica para estudar a hipóxia numa situação de níveis subletais de OD num período de tempo superior a 24 h, optou-se por fazer este tipo de experiência utilizando um outro factor de stress ambiental, a concentração de amónia (NH_3). No entanto, os resultados deste estudo não foram, como é evidente, extrapolados para o caso da hipóxia, já que, é provável que os dois factores accionem mecanismos fisiológicos específicos distintos.

2.2. DIETAS EXPERIMENTAIS

Em todas as experiências os peixes foram alimentados com alimentos isoproteicos (45% matéria seca -MS) e isoenergéticos (20 kJ/g MS), com uma razão proteína bruta/energia bruta da ordem dos 22.5 mg/kJ, de acordo com a formulação apresentada por Santinha *et al.* (1996), e geralmente associada com o crescimento óptimo da dourada (Tabela 2.1). O alimento teve como ingrediente base a farinha de peixe, sendo esta a principal fonte proteica. Os vários ingredientes do alimento foram pesados e misturados de forma a obter uma mistura homogênea, a qual foi granulada, sem recorrer à utilização de vapor (o que poderia destruir o AA), com um tamanho adequado ao tamanho inicial dos peixes utilizados nas diferentes experiências.

Tabela 2.1. Formulação do alimento base utilizado em todos os estudos.

Ingredientes	(g/kg)
Farinha de Peixe ¹	480
Trigo micronizado ²	360
CPSP ³	100
Óleo de fígado de bacalhau	42
Premix mineral	10
Premix vitamínico ⁴	5
Colina	3
Ácido ascórbico ⁵ (mg AAeq./Kg alimento)	0 - 200

¹ Proteína bruta - 69%; gordura bruta - 10%

² Proteína bruta - 12%; gordura bruta - 2%

³ Proteína bruta - 76%; gordura bruta - 4%

⁴ Concentrado de proteína de peixe - Sopropêche, França

⁵ Sem ácido ascórbico

⁶ Rovimix Stay-C 25 - Hoffmann La Roche, Suíça

Na formulação deste alimento houve o cuidado de manter o equilíbrio mineral e vitamínico (Tabelas 2.2 e 2.3), excepto no que diz respeito ao ácido ascórbico, o qual não fez parte da mistura vitamínica, sendo posteriormente adicionado ao alimento em diferentes

concentrações (0-200 mg AA eq/kg), por forma a permitir estudar a sua influência na resposta fisiológica ao stress.

Tabela 2.2. Concentração das vitaminas e minerais no alimento.

Vitamina	Concentração (mg/Kg dieta)	Mineral	Concentração (mg/Kg dieta)
Tocoferol (E)	20.00	Cobalto (Co)	0.40
Menadiona (K3)	5.00	Cobre (Cu)	5.00
Tiamina (B1)	5.00	Ferro (Fe)	40.00
Riboflavina (B2)	5.00	Flúor (F)	1.00
Ácido Pantoténico (B3)	10.00	Iodo (I)	0.50
Ácido nicotínico (B5)	100.00	Magnésio (Mg)	500.00
Piridoxina (B6)	5.00	Manganês (Mn)	20.00
Ácido fólico (B9)	2.00	Selénio (Se)	0.30
Cobalamina (B12)	0.05	Zinco Zn)	30.00
Biotina (H)	0.50		(%)
Ácido ascórbico	0.00	Cálcio (Ca)	0.17
Ácido p-aminobenzóico	50.00	Fósforo (P)	0.13
Inositol	500.00	Potássio (K)	0.06
Cloreto de colina	500.00	Cloro (Cl)	0.08
	(UI/Kg alimento)	Cloreto de sódio	0.04
Retinol (A)	10 000	(NaCl)	

2.3. ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA

Neste trabalho, a dourada (*Sparus aurata*) foi a espécie escolhida para ser estudada (Fig. 2.1). Tal escolha adveio do facto de esta ser uma das espécies mais cultivadas no nosso país, razão pela qual tem um grande interesse económico. A sua capacidade de crescimento e a sua aparente resistência elevada a alterações ambientais, quando comparada com outras espécies

aquícolas em Portugal (por exemplo, o robalo - *Dicentrarchus labrax*) foram, também, motivos importantes para a sua escolha.

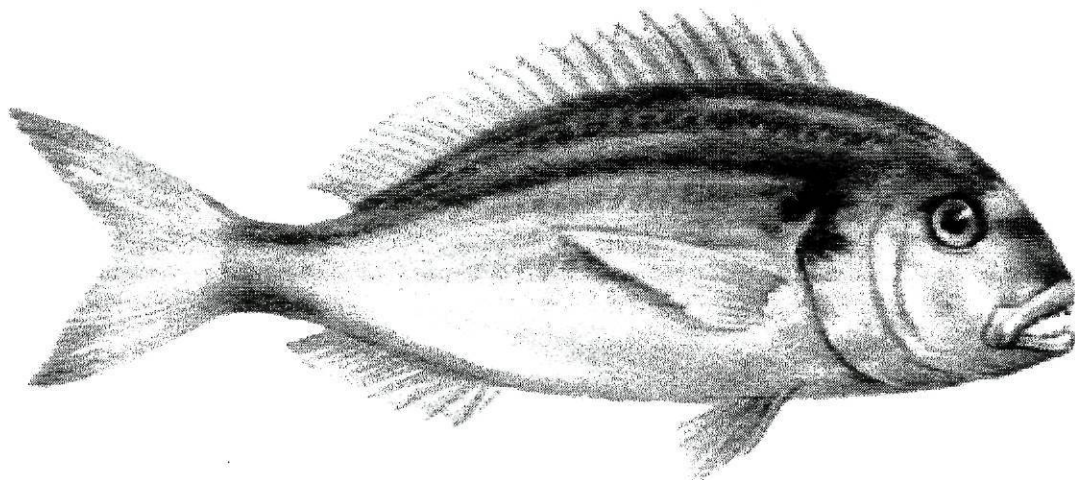


Fig. 2.1. Dourada, *Sparus aurata*.

Os peixes utilizados nas diversas experiências foram sempre de cultura, tendo sido obtidos em diferentes maternidades, de acordo com as necessidades. Estes foram sempre retirados de stocks homogêneos de indivíduos, no que respeita ao peso e idade. Após um período de aclimação às novas condições de cultura, os peixes foram, então, pesados e distribuídos uniformemente pelos diversos tanques experimentais. Para experiências onde o crescimento da dourada foi estudado (Capítulos 3, 4 e 5) foram utilizados peixes pequenos (1.5 a 9.5 g), cujo peso depende da disponibilidade de tamanhos no mento da experiência, pois estes apresentam-se numa fase de crescimento rápido, o que permite evidenciar num mais curto espaço de tempo qualquer diferença devida aos tratamentos.

2.4. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Em todos os estudos experimentais efectuados, o crescimento dos animais foi sempre controlado, de maneira poder ser evidenciada qualquer diferença entre os grupos alimentados

com as diferentes dietas experimentais. Os parâmetros utilizados estão enumerados e equacionados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Critérios de avaliação do crescimento e da utilização dos nutrientes.

PMI	Peso médio inicial (g)	$\frac{\text{Peso total inicial do lote (g)}}{\text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$
PMF	Peso médio final (g)	$\frac{\text{Peso total final do lote (g)}}{\text{n}^\circ \text{ final de indivíduos}}$
TCE	Taxa de crescimento específico	$\frac{\ln \text{ PMF} - \ln \text{ PMI} \times 100}{\text{Tempo (dias)}}$
ICD	Índice de crescimento diário	$\frac{\text{PMF}^{1/3} - \text{PMI}^{1/3} \times 100}{\text{Tempo (dias)}}$
ICA	Índice de conversão alimentar	$\frac{\text{Matéria seca ingerida (g)}}{\text{PMF} - \text{PMI (g)}}$
CEP	Coefficiente de eficácia proteica (g/g proteína)	$\frac{\text{PMF} - \text{PMI (g)}}{\text{Proteína bruta ingerida (g de MS)}}$
CAV	Consumo alimentar voluntário (% PMI/dia)	$\frac{\text{Consumo alimentar (g)} \times 100}{\text{PMI (g)} \times \text{Tempo (dias)}}$
IHS	Índice hepatossomático (%)	$\frac{\text{Peso fígado (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E DOS ALIMENTOS

Para proceder à análise química dos alimentos, foram recolhidas amostras destes, as quais foram subseqüentemente moídas e armazenadas até serem analisadas. No caso das carcaças, estas foram congeladas e moídas. Deste homogeneizado foram colhidas alíquotas para determinar o seu teor em matéria seca (MS). O restante foi liofilizado e, quando necessário, novamente triturado, para obter uma amostra o mais homogênea possível. Tal como no caso dos alimentos, estas amostras foram armazenadas para posterior análise.

A composição química destas amostras foi determinada de acordo com o descrito no AOAC (1983): a percentagem de M S foi obtida por secagem em estufa a 104°C durante 24 h; a proteína bruta ($N \times 6.25$) foi obtida pelo método de Kjeldahl ou por combustão instantânea automática, seguida de separação cromatográfica gasosa e detecção da condutividade térmica (Nitrogen Analyser 2000, Fison Instruments); a gordura bruta foi determinada por extracção contínua com éter de petróleo, num extractor de Soxhlet; as cinzas foram quantificadas incinerando a amostra em mufla a 550°C durante 12 h; a energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica adiabática.

2.5.2. ANÁLISES PLASMÁTICAS

Sempre que se procedeu a análises plasmáticas, as colheitas de sangue foram efectuadas imediatamente após a recolha dos peixes, com seringa heparinizada e por punção da veia caudal. O sangue foi, então, centrifugado e o plasma recolhido e congelado a - 20°C.

A glicemia, o cortisol e o azoto amoniacal total (TAN) foram quantificados utilizando kits comerciais de diagnóstico. Para a glicemia foi usado um método enzimático-colorimétrico (GOD - PAP; Spinreact, Olot, Gerona); o cortisol foi determinado por um método de ELISA (Milenia, DPC, Los Angeles, USA), desenvolvida para o cortisol humano, mas validado para a medição do cortisol em peixes (Barry *et al.*, 1993); um kit enzimático (UV - 170, Sigma diagnostics) foi usado para determinar o TAN plasmático.

2.5.3. TEOR EM ÁCIDO ASCÓRBICO NOS TECIDOS

A avaliação do estado das reservas corporais de vitamina C dos animais experimentais, foi levada a cabo através da medição do teor em AA em alguns tecidos da dourada, especificamente o hepatopaneas (referido seguidamente apenas como fígado), o rim cefálico e o baço. Estes órgãos foram escolhidos por serem órgãos de armazenamento do AA, principalmente o fígado. Os

órgão foram colhidos imediatamente após a morte do peixe, e rapidamente conservados para análise posterior. No caso do primeiro estudo (Capítulo 3) optou-se pela imersão em azoto líquido e conservação a -70°C . Dado que este processo revelou não ser o mais eficaz, nos estudos seguintes as amostras foram preservadas por imersão em ácido metafosfórico a 5% (HPO_3) e posterior congelação a -20°C . A concentração em AA nestes órgãos foi efectuada por um método fluorimétrico automático de fluxo contínuo, descrito por Bourgeois *et al.* (1989). Este método baseia-se na oxidação do AA pelo iodo, forma sob a qual reage com o 4,5-dimetil-1,2-fenileno, formando um derivado fluorescente da quinoxalina (em anexo).

Não se procedeu à medição dos níveis reais de AA nos alimentos dado que o método utilizado não permite a quantificação da forma polifosfatada desta vitamina.

2.5.4. TEOR EM HIDROXIPROLINA NA PELE

O teor em hidroxiprolina foi determinado na pele da dourada, um tecido rico em colagénio e de fácil acesso, para investigar o efeito dos diferentes níveis de AA sobre a integridade dos tecidos conjuntivos. A pele foi extraída e limpa de escamas e restos de tecido muscular, sendo depois congelada até à sua análise. Esta foi efectuada após desidratação das amostras com acetona e hidrólise ácida, recorrendo à detecção colorimétrica conforme o descrito por Bonnet & Kopp (1984) e que se encontra detalhadamente descrita em anexo.

2.5.5. CONCENTRAÇÃO DO AZOTO AMONIAICAL TOTAL (TAN) NA ÁGUA DO MAR

A concentração do TAN na água do mar foi medida usando um método colorimétrico automático de fluxo contínuo, que tem como base o método colorimétrico do indofenol descrito por Treguer & Le Corre (1975), e que foi modificado por Dosdat *et al.* (1995).

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados usando o programa “Statistica 5” para Windows. Os dados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) a um ou a dois factores, dependendo do tipo de dados a analisar, com contraste à posteriori pelo teste de comparação múltipla de Tukey (Tukey, 1949). No Capítulo 5 procedeu-se também a uma regressão linear, para determinar a relação entre o nível de suplementação em AA no alimento e o teor em AA no fígado. Esta foi efectuada pelo método dos mínimos quadrados, seguido de uma análise de variância para verificar a significância da regressão.

3. INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE ALIMENTOS COMPOSTOS COM ACIDO ASCORBICO NO CRESCIMENTO E RESPOSTA A HIPOXIA AGUDA EM DOURADA, *Sparus aurata*.

3.1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico tem numerosas funções biológicas: é um antioxidante eficiente, é essencial para a síntese de colagénio, ajuda à manutenção de várias enzimas na sua forma reduzida e participa na biossíntese da carnitina, norepinefrina e alguns péptidos neuroendócrinos.

Os invertebrados, os insectos e a maior parte dos peixes, algumas aves, os cobaios, os morcegos e os primatas, não são capazes de sintetizar o ácido ascórbico. Por esta razão, estes animais dependem totalmente do suprimento alimentar desta vitamina. Nos peixes, tem sido demonstrada a essencialidade do ácido ascórbico para o crescimento e para a prevenção do escorbuto. No entanto, os requisitos mínimos para cada espécie de peixes têm sido difíceis de estabelecer, dada a grande labilidade da vitamina C, a qual é rapidamente destruída pelos métodos de fabricação dos alimentos, bem como pela longa armazenagem. O aparecimento de formas estabilizadas, mas biologicamente disponíveis, de ácido ascórbico, como é o caso do ascorbil polifosfato, veio permitir determinar com maior precisão os requisitos desta vitamina nos peixes (Shiau *et al.*, 1995; Teshima *et al.*, 1993). ONRC (1993) recomenda a adição de 50 mg de AA/kg de alimento no caso dos salmonídeos, e Kaushik *et al.* (1998) demonstrou a aplicabilidade desta recomendação a outras espécies piscícolas.

Em condições de cultura os peixes são sujeitos a manipulações como a sua pesca, manuseamento, transporte, calibragem, sobre-alimentação e sobrecarga de stockagem, as quais são stressantes (Barton & Iwama, 1991; Donaldson, 1981; Sandnes, 1991; Tomasso *et al.*, 1981). Estas condições estão muitas vezes associadas à diminuição da resistência a patógenos,

a uma maior dificuldade de manter a homeostasia interna e de resistir a factores de stress adicionais (Wedemeyer & Mcleay, 1981; Robertson *et al.*, 1987). Face à presença factores de stress, no organismo dão-se diversas alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (Halim *et al.*, 1985), as quais permitem a sua adaptação às condições adversas.

Tem sido demonstrado que a necessidade de ácido ascórbico aumenta em mamíferos sujeitos a diversas condições stressantes (Hughes *et al.*, 1971), e observações semelhantes têm sido feitas em salmonídeos (Hardie *et al.*, 1991; Navarre & Halver, 1989) e noutros peixes (Agrawal *et al.*, 1978; Ishibashi *et al.*, 1992a; Ishibashi *et al.*, 1992b; Thomas, 1984; Thomas *et al.*, 1982). No entanto, esta relação continua por clarificar no que respeita aos peixes, como é demonstrado pelo trabalho de outros investigadores (Gouillou-Coustans *et al.*, 1993; Henrique *et al.*, 1996; Sandnes & Waagbø, 1991).

O presente estudo foi efectuado para determinar o efeito do stress de hipóxia crónica sobre os juvenis de dourada alimentados com diferentes níveis de ácido ascórbico.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos juvenis de dourada numa maternidade comercial (Algarve, Portugal), os quais, depois de um período de adaptação às condições experimentais, foram divididos em grupos de 40 indivíduos, com um peso médio de 9 g. Estes grupos foram distribuídos aleatoriamente por 10 tanques de fibra de vidro com capacidade de 300 l, montados num circuito semi-fechado com uma renovação de água de 100 %/dia (Fig. 3.1). Os tanques foram individualmente alimentados com água do mar com um fluxo de 3 l/min., a temperatura foi mantida a 26°C e o fotoperíodo foi de 16 h dia/8 h noite.

Cinco alimentos experimentais foram preparados de acordo com a formulação expressa na Tabela 2.1, diferindo estas apenas no nível de suplementação em ácido ascórbico, os quais

foram 0, 25, 50, 100 e 200 mg AAequiv./Kg alimento. Os alimentos foram armazenados a 4°C durante o período experimental, por forma a evitar a sua deterioração.

Grupos duplicados de peixes foram alimentados à mão, com um dos alimentos experimentais, duas vezes por dia até à saciedade visual, durante 12 semanas. De 3 em 3 semanas o conjunto dos peixes de cada tanque foi pesado, o consumo alimentar voluntário registado e o sistema profundamente limpo. No final do período de crescimento foi recolhida uma amostra de 5 peixes de cada tanque para se proceder à determinação da composição corporal, juntamente com uma amostra inicial de carcaças e amostras dos alimentos. A composição das carcaças e dos alimentos foi determinada de acordo com o descrito no Capítulo 2.

Após esta amostragem, os peixes restantes foram mantidos nas mesmas condições experimentais durante mais 1 semana, por forma a recuperarem do stress de manipulação a que foram sujeitos. As Douradas foram, então, sujeitas a hipóxia aguda durante 24 h, após um período de jejum de 24 h, para evitar que houvesse excreção significativa de amónia. A hipóxia foi produzida cortando o influxo de água dos tanques e reduzindo, simultaneamente, a aerificação dos mesmos. Os níveis de OD diminuíram de 5.8 para 1.2 mg/l num período de 30 min., sendo este último nível mantido (± 0.2 mg/l) até ao final da experiência através da regulação da aerificação.

Imediatamente antes da aplicação do stress de hipóxia e 3, 6, 9 e 24 h após o seu início, foram amostrados 5 peixes de cada tanque, anestesiados com etilenoglicolmonofenileter, para se proceder à recolha de amostras de sangue, fígado e baço para análise. Os tecidos amostrados foram tratados conforme o descrito na metodologia geral. Foram quantificados os seguintes parâmetros: glicémia, cortisol plasmático e nível de AA no fígado e baço.

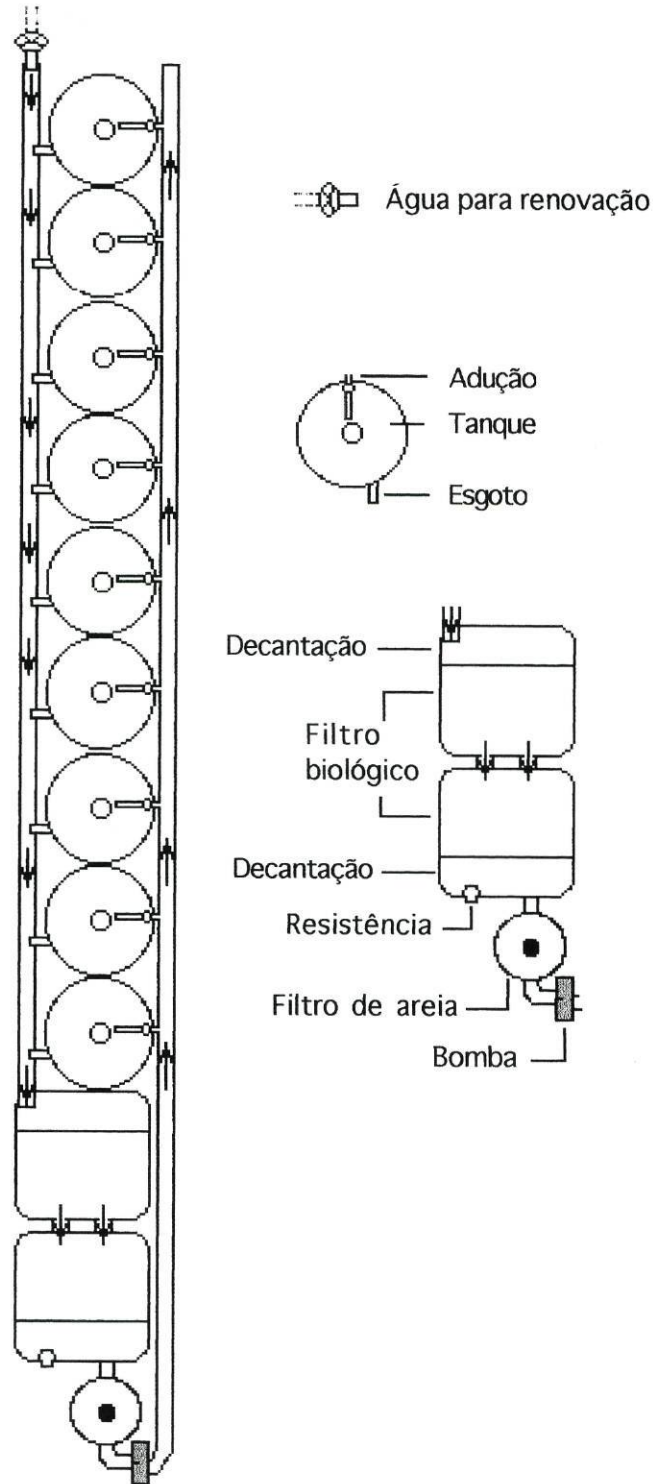


Fig. 3.1. Esquema do sistema experimental utilizado no estudo da influência do ácido ascórbico na resposta à hipóxia aguda.

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados de acordo com o descrito no capítulo 2, sendo apresentados na secção seguinte.

3.3. RESULTADOS

A composição química dos vários alimentos experimentais encontra-se descrita na Tabela 3.1 e mostra que não existem diferenças significativas eles.

Após 12 semanas de crescimento, os pesos finais médios das douradas alimentadas com as diferentes dietas não eram significativamente diferentes (Tabela 3.2). No entanto, o ICA era significativamente mais baixo no caso dos peixes alimentados com o alimento contendo 200 mg AA/Kg em comparação com os alimentados sem suplementação em AA.

Tabela 3.1. Composição química dos alimentos experimentais.

	Nível de AA/Kg Alimento				
	0	25	50	100	200
Matéria Seca (%)	89.4	89.2	89.8	89.5	89.8
Proteína Bruta (Nx6.25, % MS)	45.1	44.9	45.4	45.2	45.6
Gordura Bruta (% MS)	17.8	18.0	17.1	17.2	17.7
Energia Bruta (kj/g MS)	19.8	19.7	19.6	19.6	19.6
Cinzas (% MS)	10.4	10.8	10.6	11.0	10.7

O CAV era significativamente mais baixo nos animais alimentados com 100 e 200 mg AA/Kg alimento do que nos alimentados com 0 e 25 mg. O CEP aumentou com o aumento do nível de suplementação em AA, sendo significativamente mais baixo nos peixes alimentados com o alimento não suplementado do que nos alimentados com 200 mg AA/Kg alimento.

A análise aproximada da composição das carcaças das douradas alimentadas com os diferentes alimentos encontra-se expressa na Tabela 3.3 e mostra a inexistência de diferenças significativas entre os vários grupos.

Tabela 3.2. Parâmetros de crescimento e de eficiência de dourada alimentada com diferentes níveis de AA (n=3; 12 semanas; 26°C; saciedade).

	Nível de AA/Kg Alimento				
	0	25	50	100	200
PMI (g)	9.5±0.03	9.3±0.03	9.5±0.03	9.4±0.03	9.4±0.03
PMF (g)	40.5±5.5	41.5±5.8	41.3±5.5	40.5±5.1	39.6±5.72
TCE	1.73±0.06	1.78±0.03	1.75±0.02	1.73±0.03	1.72±0.01
ICA	1.76±0.05 ^b	1.69±0.05 ^{ab}	1.58±0.01 ^{ab}	1.55±0.02 ^{ab}	1.48±0.04 ^a
CEP	1.26±0.03 ^a	1.32±0.04 ^{ab}	1.40±0.01 ^{ab}	1.43±0.02 ^{ab}	1.49±0.04 ^b
CAV	6.85±0.26 ^b	6.94±0.01 ^b	6.34±0.11 ^{ab}	6.07±0.09 ^a	5.68±0.07 ^a
Sobrev. (%)	95.0±0.00	96.3±0.01	91.3±0.01	92.5±0.00	95.0±0.03

Médias ± Erro Padrão (EP) na mesma linha com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P < 0.05).

A Tabela 3.4 apresenta a variação de diversos parâmetros fisiológicos em função do nível de suplementação nutricional em AA, tais como o IHS, a glicemia, o cortisol plasmático e o conteúdo em AA do fígado e do baço, após 12 semanas de crescimento e antes da aplicação do stress.

Tabela 3.3. Análise aproximada da composição corporal das douradas alimentadas com os diferentes alimentos (n=3).

Nível de AA/Kg Alimento	Inicial	Final				
		0	25	50	100	200
MS (%)	34.8	29.3	28.0	29.2	29.4	27.8
Proteína (% MS)	62.2	57.5	59.8	60.0	58.4	58.7
Gordura (% MS)	23.3	26.9	25.3	25.4	27.0	25.1
Cinzas (% MS)	16.0	15.9	15.9	15.3	15.7	16.6

A concentração de AA no fígado e baço aumentou com o aumento do nível de suplementação alimentar, atingindo valores próximos de 55 e 70 µg de AA/g de tecido, respectivamente. As douradas alimentadas com 100 e 200 mg AA/Kg de dieta apresentavam concentrações em AA no fígado e no baço significativamente mais altas do que os outros grupos, e as douradas alimentadas com 50 mg/Kg alimento apresentavam uma concentração de AA hepático significativamente

maior do que os peixes alimentados sem AA. O IHS não se modificou significativamente com o nível de AA alimentar, embora se observe uma tendência para este parâmetro diminuir com o aumento de AA no alimento. A glicemia apresentava-se significativamente aumentada nos peixes alimentados sem suplemento de AA, quando comparada com os outros grupos. No entanto, não se observou qualquer diferença significativa na concentração plasmática de cortisol entre os diferentes tratamentos.

Tabela 3.4. Variação dos níveis de AA no fígado e baço, da glicemia, do cortisol plasmático e do IHS em douradas alimentadas com diferentes níveis de AA ($n \geq 7$; 12 semanas; 26°C; saciedade)

	Nível de AA/Kg Alimento				
	0	25	50	100	200
Ascorbato ($\mu\text{g/g}$)					
Fígado	3.5±0.81 ^a	12.6±1.83 ^{ab}	24.6±3.54 ^b	39.4±5.39 ^c	53.6±4.80 ^c
Baço	0.5±0.35 ^a	8.8±3.15 ^a	17.5±1.89 ^a	53.8±11.99 ^b	67.0±12.23 ^b
IHS	0.96±0.06	0.90±0.08	0.85±0.07	0.84±0.07	0.75±0.04
Plasma					
Glucose (mg/100 ml)	116.7±9.2 ^b	81.5±4.7 ^a	78.1±5.6 ^a	83.5±7.8 ^a	85.0±5.3 ^a
Cortisol ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	53.80±13.14	87.89±25.32	43.02±13.12	40.49±6.19	29.38±8.76

Médias \pm EP na mesma linha com expoentes diferentes são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

A Tabela 3.5 mostra as concentrações em AA no fígado e baço durante a exposição das douradas a hipóxia aguda. Os valores de AA hepático não sofreram alterações significativas durante a exposição ao stress, em qualquer dos grupos experimentais. O AA no baço só variou significativamente nos peixes alimentados com 25 e 200 mg AA/Kg alimento após 6h de stress (250 e 208% respectivamente), quando comparado com os valores iniciais. O baço dos peixes alimentados com 200 mg AA/Kg alimento apresentava um nível ainda significativamente mais elevado (252%) do que o valor inicial, depois de 9h de hipóxia aguda.

Tabela 3.5. Níveis de AA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no fígado e baço de douradas alimentadas com diferentes níveis de AA, durante a exposição a stress de hipóxia aguda ($n \geq 7$, 26°C , $\text{OD} \approx 1.2 \text{ mg/l}$).

AA(mg/Kg Alimento)		Tempo de hipóxia (h)				
		0	3	6	9	24
0	Fígado	3.5±0.81	2.7±0.56	3.1±0.27	3.0±0.47	3.5±0.38
	Baço	0.5±0.35	0.7±0.50	1.8±0.85	2.4±0.78	3.4±1.30
25	Fígado	12.6±1.83	10.6±0.34	11.8±3.03	11.8±1.17	7.3±0.79
	Baço	8.8±3.15 ^a	7.5±2.18 ^a	22.0±5.81 ^b	14.4±2.51 ^{ab}	6.5±2.75 ^a
50	Fígado	24.6±3.54	25.2±4.63	33.1±6.27	23.3±3.55	32.4±4.95
	Baço	17.5±1.89	28.7±4.41	16.9±4.60	35.4±5.97	36.8±10.39
100	Fígado	39.4±5.39	36.8±2.44	40.4±2.81	38.6±1.48	34.8±4.72
	Baço	53.8±11.99	48.9±6.52	71.3±8.50	91.8±17.29	91.0±14.04
200	Fígado	53.6±4.80	47.7±4.12	62.9±6.71	47.1±5.40	48.0±4.05
	Baço	67.0±12.2 ^a	87.8±14.7 ^{ab}	139.4±23.0 ^{bc}	168.5±21.6 ^c	48.6±10.15 ^a

Médias \pm EP na mesma linha com expoentes diferentes são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

As concentrações plasmáticas de cortisol apresentaram uma grande variabilidade, o que dificultou a análise e interpretação dos resultados. A hipóxia aguda pareceu não afectar significativamente a concentração plasmática de cortisol ao longo do tempo de exposição ao stress nos vários grupos, excepto nas douradas alimentadas com 100 mg AA/Kg alimento (Fig. 3.2) Este último grupo apresentava uma descida significativa do nível de cortisol, ao fim de 9h de stress, quando comparado com o valor obtido ao fim de 24h de exposição. Também é de referir o facto de os peixes alimentados com 25 mg AA/Kg alimento apresentarem às 0 e 3h de hipóxia valores de cortisol médios superiores aos restantes grupos, os quais não eram significativamente diferentes dos demais devido à grande variabilidade que apresentavam. Esta pode ser o resultado de uma menor rapidez na colecção de sangue (factor de elevada importancia) neste grupo.

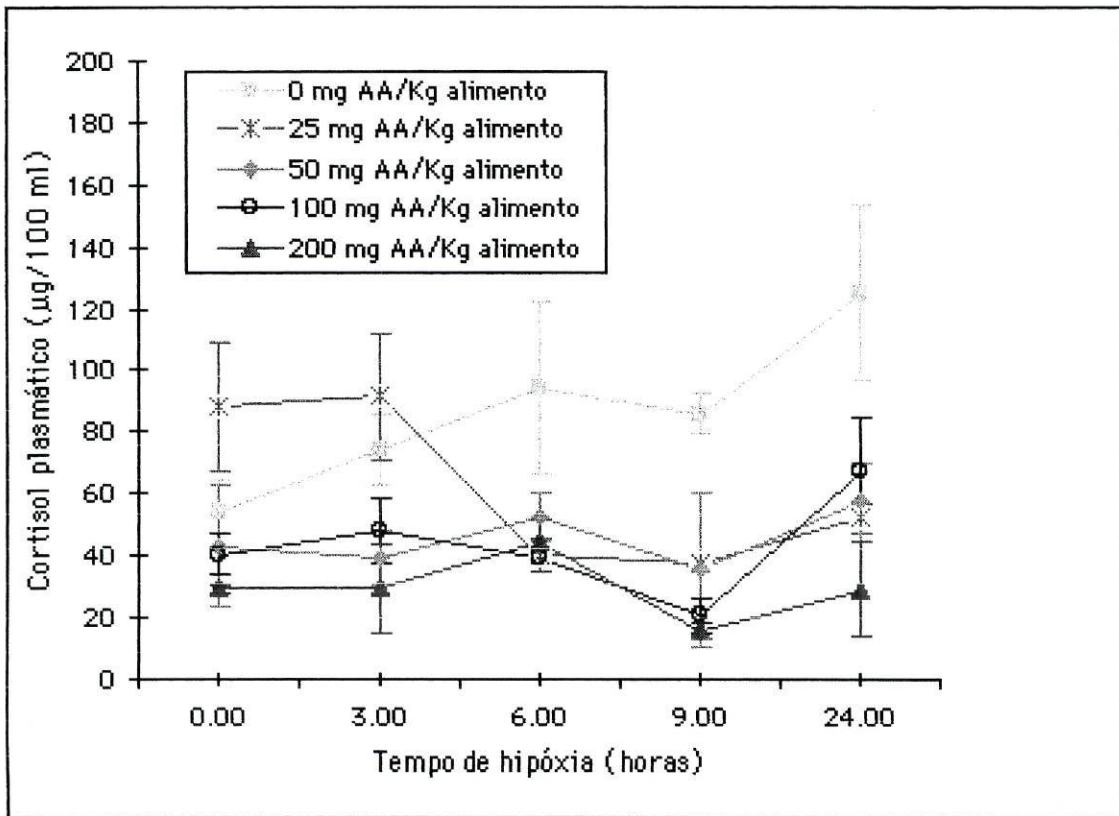


Fig 3.2. Níveis plasmáticos de cortisol, durante a exposição a hipóxia aguda, de douradas alimentadas com diferentes concentrações de AA.

No que respeita às variações do cortisol no mesmo intervalo de tempo, entre os grupos alimentados com os diferentes alimentos, a mesma figura mostra que, depois de 9h de hipóxia aguda, o grupo alimentado sem suplementação em AA apresentava uma concentração de cortisol plasmático significativamente superior à dos restantes grupos. Ao fim de 24h de hipóxia, o nível de cortisol do grupo alimentado sem AA continuava significativamente mais elevado do que o do grupo alimentado com 200 mg AA/Kg alimento. Refira-se, também, que os peixes alimentados com o alimento sem AA, mostraram uma maior variação dos níveis de cortisol plasmático do que os restantes grupos.

Ao fim de 3h de exposição a hipóxia aguda, todos os grupos apresentavam uma glicemia significativamente mais elevada ($P < 0.01$) do que antes do stress ser iniciado (Fig. 3.3). O grupo alimentado sem suplementação em AA apresentava uma glicemia significativamente mais elevada, após 3h de stress, do que os grupos alimentados com os restantes alimentos. Ao fim de 6h de hipóxia, este mesmo grupo tinha uma glicémia significativamente inferior ao nível inicial

e ao apresentado ao fim de 3h, o qual subiu gradualmente até atingir o valor inicial. As douradas alimentadas com 50 mg AA/Kg alimento apresentaram um segundo pico de glucose ao fim de 9h de stress, mas após as 24h de stress o seu valor tinha voltado ao normal.

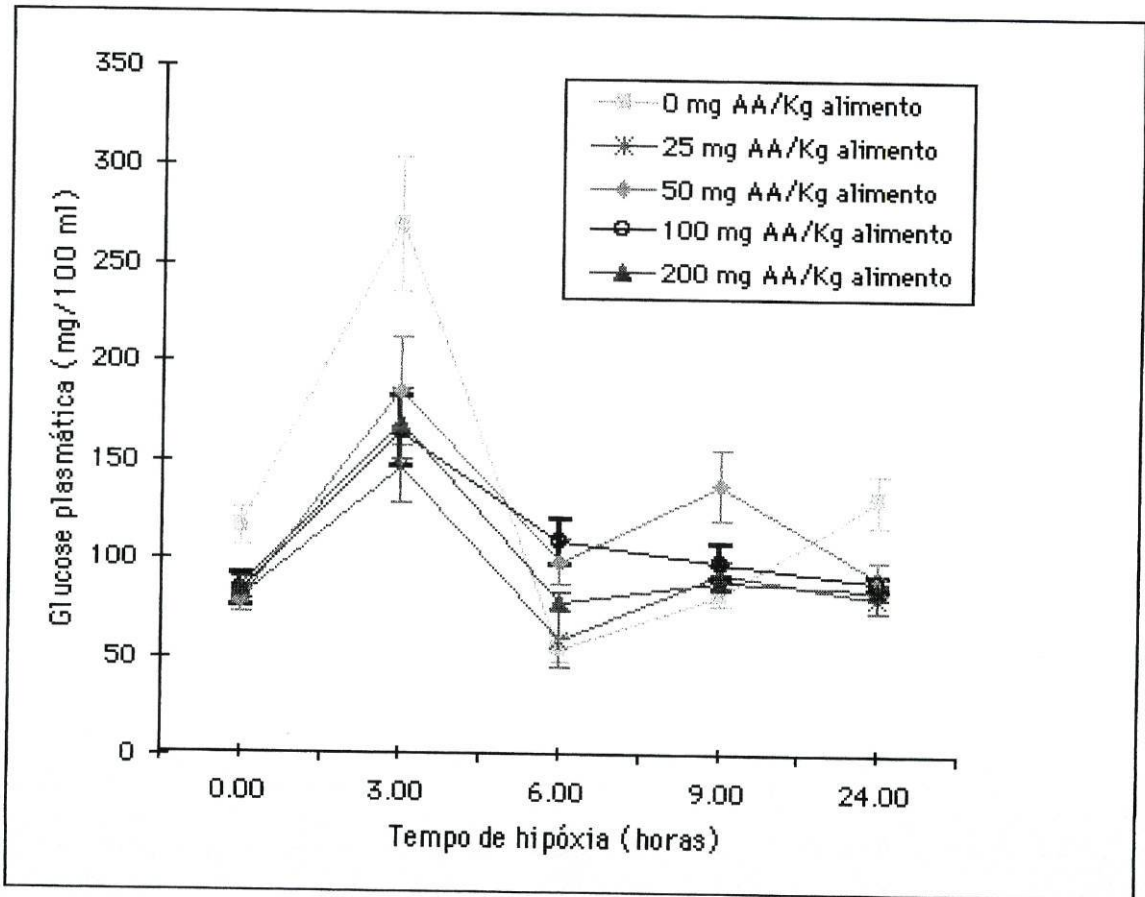


Fig. 3.3. Concentração plasmática da glucose de douradas alimentadas com diferentes níveis de AA, durante o stress de hipóxia.

3.4. DISCUSSAO

Depois de 12 semanas, os grupos de douradas alimentadas com os diferentes níveis de suplementação em AA não apresentaram diferenças significativas no crescimento, nem nenhum deles mostrava sinais nem sintomas de deficiência desta vitamina, tais como cataratas e deformações da coluna vertebral e do crâneo. No entanto, outros autores relatam resultados diferentes. Ishibashi *et al.* (1992a) observou redução de crescimento e sinais de deficiência em juvenis de peixe-papagaio Japonês, *Oplegnathus fasciatus*, alimentados com um alimento purificado sem AA durante 8 semanas. Mahajan *et al.* (1979) obtiveram resultados similares

em *Channa punctatus*, o qual mostrou um decréscimo de crescimento após 2 meses de alimentação com um alimento purificado sem AA. Resultados semelhantes foram descritos para o linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) (Teshima *et al.*, 1993), o peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Lim *et al.*, 1978; Wilson *et al.*, 1989), a truta arco-íris (Sato *et al.*, 1978), o salmão coho (Halver *et al.*, 1969) e a tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (Shiau & Jan, 1992; Shiau & Hsu, 1995).

A inexistência de diferenças significativas de crescimento, verificada neste estudo, não pode ser atribuída à existência de AA em quantidade significativa nos ingredientes que constituem o alimento. Isto porque, os órgãos estudados (fígado e baço) dos peixes alimentados com o alimento sem suplemento de AA, têm concentrações extremamente baixas (Tabela 3.5) desta vitamina. No entanto, é provável que as douradas tivessem um nível inicial de AA armazenado nos tecidos suficientemente elevado para permitir a manutenção das funções fisiológicas normais durante o período experimental.

Ligeiras alterações no IHS foram observadas durante o stress, sendo estas mais evidentes nas douradas alimentadas com o alimento não suplementado. Estas alterações não são, no entanto, significativas e podem ser explicadas por alterações transitórias do fluxo sanguíneo do fígado, como consequência da resposta fisiológica ao stress.

No presente estudo, as concentrações em AA no fígado e baço da dourada reflectem os níveis alimentares de suplementação. O mesmo tipo de resultado foi obtido por diversos autores em diferentes espécies de peixes (Boonyaratpalin *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1993; Dabrowski *et al.*, 1990; Lim & Lovell, 1978; Sato *et al.*, 1978; Shiau & Hsu, 1995; Thompson *et al.*, 1993). O conteúdo do fígado em AA dos peixes é, geralmente, considerado com um indicador do seu estado nutricional, em termos de AA (Gabaudan *et al.*, 1992; Sandnes & Waagbø, 1991; White *et al.*, 1993) e tem sido descrito com um indicador fisiológico de stress (Wedemeyer & Yasutake, 1977; Wedemeyer & McLeay, 1981; Thomas, 1990; Thomas *et al.*, 1982). No

entanto, no presente estudo, a exposição da dourada a stress de hipóxia aguda, por um período de 24 h, não revelou nenhuma alteração relevante do conteúdo hepático em AA. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores efectuadas em dourada exposta a um ambiente hipossalino durante 24 h (Henrique *et al.*, 1996), embora o mesmo estudo tenha evidenciado um decréscimo significativo deste parâmetro quando a dourada era submetida a stress de baixa profundidade de água no tanque durante 3 h. Também Gouillou-Coustans & Guillaume (1993) em rodovalho (*Scophthalmus maximus*) sujeito a um factor de stress não específico por um longo período, não observaram qualquer alteração significativa, ao longo do tempo, da concentração hepática em AA. Thomas *et al.* (1982) verificou uma diminuição do teor em AA no fígado do mugem exposto a elevadas concentrações de cádmio (stress de poluição). Mais tarde, o mesmo autor (Thomas, 1984), num estudo envolvendo a mesma espécie mas utilizando, desta vez, factores de stress ambiental não obteve alterações crónicas significativas do AA do fígado. Como consequência destes resultados, Thomas (1984) formulou a hipótese de o teor em AA do fígado não ser provavelmente afectado por factores de stress ambientais físicos. O presente estudo sugere o mesmo tipo de relação, isto é, que o envolvimento do AA hepático na resposta fisiológica ao stress dependo do tipo de stress ao qual os peixes são sujeitos.

Por outro lado, algumas alterações significativas da concentração de AA no baço durante a exposição ao stress foram encontradas. Após 6 h de exposição a hipóxia aguda, as douradas alimentadas com 25 e 200 mg AA/Kg alimento apresentavam níveis de AA no baço significativamente superiores aos níveis iniciais (anteriores ao início do stress). Resultados semelhantes foram observados por Henrique *et al.* (1996) em *Sparus aurata*. Foi, então, posta a hipótese, agora mais sustentada pelos resultados deste estudo, de que os aumentos nos níveis de AA no baço serem devidos a fenómenos de sequestro e libertação de leucócitos (as células com a concentração de AA mais elevada do organismo) por parte do baço. Segundo Bender (1992), os leucócitos humanos possuem uma grande capacidade de acumulação de AA. Apesar de tal não estar confirmado nos peixes, é razoável admitir o mesmo tipo de comportamento por parte dos

leucócitos destes. Também se evidenciou que os leucócitos dos teleosteos se acumulam no baço, entre outros órgãos, por períodos transitórios de tempo (Ellis & de Sousa, 1974), bem como o stress provoca linfocitopenia (Ellis, 1981). Uma vez que a linfocitopenia nos mamíferos é devida ao sequestro de linfócitos T circulantes pela medula óssea e pelos nódulos linfáticos (Pearson *et al.*, 1978), é possível prever a existência de um mecanismo semelhante nos peixes, sendo, neste caso os linfócitos sequestrados pelo baço, já que estes não possuem medula óssea.

Os níveis de cortisol e glucose plasmáticos são geralmente usados como indicadores de resposta primária e secundária ao stress, respectivamente, sendo muito usados como indicadores para determinar a duração e severidade do stress (Carmichael *et al.*, 1984; Flos *et al.*, 1988; Henrique *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1992; Hunn *et al.*, 1991; Mazeaud *et al.*, 1977; McDonald *et al.*, 1993a; McDonald & Robinson, 1993b; Thomas *et al.*, 1980; Thomas & Robertson, 1991; Wedemeyer & McLeay, 1981; Wedemeyer & Yasutake, 1977). Durante a exposição à hipoxia aguda não se verificaram alterações significativas da concentração plasmática de cortisol, excepto no caso dos peixes alimentados com 100 mg AA/Kg alimento, os quais apresentavam concentrações de cortisol significativamente mais baixas ao fim de 9 h de stress do que após 24 h de hipoxia. A não observação de picos de cortisol foi, provavelmente, devida ao facto de o primeiro intervalo ser demasiado grande, pois o pico de cortisol aparece antes do pico de glicémia, acontecendo por vezes que, quando este último é observado, já o nível de cortisol baixou (Sandnes & Waagbø, 1991). Barton *et al.* (1988) mostraram em salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) que o cortisol aumentava significativamente 1h após stress de manuseamento aplicado durante 30 seg., baixando novamente ao fim de 3h. De facto, Leach & Taylor, 1980 sugeriram que os níveis de cortisol plasmático do *Fundulus heteroclitus* funcionam durante o stress para sustentar a elevação da glicémia. Se esta hipótese for real para as restantes espécies de peixe, não poderiam ser encontrados picos de cortisol nos restantes intervalos de tempo de hipoxia no presente estudo, dado que a partir das 6 h de stress os valores regressaram ao valor inicial e assim se mantiveram até ao final.

Os peixes alimentados com o alimento não suplementado com AA mostraram uma tendência para aumentarem a concentração de cortisol plasmático com a exposição à hipóxia e, ao fim de 9 h apresentavam valores significativamente superiores de cortisol do que as douradas alimentadas com qualquer dos outros alimentados. Depois de 24 h de stress os primeiros apresentavam valores de cortisol ainda superiores aos dos peixes alimentados com 200 mg AA/Kg alimento. Estes resultados sugerem uma melhor regulação da concentração do cortisol plasmático por parte dos peixes alimentados com suplementação de AA, quando comparados com os alimentados com alimento não suplementado, apontando para a existência de um papel do AA no metabolismo das hormonas corticosteroides. De facto, os peixes alimentados com 0 mg AA/Kg alimento mostraram uma maior variação deste parâmetro e os peixes alimentados com 200 mg AA/Kg alimento aparentam estar mais protegidos contra o stress, dado apresentarem o valor mais baixo de cortisol. É ainda de salientar o facto de as concentrações de cortisol em repouso observadas neste estudo serem muito elevadas (30 a 65 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) quando comparadas com os valores obtidos noutras espécies, especialmente salmonídeos, sendo encontrados valores semelhante apenas no robalo (Planas *et al.*, 1990).

A Tabela 3.4 mostra que as douradas alimentadas com o alimento não suplementado com AA têm uma glicemia, em repouso, significativamente mais elevada do que as douradas alimentadas com suplementação de AA. Este primeiro grupo também mostra maior variação deste parâmetro ao longo do período de exposição à hipóxia (Fig. 3.3), apresentando, ao fim de 24 h de stress, o mesmo valor inicial de glicemia, o qual é, novamente, significativamente mais elevado do que o dos restantes grupos ($P < 0.01$). Estes resultados contradizem a hipótese de este grupo ter sido sujeito a uma qualquer forma de stress antes do início do período de hipóxia, apontando, antes, para os valores inicial e final de glicemia como sendo os níveis normais. Este resultados sugerem a existência de uma interferência do AA no metabolismo da glucose. Não foram encontrados quaisquer resultados semelhantes em trabalhos relacionados com stress e AA de outros autores nesta ou noutras espécies de peixe. Desta forma, os resultados obtidos

necessitam de investigação mais aprofundada. A observação da elevação significativa da glicemia (hiperglicemia) ao fim de 3h de hipóxia, demonstrou que esta foi, de facto, uma condição stressante para a dourada.

Em conclusão, a hipóxia aguda actuou como um factor de stress (indução de hiperglicemia), mas não mostrou ter qualquer influência nas reservas de AA do fígado e baço. A ausência de suplementação em AA apontou, no entanto, para a existência de um papel deste no metabolismo da glucose, ao produzir nos peixes alimentados sem suplementação uma hiperglicemia independente da acção de stress.

4. EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO ALIMENTAR E DO STRESS DE HIPÓXIA INTERMITENTE NO CRESCIMENTO E NAS RESERVAS DE VITAMINA C DA DOURADA

4.1. INTRODUÇÃO

Os peixes marinhos e de água doce aparentam ter predisposição para a deficiência em AA, caso esta vitamina não seja incluída na sua alimentação (Alexis *et al.*, 1997; Boonyaratpalin, *et al.*, 1992; Coustans *et al.*, 1990; Dabrowski *et al.*, 1996b; Eya, 1996; Kitamura *et al.*, 1965; Lim & Lovell, 1978; Martins, 1995; Martins *et al.*, 1995). Ao contrário da maior parte dos vertebrados superiores, a maior parte dos peixes é incapaz de biosintetizar ácido ascórbico. O síndrome de deficiência em AA nos peixes foi descrito inicialmente por Kitamura *et al.* (1965), que mostrou ser similar ao escorbuto dos vertebrados superiores que não fazem a biossíntese desta vitamina, como é o caso dos humanos.

O AA actua como um agente antioxidante e está primariamente envolvido na produção de colagéneo. Também actua como co-factor em muitas reacções de hidroxilação e tem um papel importante na biossíntese da carnitina, norepinefrina e certos peptidos neuroendócrinos. Deste modo, o fornecimento alimentar inadequado desta vitamina aos peixes resulta em diminuição do crescimento, alterações histopatológicas principalmente relacionadas com a debilitação da síntese do colagéneo (Halver, 1972; Wilson *et al.*, 1973). No entanto, os requisitos alimentares de AA podem depender da idade, do tamanho e da taxa de crescimento do peixe, diminuindo com o aumento da idade e do tamanho do peixe e aumentando com o aumento da taxa de crescimento (Dabrowski *et al.*, 1993; Hilton *et al.*, 1978), bem como de outros compostos tais como o cálcio, o ferro e os metais pesados (Hilton, 1984), stress e condições sanitárias de cultura. Alguns autores demonstraram que peixes alimentados com alimentos sem suplementação de AA apresentavam funções imunes alteradas quando na presença de organismos patogénicos (Schwager *et al.*, 1998; Verlhac *et al.*, 1992).

Em relação ao papel do AA na resposta fisiológica ao stress e à alteração dos seus requisitos quando os peixes estão sujeitos a factores de stress, os resultados apresentados na bibliografia não são concordantes. Os primeiros estudos evidenciaram a existência de uma depleção das reservas de AA no fígado e rim como resposta ao stress (Thomas *et al.*, 1982; Wedemeyer, 1969). No entanto, estudos mais recentes não evidenciaram tal depleção em peixes expostos a factores de stress (Gouillou-Coustans & Guillaume, 1993; Li *et al.*, 1993). No que respeita ao stress de hipóxia, a autora não encontrou diferenças significativas na concentração de AA do fígado da dourada antes, durante e após a exposição a hipóxia aguda durante 24 h, apesar de existirem flutuações temporais deste parâmetro (Capítulo 3).

O objectivo do presente estudo é avaliar o efeito do nível de suplementação alimentar em AA na performance do crescimento e nas reservas de AA da dourada exposta a stress intermitente. Este estudo vem no seguimento do anterior e pretende, por um lado, aproximar cada vez mais o nível de suplementação em AA aos requisitos reais e, por outro lado, verificar se o aumento da intensidade do stress de hipóxia porá, então, em evidencia um possível papel do AA na resposta fisiológica da dourada ao stress de hipóxia.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de dourada com um peso médio de $1,5 \pm 0,3$ g foram obtidos numa maternidade comercial (Tinamenor, Espanha). Grupos de 68 peixes foram pesados e distribuídos por 18 tanque de fibra de vidro com uma capacidade de 300 l, os quais são parte integrante de um sistema semi-fechado (100% renovação da água/ dia - Fig. 4.1), e mantidos a 23°C com um fotoperíodo de 12 h dia/12 h noite.

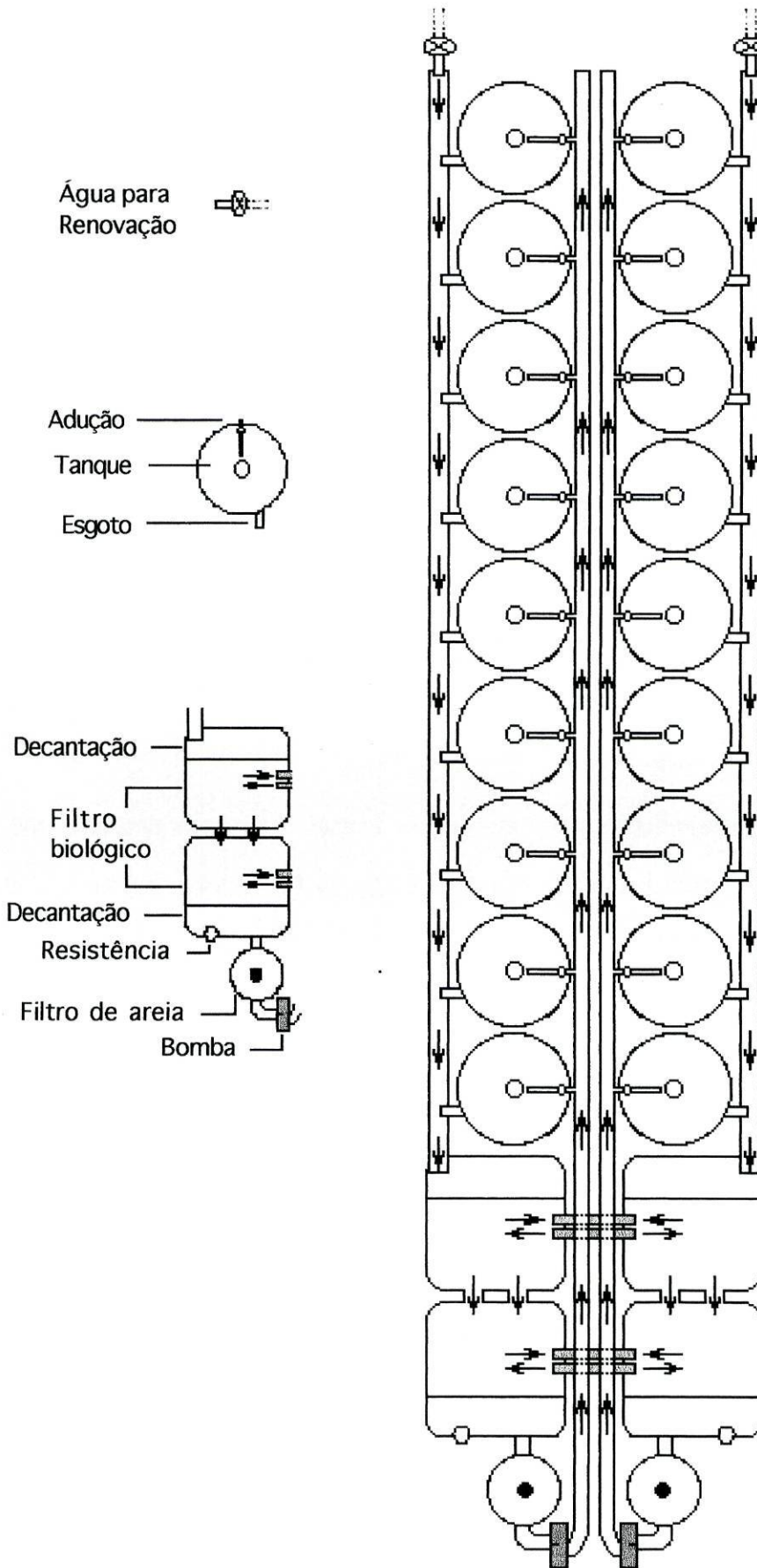


Fig. 4.1 . Esquema do sistema experimental utilizado no estudo da influência do ácido ascórbico na resposta à hipóxia aguda.

O alimento base foi formulado de acordo com os requisitos estimados para o crescimento normal da dourada, como indicado no Capítulo 2 (Tabela 2.1), sendo este fabricado com um premix vitamínico sem AA, sendo este adicionado em diferentes quantidades aos vários alimentos experimentais. A partir deste alimento base, foram feitos 3 alimentos experimentais com as seguintes concentrações de AA: 0, 50 e 100 AAeq/Kg alimento, usando AA protegido sob a forma polifosfatada (Rovimix Stay-C 25, Hoffman La Roche, Suíça). Depois de granulados, os alimentos foram armazenados a 4°C durante todo o período experimental.

Cada um dos alimentos experimentais foi distribuído manualmente até à saciedade, 3 vezes por dia, a seis grupos de peixes: 3 grupos control e 3 grupos de stress de hipóxia intermitente. Uma vez por semana, num dia ao acaso e após a última distribuição de alimento, os grupos stress alimentados com os diferentes alimentos foram sujeitos a hipóxia, enquanto os grupos control foram mantidos em normóxia. A hipóxia foi produzida pela paragem da adução de água ao tanque e pela redução simultânea da aerificação. Uma vez atingido o valor de 25 % de saturação de OD, o fornecimento de água e ar foram restabelecidos, permitindo a normalização do OD.

No início, após 4, 8, 12 e 13 semanas de experiência os peixes foram pesados, procedendo-se nesse momento a uma limpeza mais profunda dos tanques e do sistema em geral. Na semana 10 e 12 da experiência procedeu-se à ministração de um tratamento anti-parasítico usando, para o efeito, triclorfão (Neguvon, Bayer) a uma concentração de 10 ppm durante 1 h. Estes tratamentos foram efectuados devido ao facto de ter sido detectada a presença do parasita branquial *Diplectanum aequans*, o qual se manifestou através de um aumento da mortalidade dos peixes alimentados com o alimento não suplementado com AA. Ao fim de 13 semanas de experiência e devido ao reaparecimento das mortalidades bem como ao desenvolvimento de sintomas de escorbuto nas douradas alimentadas sem suplementação de AA, o estudo foi interrompido. Neste momento, tal como já tinha sido feito no início da experiência, foi recolhido um grupo de 5 peixes de cada tanque para se efectuar as análises de composição corporal.

Também foram recolhidos fígado, rim anterior e baço de outros 5 peixes de cada tanque para análise do seu conteúdo em AA.

A composição corporal e as análises químicas dos alimentos foram determinadas conforme o descrito pelo AOAC (1983) e que se encontra descrito no capítulo 2. Para medir o teor em AA nos tecidos recolhidos, estes foram homogeneizados em HPO₃ a 5%, conforme o descrito no capítulo 2, sendo depois utilizado o método de Bourgeois *et al.* (1989).

Os dados recolhidos foram analisados utilizando a ANOVA a 2 factores para determinar o efeito dos tratamentos (teor de AA no alimento e stress de hipóxia), seguida de contraste *à posteriori* com o teste de comparação múltipla de Tukey (Tukey, 1949).

4.3 RESULTADOS

A análise química dos alimentos experimentais não revela a existência de diferenças significativas na sua composição (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Composição química dos alimentos experimentais.

	Nível de AA/Kg Alimento		
	0	50	100
Matéria Seca (%)	93.0	93.0	92.7
Proteína Bruta (Nx6.25, % MS)	46.4	46.5	46.5
Gordura Bruta (% MS)	13.0	13.2	13.1
Energia Bruta (kj/g MS)	20.3	20.3	20.2
Cinzas (% MS)	10.6	10.5	10.8

Tabela 4.2. Parâmetros de crescimento, de eficiência alimentar, sobrevivência e composição das carcaças de dourada alimentada com diferentes níveis de AA (n=15; 13 semanas; 23°C; saciedade).

	Nível de AA/Kg Alimento										ANOVA*
	0		50		100		100		100		
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	
PMI (g)	1.42±0.08	1.49±0.05	1.43±0.03	1.42±0.02	1.45±0.04	1.45±0.05					
PMF (g)	20.6±0.77 ^a	19.3±0.90 ^a	27.3±0.78 ^b	26.9±0.85 ^b	29.7±0.68 ^b	28.2±1.13 ^b	X				
TCE	2.94±0.06 ^a	2.8±0.02 ^a	3.24±0.02 ^b	3.25±0.05 ^b	3.32±0.03 ^b	3.26±0.06 ^b	X				
ICA	1.51±0.09	1.50±0.07	1.32±0.02	1.34±0.01	1.28±0.01	1.30±0.00					
CEP	1.43±0.08 ^a	1.45±0.07 ^a	1.63±0.03 ^b	1.60±0.03 ^b	1.68±0.02 ^b	1.66±0.00 ^b	X				
Sobrevivência (%)	45.1±13.33 ^a	60.3±6.95 ^a	92.7±2.25 ^b	88.2±0.85 ^b	93.6±1.96 ^b	90.2±3.21 ^b	X				
MS (%)	32.4	32.8	33.1	33.3	32.6	32.4					
Proteína (% MS)	51.6	51.4	52.9	52.2	51.9	52.3					
Gordura (% MS)	31.7	31.5	32.2	32.5	31.9	32.0					
Cinzas (% MS)	11.9	11.8	11.5	11.7	12.1	11.9					

Médias ± Erro Padrão (EP) na mesma linha com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P < 0.05).

* X- Efeito significativo no teor em AA no alimento; Y- Efeito significativo do stress; Z- Efeito significativo da interação entre o teor em AA no alimento e o stress.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos no que respeita ao crescimento, sobrevivência. O PMF, a TCE e o CEP eram significativamente menores nos peixes alimentados com o alimento deficiente em AA, quando comparados com os peixes alimentados com os alimentos suplementados com AA. No entanto, não se verificou qualquer efeito do stress de hipóxia sobre estes parâmetros. A Tabela 4.2 mostra ainda a composição corporal das douradas sujeitas aos diferentes tratamentos. Como se pode observar, nem o nível de suplementação alimentar de AA nem o stress de hipóxia alteraram significativamente a composição corporal das douradas.

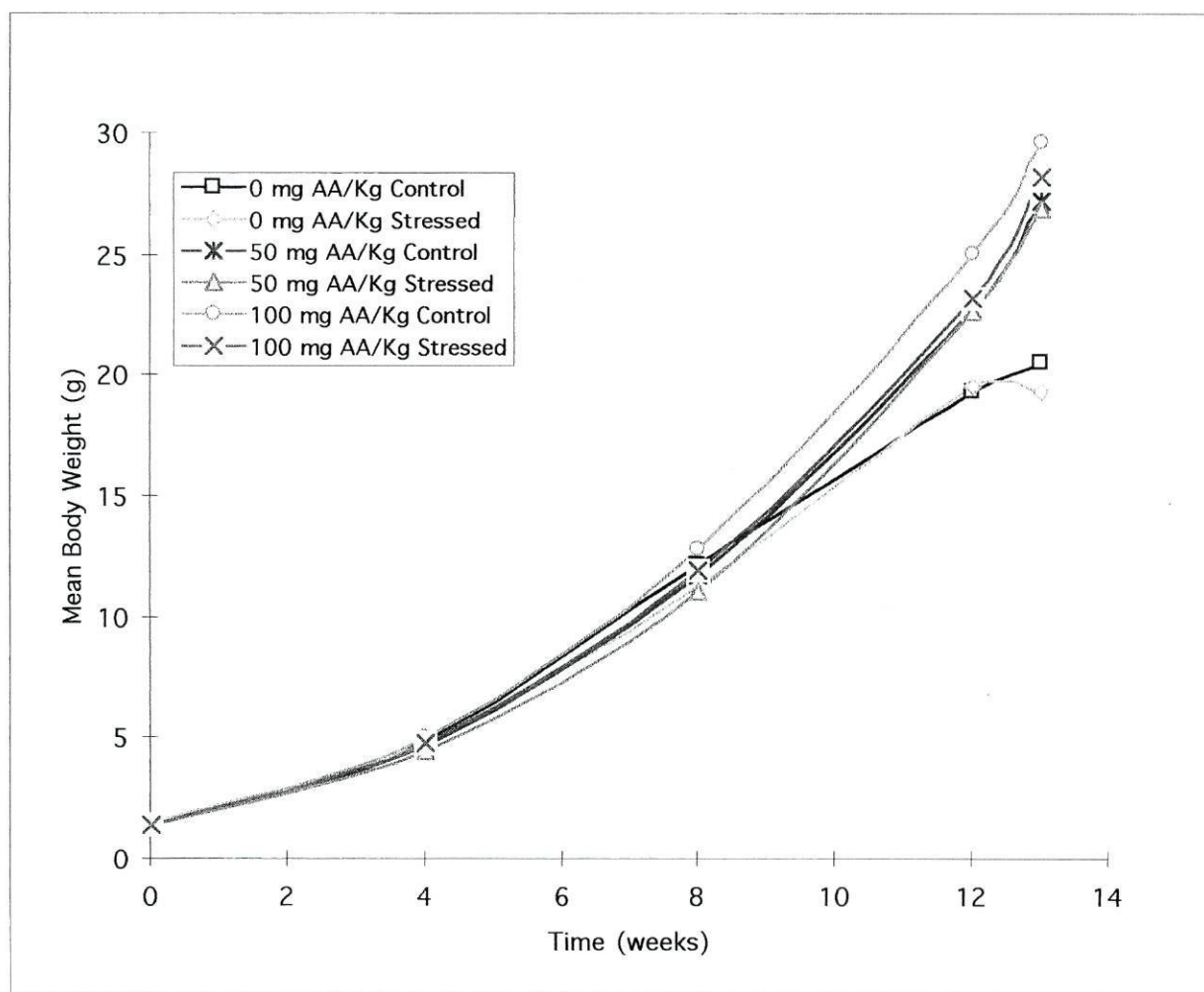


Fig. 4.2. Crescimento de dourada alimentada com diferentes níveis de suplementação de AA e sujeitas a stress de hipóxia intermitente.

As curvas de crescimento (Fig. 4.2) mostram que as douradas alimentadas com o alimento deficiente em AA começaram a diminuir o seu crescimento após 10 semanas de experiência, mas esta diferença só se tornou significativa ao fim das 13 semanas de

crescimento. Entre as 12 e as 13 semanas o crescimento dos peixes alimentados sem AA do grupo control quase parou e o do grupo stress mostrou mesmo uma ligeira perda, não significativa, do PMF. Esta figura mostra também uma tendência do grupo control alimentado com 100 mg AA eq/Kg de alimento para ter um crescimento superior ao dos outros grupos alimentados com AA, embora este resultado não seja significativo.

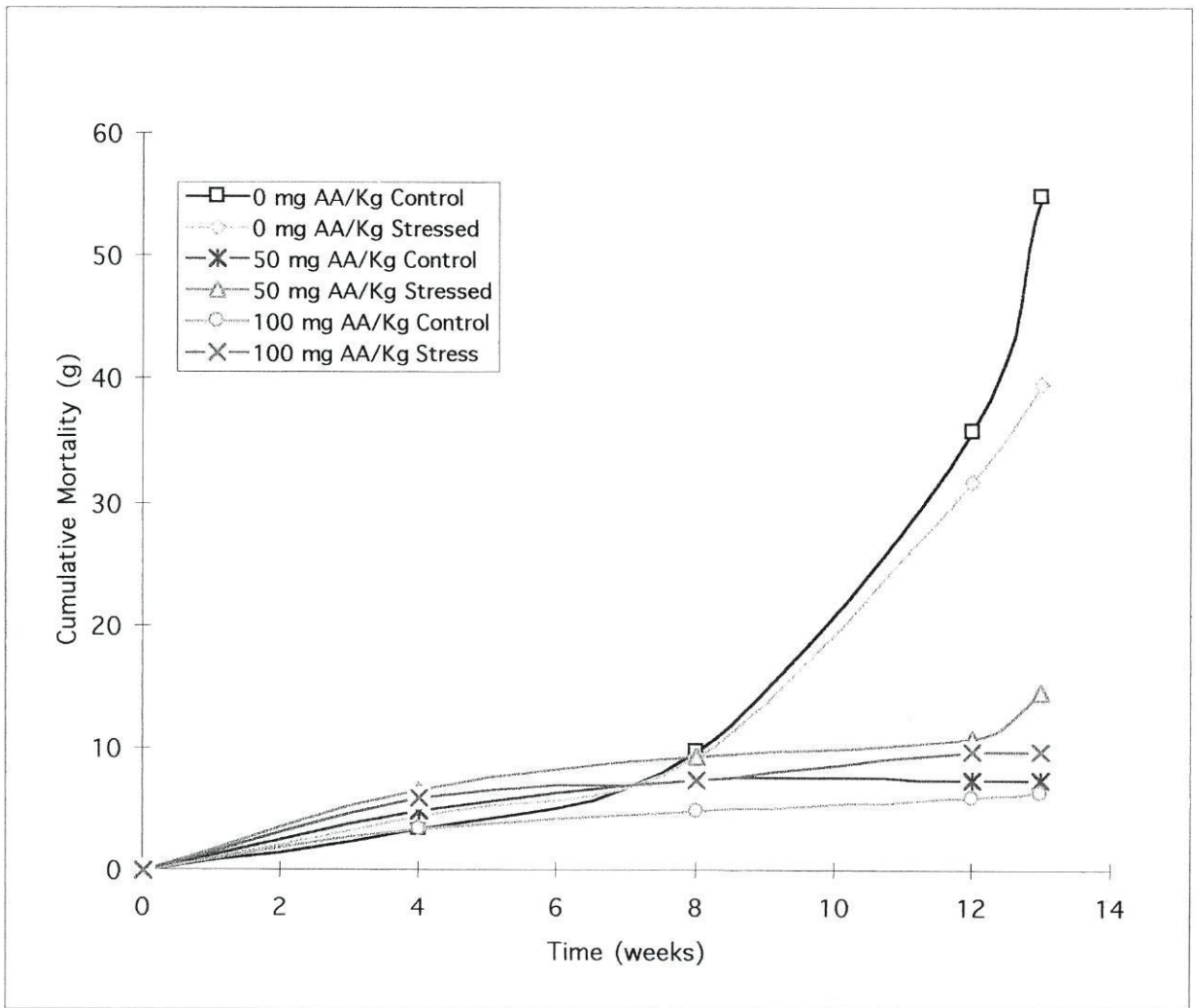


Fig. 4.3. Mortalidade cumulativa de dourada alimentada com diferentes níveis de suplementação de AA e sujeitas a stress de hipóxia intermitente.

A Tabela 4.2 mostra, também, a existência de um aumento significativo da mortalidade nos grupos control e stress alimentados sem suplementação de AA, comparada com os restantes grupos. Apesar de o grupo stress alimentado sem AA ter uma mortalidade inferior ao respectivo control, esta diferença não é significativa, devendo-se ao facto de um dos tanques control apresentar uma mortalidade muito elevada em comparação com os outros 2 tanques. Caso o valor

de mortalidade deste tanque não fosse utilizado para os cálculos, sendo considerado como um valor extremo (“outsider”), a taxa de mortalidade seria idêntica para ambos os grupos, control e stress.

A Fig. 4.3 mostra a mortalidade cumulativa dos vários grupos experimentais, evidenciando um aumento deste parâmetro, tanto no grupo control como no grupo stress alimentados com o alimento sem suplementação de AA, entre as 8 e as 12 semanas, aumento esse que continuou durante a 13ª semana de ensaio, como se pode verificar pela análise dos gráficos da mortalidade não cumulativa (Fig. 4.4). O aumento de mortalidade nos dois grupos supracitados, teve início na 9ª semana de experiência, altura em que se procedeu à amostragem de alguns animais moribundos para se proceder a um estudo patológico para identificar o agente responsável pelo aumento da mortalidade. Neste estudo foi encontrado apenas um parasita branquial, positivamente identificado como sendo o *Diplectanum aequans* (Monogenea). Neste momento, os peixes alimentados sem AA não apresentavam quaisquer sinais de escorbuto. Dado que o circuito experimental era semi-fechado (com recirculação), concluiu-se que este estaria todocontaminado, desde os tanques de crescimento aos filtros, pelo que foi decidido proceder-se à ministração de um banho terapêutico com triclorfão (10 ppm durante 1h - Neguvon, Bayer), o qual teve lugar no início da 10ª semana, resultando numa diminuição da mortalidade nos grupos afectados. No entanto, ao fim das 12 semanas de ensaio e após a pesagem dos peixes, a mortalidade voltou a aumentar nos grupos alimentados sem suplementação de AA, continuando estável nos restantes grupos, apesar de ter sido ministrado mais um banho com triclorfão após a pesagem. Também, durante a 13ª semana estes mesmos grupos começaram a mostrar sinais de escorbuto, tais como cataratas, erosão das barbatanas e perda de apetite. Optou-se então pela paragem do estudo.

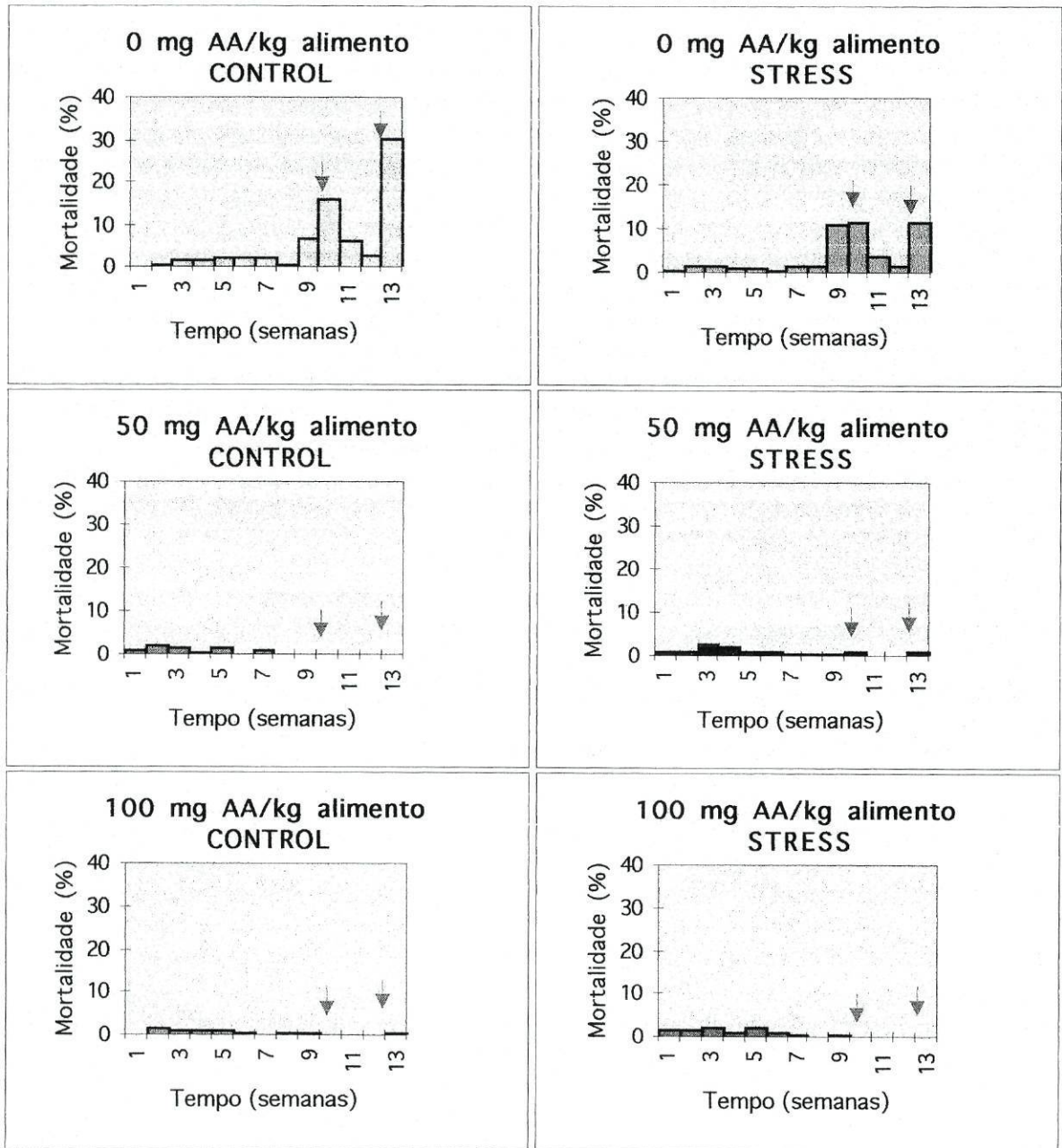


Fig. 4.4. Mortalidade não cumulativa da dourada alimentada com diferentes níveis de suplementação em AA e sujeitas a stress de hipóxia intermitente. ▼ - Tratamento anti parasitário (triclorfão: 10 ppm durante 1h).

As concentrações em AA no fígado, rim cefálico e baço reflectem o nível alimentar desta vitamina (Tabela 4.3). O rim cefálico foi o órgão que apresentou a concentração mais elevada de AA, comparada com os outros órgãos para um mesmo nível alimentar de AA, sendo esta diferença mais evidente nos peixes alimentados com 100 mg AA/Kg alimento. No caso dos peixes alimentados sem suplementação de AA a concentração de AA no rim cefálico e no baço não era detectável devido a esta ser muito baixa e ao facto de estes dois órgãos serem demasiado pequenos

para permitirem uma amostra mais concentrada, como aconteceu com o fígado. Os grupos stress e control alimentados com o mesmo nível de AA não apresentaram diferenças significativas na concentração de AA nos vários órgãos, apesar de os primeiros apresentarem sempre valores ligeiramente mais baixos do que os segundos.

Tabela 4.3. Efeito do nível de suplementação em AA e do stress de hipoxia intermitente na concentração de AA no fígado, rim cefálico e baço (n=15; 13 semanas; 23°C; saciedade).

Nível AA no alimento (mg AA/Kg)		Concentração AA nos tecidos ($\mu\text{g/g}$)		
		Fígado	Rim cefálico	Baço
0	Control	1.31 \pm 0.62 ^a	N.D.	N.D.
	Stress	1.00 \pm 0.56 ^a	N.D.	N.D.
50	Control	52.37 \pm 6.20 ^b	54.72 \pm 3.74 ^a	37.13 \pm 6.47 ^a
	Stress	40.74 \pm 6.46 ^b	46.42 \pm 2.82 ^a	32.98 \pm 7.79 ^a
100	Control	87.90 \pm 10.30 ^c	115.52 \pm 9.52 ^b	91.07 \pm 4.30 ^b
	Stress	80.08 \pm 11.07 ^c	103.38 \pm 11.76 ^b	82.74 \pm 1.93 ^b
ANOVA*		X	X	X

N.D.: Não detectável.

Médias \pm Erro Padrão (EP) na mesma coluna com expoentes diferentes são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

* X- Efeito significativo no teor em AA no alimento; Y- Efeito significativo do stress; Z- Efeito significativo da interacção entre o teor em AA no alimento e o stress.

4.4. DISCUSSÃO

A diminuição da taxa de crescimento é considerada como um sinal primário da deficiência em AA, sendo observado em muitos estudos sobre a vitamina C, nomeadamente em *Channa punctatus* (Mahajan & Agrawal, 1979), em peixe-gato (Dabrowski, *et al.*, 1996b; Li *et al.*, 1993; Mazik *et al.*, 1987; Phromkunthong *et al.*, 1997) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (Ikeda, 1992). No presente estudo, também foi observada uma diminuição do crescimento de dourada alimentada com 0 mg AA/Kg alimento ao fim de 13 semanas de crescimento, acompanhada do aparecimento de sinais exteriores de escorbuto (cataratas, erosão das barbatanas), simultaneamente nos grupos control e stress, o que sugere que o stress não

acelerou o processo de desenvolvimento do escorbuto. Esta hipótese é apoiada pelos valores da concentração do AA no fígado, os quais não são significativamente diferentes entre o grupo control e stress.

Depois de 8 semanas de ensaio, observou-se um aumento significativo da mortalidade dos grupos control e stress alimentados sem suplementação de AA. A princípio atribuiu-se esta mortalidade directamente à ausência de suplementação alimentar em AA. No entanto, tanto os peixes mortos como os vivos destes grupos, tinham uma aparência normal, sem sinais de deficiência em AA aparentes, tais como redução do crescimento e perda de apetite, primeiros sintomas desta doença. Cho & Cowey (1993) observaram algo semelhante em truta arco-íris, estudo no qual os peixes alimentados sem suplementação de AA apresentavam mortalidades acrescidas, em comparação com os peixes alimentados com suplementação de AA, apesar de apresentarem um aspecto normal. Estes autores efectuaram observações *post-mortem* dos peixes afectados não descobrindo qualquer explicação para o sucedido. No presente estudo, optou-se por um exame patológico em peixes moribundos, o qual revelou a presença de um parasita branquial, identificado como sendo o *Monogenea Diplectanum aequans*, não se encontrando nenhum outro agente infeccioso nem alterações internas atribuíveis à deficiência de AA. Formulou-se, então, a hipótese de o aumento de mortalidade se dever à interacção entre a ausência de suplementação alimentar em AA e a presença do parasita, dado que os grupos alimentados com AA não apresentavam mortalidades tão elevadas, apesar de estarem igualmente sujeitos ao contacto com o parasita. Esta hipótese foi mais apoiada pela observação da diminuição da mortalidade depois da ministração do tratamento anti-parasitário. No entanto, a mortalidade nestes dois grupos (com deficiência alimentar em AA) voltou a aumentar na 13^a semana, não sendo, nesta altura, eficiente o mesmo tratamento anti-parasitário. Nesta altura, observou-se que os peixes deste grupo apresentavam falta de apetite e, conseqüentemente, diminuição do crescimento, acompanhados dos primeiros sinais anatómicos exteriores de escorbuto (cataratas,

erosão das barbatanas, etc.). Atribuiu-se, neste momento, este novo aumento de mortalidade principalmente ao escorbuto.

O parasita *Diplectanum aequans* provoca normalmente mortalidades significativas nos peixes (Cecchini *et al.*, 1998), sendo possível que no estudo presente, a falta de AA tenha também diminuído a resistência da dourada e, conseqüentemente, levado à diferença na taxa de mortalidade observada entre os peixes alimentados com e sem suplementação de AA. Martins, 1998 mostrou que os peixes *Piaractus mesopotamicus*, quando alimentados com um alimento sem suplementação de AA, apresentavam um maior número de parasitas da espécie *Anachanthorus penilabiatus*, um Monogenea que parasita as branquias. Wahli *et al.* (1986) evidenciou um aumento da resistência da truta arco-íris ao parasita *Icthyophthirius multifiliis* quando esta era alimentada com alimentos suplementados com AA. Mais tarde, o mesmo autor (Wahli *et al.*, 1995) demonstrou, num estudo similar, que a truta arco-íris alimentada com níveis elevados de AA (2000 mg/Kg alimento) apresentava uma diminuição significativa da mortalidade quando infectada com o parasita *I. multifiliis*.

A concentração de AA no fígado, rim cefálico e baço da dourada reflectiram os níveis alimentares desta vitamina, tal como foi observado noutras espécies, como a carpa comum (Dabrowska *et al.*, 1991); a tilápia *Oreochromis spirulus* (Al-Amoudi *et al.*, 1992), o robalo *Lates calcarifer* (Boonyaratpalin *et al.*, 1992); truta arco-íris (Cho & Cowey, 1993; Dabrowski *et al.*, 1996a) e salmão atlântico *Salmo salar* (Waagbø *et al.*, 1996). Embora os grupos stress apresentassem uma concentração em AA sistematicamente inferior à dos respectivos grupos control, esta diferença não era significativa. A diminuição das reservas corporais de AA, principalmente as do fígado, tem sido apontada como uma resposta ao stress (Thomas, 1990; Thomas *et al.*, 1982; Wedemeyer, 1969; Wedemeyer & Yasutake, 1977). No entanto, vários outros estudos não mostraram diminuição significativa da concentração de AA no fígado e rim de peixes sujeitos a stress, tal como o presente estudo. Ishibashi *et al.* (1992b), num ensaio com peixe-papagaio Japonês alimentado com diferentes níveis de suplementação em

AAe sujeito a hipóxia intermitente, não encontrou diferenças significativas na concentração de AA no fígado e rim entre os grupos control e stress alimentados com o mesmo alimento. No capítulo anterior deste trabalho (Capítulo 3) também não foram encontradas diferenças significativas na concentração de AA no fígado e baço de dourada antes e depois de ser sujeita a hipóxia aguda. Também em rodovalho (*Scophthalmus maximus*), sujeito a stress de esvaziamento do tanque de crescimento seguido de exposição ao ar atmosférico durante 2 min. em dias alternados durante 50 dias, não se encontraram diferenças significativas da concentração em AA no fígado e plasma (Gouillou-Coustans & Guillaume, 1993). Outros estudos em salmão atlântico (Sandnes & Waagbø, 1991; Thompson *et al.*, 1993) e peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Li *et al.*, 1998) reportam resultados semelhantes.

Do acima exposto, conclui-se que a diminuição do AA de órgãos como o fígado, rim ou baço, não é uma característica constante da resposta fisiológica dos peixes à presença de stress. Este estudo mostra que o estatuto em AA não foi claramente influenciado, independentemente do nível de suplementação alimentar, pelo stress de hipóxia intermitente. Também evidencia o facto de os requisitos em AA da dourada, alimentada com dietas composta à base de farinha de peixe e suplementadas com 50 ou 100 mg AA/Kg, não serem aumentados pela exposição a hipóxia intermitente. Pode-se concluir, então, que as recomendações do NRC (1993) para os salmonídeos em termos de crescimento e sobrevivência máximos (50 mg AA/Kg alimento) satisfazem os requisitos da dourada sujeita a condições de hipóxia nas condições experimentais deste estudo. Isto pode significar que a resposta fisiológica à hipóxia intermitente não requer a intervenção do AA, ou que a intensidade e severidade da hipóxia não é suficientemente importante para evidenciar a acção do AA, ou que o alimento fornece AA em quantidade suficiente para cobrir as necessidades aumentadas pelo stress, mascarando assim a sua utilização. Li *et al.* (1998) também concluiu que o stress de confinamento não alterava o estatuto em AA do peixe-gato e que 50 mg de AA/Kg alimento (recomendação NRC) eram suficientes para o crescimento normal, resistência a stress e a doenças desta espécie. No presente estudo foi, também, mostrado

fortuitamente que o AA pode ter um papel protector contra o parasita *Diplectanum aequans*, presente no sistema de cultura. Finalmente, é importante estudar em maior profundidade a relação entre o AA e a resposta ao stress de hipóxia, alterando a intensidade deste factor de stress para tentar evidenciar a hipotética acção do AA.

5. EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO ALIMENTAR E DO STRESS DE HIPOXIA CRÔNICA NO CRESCIMENTO E NAS RESERVAS DE VITAMINA C DA DOURADA

5.1. INTRODUÇÃO

A maior parte dos vertebrados é capaz de sintetizar ácido ascórbico *de novo* no fígado ou rim, a partir da glucose (Chatterjee, 1973; Chatterjee, 1978; Chatterjee *et al.*, 1975). Esta síntese envolve a enzima L-gulonolactona oxidase (GLO), sendo a impossibilidade de síntese de AA em algumas espécies devia à ausência desta enzima. Muitas espécies de peixes marinhos são susceptíveis de apresentar sintomas de deficiência em AA (Alexis *et al.*, 1997; Coustans *et al.*, 1986; Fournier *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 1994; Wilson, 1973; Woodward, 1994) devido à ausência de actividade da enzima GLO (Mæland & Waagbø, 1998), pelo que dependem do fornecimento alimentar desta vitamina.

A concentração de OD é um factor limitante em aquacultura e actua como um factor de stress sobre o metabolismo dos peixes. O robalo (*D. labrax*) exposto a um nível de 40% da saturação de OD apresentou uma redução do consumo alimentar e, conseqüentemente, do crescimento, bem como um índice de condição inferior ao dos peixes mantidos em normóxia (86% OD) (Thetmeyer *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos em salmão coho, *Oncorhynchus kisutch*, (Herrmann *et al.*, 1962) e na tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, (van Dam *et al.*, 1996; van Dam *et al.*, 1995). Quando os peixes são sujeitos a condições de hipóxia, eles respondem fazendo ajustamentos fisiológicos e bioquímicos (Val *et al.*, 1998). van den Thillart *et al.* (1994) observou em linguado, *Solea solea*, que este respondia a condições de hipóxia diminuindo a sua taxa metabólica de repouso, aumentando a glucose plasmática e o sedimento sanguíneo (indicação de um aumento numérico do número de células sanguíneas). Rantin *et al.* (1996) mostrou que o tambaqui, *Colossoma macropomum*, aumentava a sua frequência respiratória e pressão intrabucal quando sujeito a hipóxia.

A relação entre o estatuto vitamínico de AA dos peixes e a sua capacidade para fazer face a factores de stress tem sido estudada, no entanto, esta não é ainda totalmente clara. Alguns autores referem uma diminuição dos teores em AA em alguns órgãos como o fígado e rim (Felton *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1982; Wedemeyer, 1969), enquanto outros não observaram qualquer alteração do estatuto vitamínico em peixes sujeitos a stress (Li *et al.*, 1998; Sandnes & Waagbø, 1991).

O objectivo deste estudo é evidenciar uma eventual relação entre a exposição a stress crónico de hipóxia e o estatuto vitamínico em AA da dourada, alimentada com alimentos compostos e suplementados com níveis de AA iguais ou inferiores às recomendações do NRC (1993) para salmonídeos.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos juvenis de dourada com um peso médio de $1.76 \pm 0.02\text{g}$, numa maternidade comercial (Ferme Marine de Douher, França), os quais foram distribuídos, em grupos de 40 peixes, por 24 tanques de 50 l. Foram manufacturados 4 alimentos, formulados de acordo com a Tabela 2.1, diferindo apenas no nível de suplementação em AA: 0, 10, 25 e 50 mg AA/Kg/alimento. Estes valores foram escolhidos em função das recomendações do NRC (1993) para salmonídeos, as quais são de 50 mg AA/Kg alimento, valor que foi utilizado como o máximo. Cada um dos alimentos foi distribuído por 6 tanques, 3 vezes por dia manualmente durante a semana e por distribuidor automático no fim-de-semana. Os peixes foram alimentados com uma ração que variou entre os 7%, no início do estudo, e os 5% do peso vivo, no final da experiência, quantidade esta calculada em função da saciedade dos peixes expostos a stress, a qual é inferior aos peixes controlo.

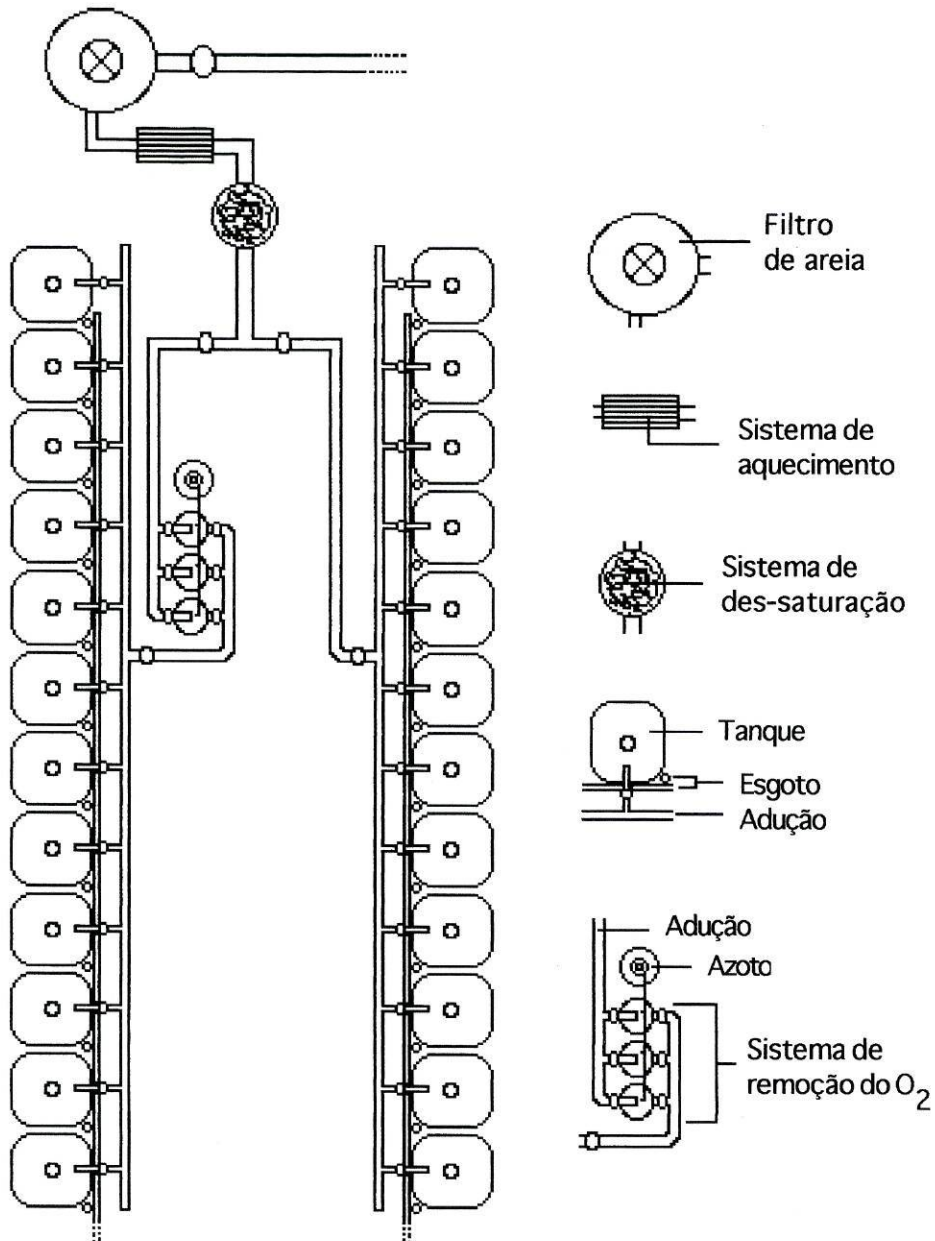


Fig. 5.1. Esquema do sistema experimental utilizado no estudo da influência do ácido ascórbico na resposta à hipóxia aguda.

A decisão de alimentar os peixes com uma ração igual para todos, em vez de os alimentar até à saciedade visual, foi tomada para permitir que todos os indivíduos alimentados com o mesmo alimento recebessem a mesma quantidade de AA e também para que os grupos alimentados com os diferentes alimentos recebessem a mesma proporção de AA em relação à quantidade existente no alimento. Desta forma, eventuais alterações do estatuto vitamínico poderiam ser atribuídas à aplicação do stress de hipóxia.

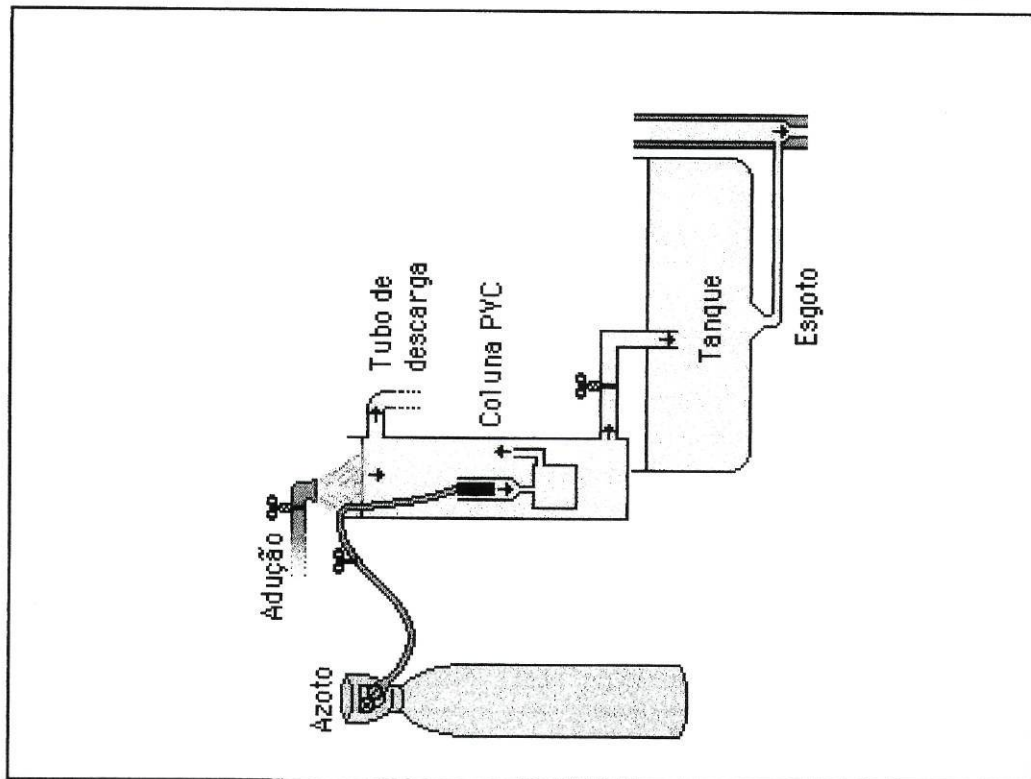
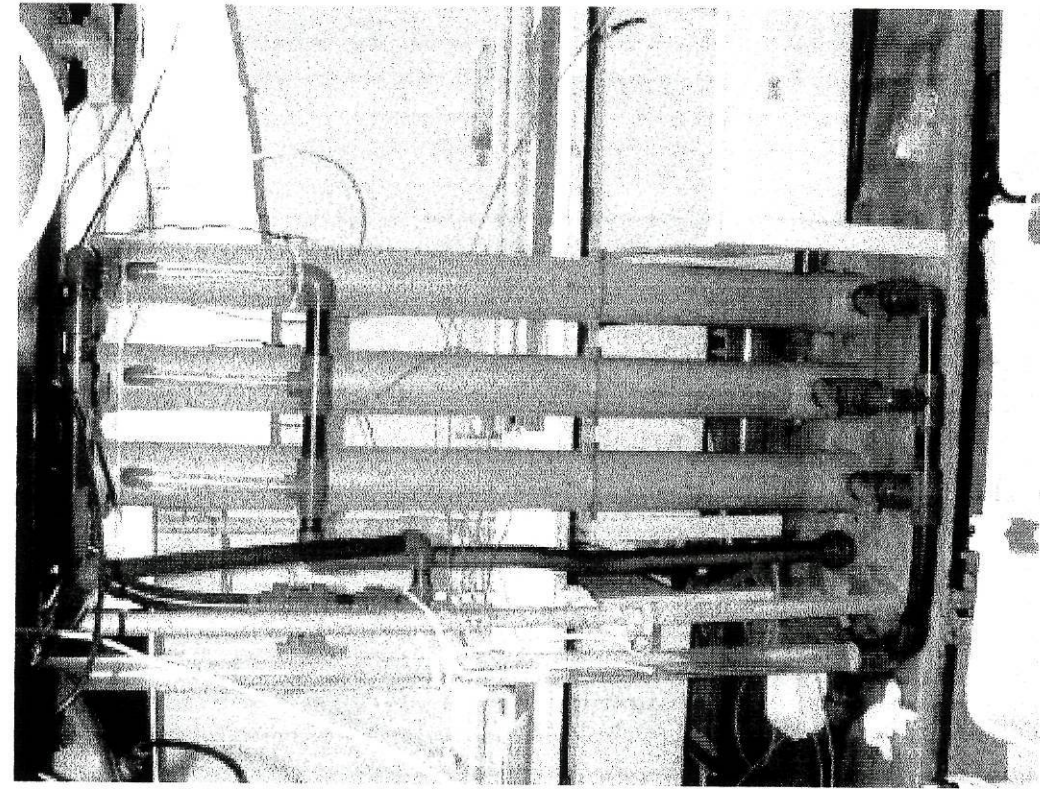


Fig. 5.2. Esquema e foto do sistema de remoção de oxigênio da água do mar.

Três dos seis tanques alimentados com o mesmo alimento foram mantidos em normóxia, com $90 \pm 5\%$ de OD (control), e os restantes 3 foram postos em hipóxia, $55 \pm 5\%$ OD (stress), durante todo o período experimental, o qual teve a duração de 8 semanas. A hipóxia foi conseguida através da difusão contínua de azoto num sistema de contra-corrente, usando 3 colunas de PVC, conforme se pode ver na Fig. 5.2 Este sistema foi construído de acordo com o descrito por Bennett *et al.*, 1995 e aperfeiçoado por Pichavant *et al.*, in press.

Os peixes foram mantidos em circuito aberto a 22°C , com um fotoperíodo de 12h dia/12h noite, e com um fluxo de renovação de água de 2l/min durante as primeiras 4 semanas e de 4l/min durante o resto do ensaio. A mortalidade foi registada diariamente e os peixes pesados cada 2 semanas. No início, ao fim de 4 semanas e no final da experiência, foram recolhidos o fígado, o rim anterior e o baço de 5 animais de cada tanque para determinação do teor em AA. No fim da experiência foram recolhidos plasma, para quantificação da glicemia, pele, para determinação do teor em hidroxiprolina, e também 5 peixes inteiros de cada tanque para determinação da composição corporal.

Os vários parâmetros, bem como a análise estatística dos resultados, foram determinados de acordo com o descrito no Capítulo 2.

5.3 RESULTADOS

Os diferentes alimentos experimentais não apresentaram diferenças significativas na sua composição proximal, tal como se pode verificar pela análise da Tabela 5.1.

Após 8 semanas de experiência não se observaram diferenças significativas no peso médio final, em qualquer dos parâmetros de crescimento, na sobrevivência nem na composição corporal das douradas alimentadas com diferentes níveis de suplementação em AA, nem entre os grupos control e stress alimentados com o mesmo alimento (Tabela 5.2)

Tabela 5.1. Composição química dos alimentos experimentais.

	Nível de AA/Kg Alimento			
	0	10	25	50
Matéria Seca (%)	91.1	91.3	91.3	91.4
Proteína Bruta (Nx6.25, % MS)	49.6	50.9	50.4	49.9
Gordura Bruta (% MS)	12.4	13.1	13.0	13.4
Energia Bruta (kj/g MS)	20.5	21.0	20.4	20.4
Cinzas (% MS)	9.1	9.0	9.0	9.0

As concentrações iniciais de AA no fígado, rim cefálico e baço eram bastante elevadas e diminuíram ao longo do tempo, a uma taxa relacionada com o nível alimentar de AA, isto é, mais tanto mais rápido quanto menor o nível alimentar de AA (Tabela 5.3). A diminuição do AA foi mais rápida no fígado, seguida do rim cefálico, tanto ao fim de 4 como de 8 semanas. O rim cefálico apresentou-se como o órgão mais rico em AA durante toda a experiência. Ao fim de 8 semanas, os peixes alimentados com 50 mg AA/Kg alimento apresentavam um nível ainda bastante elevado de AA no rim cefálico e no baço, o qual tinha decrescido ligeiramente em relação ao valor encontrado ao fim de 4 semanas. As concentrações de AA, após 4 e 8 semanas de experiência, no fígado, rim cefálico e baço reflectiam os níveis alimentares, sendo este o único factor responsável pelas diferenças encontradas entre os grupos. A figura 5.3 mostra a relação entre o nível alimentar de AA e a concentração encontrada no fígado, tanto dos grupos control como stress. Em ambos os casos se verificou uma regressão linear significativa ($P < 0.0001$), bem como havia similaridade entre o declive e o de coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 5.2. Parâmetros decrescimento, eficiência alimentar e sobrevivência de dourada alimentada com diferentes níveis de AA (n=3; 8 semanas; 22 °C).

	Nível de AA/Kg Alimento											
	0		10		25		50					
	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
PMI (g)	1.75±0.01	1.75±0.01	1.77±0.01	1.77±0.01	1.78±0.01	1.76±0.01	1.76±0.01	1.76±0.01	1.76±0.01	1.76±0.01	1.76±0.01	1.75±0.00
PMF (g)	12.27±0.28	11.53±0.15	12.46±0.44	11.46±0.34	12.12±0.77	12.17±0.14	12.45±0.13	12.17±0.14	12.45±0.13	12.17±0.14	12.45±0.13	11.58±0.69
TCE	3.25±0.03	3.14±0.02	3.25±0.05	3.12±0.04	3.19±0.10	3.22±0.02	3.26±0.02	3.22±0.02	3.26±0.02	3.22±0.02	3.26±0.02	3.14±0.10
ICA	1.07±0.01	1.16±0.02	1.09±0.02	1.17±0.03	1.14±0.07	1.14±0.01	1.09±0.02	1.14±0.01	1.09±0.02	1.14±0.01	1.09±0.02	1.17±0.04
CEP	1.92±0.02	1.77±0.01	1.81±0.03	1.69±0.04	1.75±0.10	1.75±0.02	1.84±0.03	1.75±0.02	1.84±0.03	1.75±0.02	1.84±0.03	1.71±0.06
Sobrevivência (%)	96.7±1.67	96.5±0.83	98.2±1.67	97.4±1.44	96.4±2.20	99.7±0.83	98.2±1.67	97.4±1.44	96.4±2.20	99.7±0.83	98.2±1.67	98.2±1.67

Médias ± Erro Padrão (EP) na mesma linha com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P < 0.05).

Tabela 5.3. Efeito do nível de suplementação alimentar de AA e da hipóxia crônica na concentração de AA do fígado, rim cefálico e baço após 4 e 8 semanas de experiência (n=15, 22°C).

AA no alimento (mg/Kg)	Fígado		Rim cefálico		Baço		
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	
Inicial	119.3±6.87		149.61±30.66		59.77±15.51		
0	Control	25.59±1.52 ^a	8.83±0.51 ^a	35.24±2.71 ^a	20.92±1.91 ^a	24.65±1.46 ^a	11.25±1.58 ^a
	Stress	36.24±1.75 ^{ab}	11.47±0.70 ^a	40.31±1.72 ^{ab}	25.03±1.67 ^{ab}	30.61±1.09 ^a	12.28±1.17 ^a
10	Control	31.81±2.22 ^{ab}	15.89±1.23 ^a	49.24±4.62 ^c	36.70±3.21 ^{ab}	31.70±2.10 ^a	15.14±1.88 ^a
	Stress	36.04±2.88 ^{ab}	17.46±1.26 ^{ab}	48.27±3.28 ^{bc}	43.92±3.23 ^{bc}	33.32±1.36 ^a	16.14±1.66 ^a
25	Control	43.28±2.05 ^b	27.92±2.69 ^{bc}	65.95±2.52 ^d	61.85±2.45 ^c	37.82±1.57 ^a	25.98±2.19 ^a
	Stress	43.96±2.74 ^b	34.33±1.79 ^{cd}	71.38±2.39 ^d	66.02±2.81 ^c	36.44±1.92 ^a	25.34±2.61 ^a
50	Control	65.29±3.04 ^c	41.60±2.12 ^d	110.04±4.78 ^e	105.54±6.59 ^d	57.22±3.21 ^b	48.02±7.83 ^b
	Stress	68.56±3.33 ^c	41.92±1.98 ^d	106.63±4.78 ^e	101.49±4.50 ^d	57.08±2.90 ^b	48.51±10.65 ^b
ANOVA*	X	X	X	X	X	X	

Médias ± Erro Padrão (EP) na mesma coluna com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P < 0.05).

* X- Efeito significativo no teor em AA no alimento; Y- Efeito significativo do stress; Z- Efeito significativo da interação entre o teor em AA no alimento e o stress.

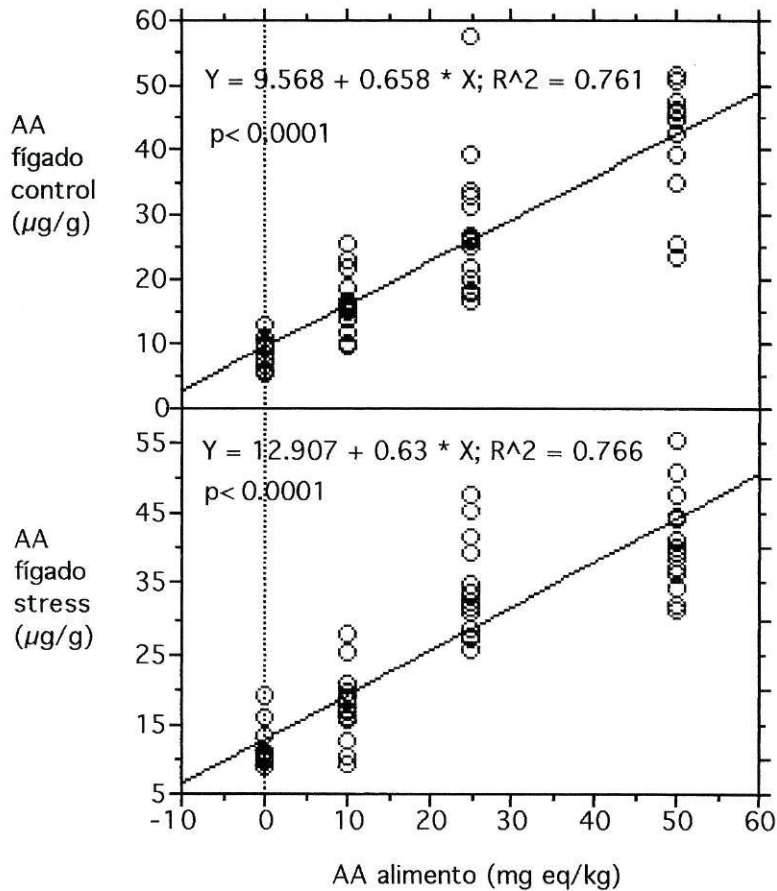


Fig. 5.3. Relação entre o nível de suplementação alimentar em AA e a sua concentração no fígado de dourada em normóxia (control) e sujeita a hipóxia crónica (stress) (n=15; 8 semanas, 22°C).

A glucose plasmática apresentava valores normais em todos os grupos, não havendo diferenças significativas relativas ao stress de hipóxia crónica nem ao nível de suplementação de AA no alimento, indicando que todos os grupos sujeitos ao stress se apresentavam completamente adaptados à hipóxia crónica (Tabela 5.4). O teor em hidroxiprolina da pele não apresentava diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, sendo os valores obtidos os esperados para peixes normais, indicativo de que nenhum dos grupos de peixes apresentava, no momento, alterações da produção de colagénio (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Glicemia e teor em hidroxiprolina de dourada alimentada com diferentes níveis de AAe sujeita a hipóxia crónica (n=15; 8 semanas; 22°C).

Nível AA no alimento (mg AA/Kg)		Glicemia (mg/dl)	Hidroxiprolina na pele (μ g/mg)
0	Control	61.90 \pm 3.52	35.97 \pm 2.33
	Stress	63.35 \pm 3.10	36.69 \pm 1.50
10	Control	60.34 \pm 1.70	38.18 \pm 0.67
	Stress	65.66 \pm 2.59	34.62 \pm 0.98
25	Control	66.19 \pm 0.52	40.91 \pm 2.14
	Stress	67.47 \pm 1.70	35.17 \pm 2.54
50	Control	64.42 \pm 1.84	39.37 \pm 2.80
	Stress	62.51 \pm 3.67	37.15 \pm 1.02

Médias \pm EP na mesma coluna com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P< 0.05).

5.4. DISCUSSÃO

Após 8 semanas de experiência, os juvenis de dourada sujeitos a stress de hipóxia crónica não apresentavam diferenças significativas nos parâmetros de crescimento, quando comparados com os controlos alimentados com o mesmo alimento experimental, nem entre os grupos alimentados com alimentos diferentes. Apesar de os peixes serem alimentados com uma ração, logo a um nível inferior à saciedade, a performances de crescimento tanto dos grupos control como stress foram superiores aos observados por Santinha *et al.* (1996) em dourada alimentada com a mesma formulação do alimento, mas alimentada até à saciedade visual. Esta diferença deve-se, possivelmente, ao facto de Santinha *et al.* (1996) ter utilizado peixes de maior tamanho (PI= 9.6 \pm 0.4 g) do que os do presente estudo. Os resultados de crescimento indicam que a ração distribuída foi suficiente para a manutenção do crescimento óptimo das douradas. Rodvalho exposto a uma concentração de OD de 5mg/l ou 3.5 mg/l (65 ou 45% da saturação) apresentava uma diminuição do crescimento quando comparado com os peixes mantidos em normóxia, no entanto os seus ICA eram similares (Pichavant *et al.*, in press). As

diferenças observadas no crescimento do rodovalho deveram-se ao facto de os peixes mantidos em hipóxia terem uma menor ingestão alimentar do que os em normóxia, pois a hipóxia levou à redução do apetite. No caso do presente estudo, tal não sucedeu, pois foram alimentados todos os grupos com a mesma ração, o que explica a ausência de diferenças no crescimento entre os peixes em normóxia e em hipóxia. Brett *et al.* (1981) em estudos utilizando salmão coho (*O. kisutch*) e sockeye (*O. nerka*), e Chiba (1988) em *Plecoglossus altivelis*, também não observaram diferenças no crescimento nem nos ICA para valores de OD superiores a 4.0-4.5 (40-45% da saturação) e 3.8 mg/l (45% da saturação), respectivamente. Em truta arco-íris foram obtidos resultados similares (Caldwell *et al.*, 1994; Pouliot *et al.*, 1989). Estes estudos mostram que a hipóxia diminui o crescimento através da diminuição do apetite dos peixes. No entanto, o ICA parece só ser afectado quando o OD atinge valores inferiores a 4 mg/l.

A falta de diferenças significativas na glicemia, entre os peixes stressados e os respectivos controlos, demonstra que os primeiros se encontravam completamente adaptados às condições de hipóxia crónica e que não se encontrava presente nenhum outro factor de stress. Também no caso do teor em hidroxiprolina da pele, não se verificaram diferenças significativas entre grupos stress e control alimentados com o mesmo alimento, nem entre grupos alimentados com diferentes níveis de suplementação em AA, o que mostra que nenhum dos grupos tinha alterações do colagénio e, conseqüentemente, dos tecidos conjuntivos. Os valores obtidos para a hidroxiprolina da pele são os esperados para animais normais, sendo semelhantes aos obtidos por Fournier *et al.* (2000) em juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*). O facto de os peixes alimentados com o alimento sem suplementação de AA apresentarem um valor normal de hidroxiprolina na pele, apesar de mostrarem reservas baixas de AA, pode ser explicada pelos valores iniciais elevados de AA, os quais seriam suficientes para manter uma produção normal de colagénio durante o período experimental. Salienta-se, no entanto, o facto de os grupos stress alimentados com 10, 25 e 50 mg AA/Kg alimento apresentarem concentrações de hidroxiprolina inferiores aos respectivos controlos. Moreau & Dabrowski (1998) mostrou que

a pele da lampreia marinha (*Petromyzon marinus*) era um dos órgãos com maior concentração em AA. Assim, uma hipotética diminuição, embora ligeira, do AA da pele das douradas sujeitas ao stress crónico podese a razão da diminuição do teor em hidroxiprolina encontrada.

Os teores em AA do fígado, rim cefálico e baço dos vários grupos reflectiam os níveis de suplementação alimentar desta vitamina. O mesmo tipo de resposta foi observado noutras espécies como o salmão Atlântico, *Salmo salar* (Sandnes *et al.*, 1992; Sandnes & Waagbø, 1991; Thompson *et al.*, 1993), tilápia, *Oreochromis spirulus*, (Al-Amoudi *et al.*, 1992), peixe-gato, *Ictalurus punctatus*, (Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998) e truta arco-íris (Dabrowski *et al.*, 1996a). Os resultados obtidos no presente estudo também mostram que os juvenis de dourada têm um elevado nível de utilização de AA, pois a concentração de AA decresce rapidamente nos órgãos estudados com a diminuição do seu aporte alimentar. O rim cefálico demonstrou ser o órgão com maior concentração em AA, tanto inicialmente como no final do ensaio. No fígado, a concentração de AA estava positivamente correlacionada com o nível de suplementação alimentar. Em truta arco-íris foram encontrados resultados semelhantes (Dabrowski *et al.*, 1996a). Tanto os grupos stressados como os controlos apresentavam um declive e um coeficiente de determinação (R^2) semelhantes, o que mostra que o stress de hipóxia crónica não alterou a relação entre o aporte alimentar de AA e a sua concentração no fígado.

O stress crónico de hipóxia não alterou significativamente o estatuto vitamínico das douradas alimentadas com os diferentes níveis de AA. Isto pode significar que o AA não tem qualquer papel na adaptação fisiológica da dourada a condições de hipóxia ambiental constantes, ou que o aporte alimentar desta vitamina é suficiente para cobrir o aumento da sua utilização. Mais ainda, o fígado dos peixes stressados e alimentados sem suplementação de AA apresentavam, tanto ao fim de 4 como de 8 semanas de ensaio, uma maior concentração de AA do que o control. o que sugere uma eventual mobilização das reservas de AA de outros órgãos, como por exemplo a pele. Outra explicação possível é a biossíntese de AA por parte das douradas em stress. Mæland

& Waagbø (1998) não encontrou actividade da enzima gulonolactona oxidase (GLO) em teleósteos marinhos de águas frias, mas esta determinação nunca foi levada a cabo em animais sujeitos a stress.

A relação entre o AA e o stress ainda não é clara e os resultados encontrados pelos diferentes autores não são constantes. Alguns descrevem uma diminuição das reservas de AA em resposta ao stress (Chien *et al.*, 1999; Thomas, 1987; Thomas *et al.*, 1982; Wedemeyer, 1969), enquanto outros não detectam alterações significativas deste mesmo parâmetro (Dunier *et al.*, 1995; Gouillou-Coustans & Guillaume, 1993; Ishibashi *et al.*, 1992a). Aparentemente, a utilização de AA para ultrapassar as limitações fisiológicas produzidas pelo stress depende do tipo de stress a que os peixes estão sujeitos e, deste modo, do tipo de resposta fisiológica que este induz. Assim, parece que a quantidade de AA ingerida ou as reservas corporais são suficientes para colmatar as necessidades no caso de exposição a hipóxia crónica durante 8 semanas. Finalmente, estas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos para o caso da hipóxia intermitente (Capítulo 4), mas são necessários mais estudos para clarificar o papel do AA em condições de stress.

6. RESISTÊNCIA DA DOURADA ALIMENTADA COM DIFERENTES NÍVEIS DE ÁCIDO ASCÓRBICO A UMA CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE AMÔNIA. EFEITO SOBRE O ESTATUTO VITAMÍNICO.

6.1. INTRODUÇÃO

A maior parte dos peixes é incapaz de sintetizar AA, pelo menos em quantidade suficiente, pelo que dependem de um aporte alimentar adequado para suprirem as suas necessidades. Quando o aporte alimentar não é suficiente para cobrir os requisitos, os peixes desenvolvem um quadro patológico de deficiência designado por escorbuto. Esta vitamina varia a sua concentração nos diferentes órgãos, sendo alguns mais ricos, como é o caso do rim adrenal, do fígado, do rim cefálico e do baço (Agrawal & Mahajan, 1980).

O AA tem diversas funções: é um antioxidante, tem um papel na síntese do colagénio, está envolvido na biossíntese da carnitina, noradrenalina e outros peptídeos neuroendócrinos. Também está envolvido nos mecanismos de desintoxicação das drogas e outros xenobióticos que se processa no fígado (Zannoni *et al.*, 1975), e na protecção da hemoglobina contra os nitritos nos peixes (Scarano *et al.*, 1991).

Muitos autores evidenciaram a existência de uma relação entre o AA e a resposta fisiológica dos peixes a factores de stress (Mazik *et al.*, 1987; Scarano *et al.*, 1991; Thomas, 1987; Thomas *et al.*, 1982; Wedemeyer, 1969; Wise *et al.*, 1988), atribuindo ao AA um papel protector em relação a estes. Wedemeyer (1969) observou uma diminuição na concentração de AA no rim anterior da truta arco-íris sujeita a choque térmico de $\pm 7^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. ou a 15 min. de outros factores de stress. Luzzana *et al.* (1995) sugeriu que os peixes com reservas de AA muito reduzidas poderiam ter um controlo reduzido da síntese de esteróides, nomeadamente do cortisol, ficando, assim, menos aptos a se adaptarem a condições de stress.

Mazik *et al.* (1987) relatou que o peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) alimentado com uma alimento sem AA era mais sensível à hipóxia e à amónia.

A amónia é a principal forma de excreção azotada dos peixes. A sua presença na água pode ser um factor limitante em aquacultura, pois pode ser muito tóxica, levando ao desencadeamento de mortalidades agudas ou crónicas, depressão do crescimento e da resistência a doenças, dependendo da sua concentração ambiente e do tempo de exposição (Tomasso, 1994; USEPA, 1989). Nas espécies de peixes marinhos cultivadas na Europa (robalo, dourada, rodovalho) a concentração ambiente letal para 50% da população exposta durante 96h (96h-LC50) varia entre 1.7 e 2.6 mg/l de azoto amoniacal não-ionizado (UIA-N), equivalente a um nível de azoto amoniacal total (TAN) entre 40 e 59 mg/l (Person-Le Ruyet *et al.*, 1995), enquanto os níveis seguros para o crescimento do rodovalho são de 0.7 mg/l UIA-N (Person-Le Ruyet *et al.*, 1997a). Quando as concentrações plasmáticas de TAN atingem 30 mg/l no robalo e 35 a 40 na dourada e rodovalho, observam-se mortalidades agudas.

O objectivo do presente estudo é investigar a influencia do nível alimentar de AA na resistência da dourada à exposição aguda a níveis subletais de amónia (cerca de 60% do 96h-LC50) e a sua possível relação com a desintoxicação deste produto azotado.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de dourada foram obtidos numa maternidade comercial (Ferme Marine de Douhet, França) e alimentados durante 5 meses com alimentos à base de farinha de peixe, conforme a formulação descrita na Tabela 2.1, com diferentes níveis de suplementação em AA: 0, 10, 25 e 50 mg/Kg alimento. Após este período foram colocados 30 peixes, com um peso médio de 38.6 ± 5.0 g, em cada tanque de 50 l de capacidade, num total de 12 tanques. Os peixes foram sujeitos a um jejum de 24h antes do início do ensaio, para evitar a excreção de quantidades importantes de amónia e, logo, alterar as condições do ensaio. Os tanques foram

alimentados com água do mar em sistema aberto (sem recirculação), com uma salinidade de 34.5‰, e uma temperatura de 22°C. O fotoperíodo utilizado foi de 12h dia/noite. O caudal de água fornecido aos tanques foi de 2l/min. e o teor em OD foi de 90% da saturação. O pH da água foi medido individualmente em cada tanque sempre que se efectuou uma recolha de água para a medição da concentração do TAN ambiente.

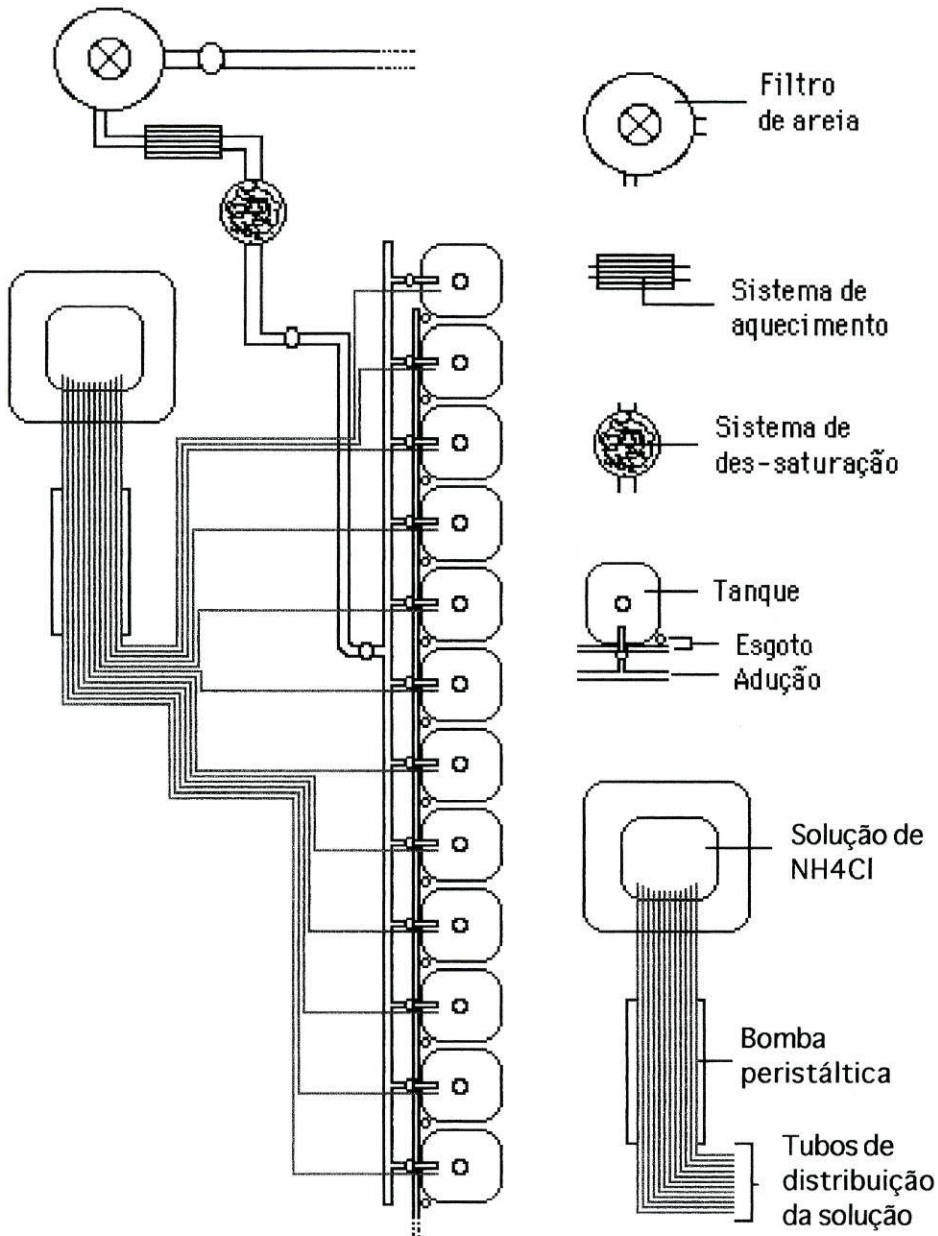


Fig. 6.1. Sistema experimental utilizado para a aplicação de stress de amónia em dourada.

A concentração de amónia ambiente desejada para o ensaio foi obtida pela adição de uma solução de NH_4Cl (124g/l de água doce) à adução de água, usando uma bomba peristáltica

(Ismatec®), obtendo-se uma concentração final de 1.48 mg UIA-N/l. O TAN ambiental foi medida 5 vezes por dia usando um método colorimétrico num sistema automático de fluxo contínuo, conforme o descrito por Dosdat *et al.* (1995), por forma a controlar a sua concentração nos vários tanques durante todo o ensaio. A mortalidade foi verificada regularmente, sendo os peixes mortos removidos imediatamente do respectivo tanque.

Antes e depois dos 4 dias de ensaio foram amostrados 12 peixes alimentados com cada um dos diferentes alimentos, aos quais se recolheu sangue para a medição da glicemia e da concentração de TAN, bem como fígado, rim e baço para se proceder à determinação da concentração de AA. Os métodos utilizados para estas determinações encontram-se descritos no Capítulo 2. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente de acordo com o estipulado no mesmo Capítulo.

6.3 RESULTADOS

A Tabela 6.1 apresenta os níveis ambientais de TAN e de UIA-N, bem como a mortalidade das douradas sujeitas a uma concentração subletal de amónia, em função do teor em AA do alimento. Todos os grupos foram sujeitos a um nível semelhante de TAN e UIA-N ambientais. A mortalidade também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, apesar de os peixes alimentados sem AA terem uma mortalidade um pouco superior à dos restantes grupos.

A glicemia e a concentração de TAN plasmático são apresentadas na Tabela 6.2. Os peixes stressados apresentaram sempre uma maior glicemia do que os respectivos controlos, no entanto as diferenças não são significativas. No que respeita ao TAN plasmático, não se detectaram diferenças significativa dentro dos controlos nem dentro dos grupos stressados. No entanto, quando se comparou o controlo com o respectivo grupo sujeito a stress, o TAN plasmático aumentou significativamente de 3-6 mg/l nos controlos, para cerca de 30 mg/l nos grupos sujeitos a stress.

Tabela 6.1. TAN e UIA-N ambientais (mg/l) e mortalidade em função do teor alimentar de AA.

AA (mg/kg alimento)	TAN ambiente (mg/l)	UIA-N ambiente* (mg/l)	Mortalidade (%)
0	41.32±0.64	1.48±0.21	14.44±0.03
10	40.29±0.52	1.44±0.20	13.33±0.07
25	43.11±0.62	1.52±0.21	13.33±0.05
50	41.30±0.53	1.47±0.2	13.33±0.03

Medias ± EP.

*Calculado usando a equação de Johansson & Wedborg (1980).

Tabela 6.2. Glucose e TAN plasmáticos antes e após a exposição a um nível subletal de TAN ambiental, durante 4 dias, em função do teor alimentar em AA.

AA (mg/Kg alimento)		Glucose Plasmática (mg/dl)	TAN Plasmático (mg/l)
0	Control	64.95±5.27	6.16±2.38 ^a
	Stress	71.65±3.01	30.62±1.42 ^b
10	Control	57.40±3.84	3.19±1.85 ^a
	Stress	66.58±3.11	33.68±3.79 ^b
25	Control	67.77±10.17	5.77±2.86 ^a
	Stress	75.45±5.68	29.44±1.63 ^b
50	Control	75.15±7.10	3.40±0.70 ^a
	Stress	80.81±9.92	31.01±2.91 ^b
ANOVA*			Y

Médias ± Erro Padrão (EP) na mesma coluna com expoentes diferentes são significativamente diferentes (P < 0.05).

* X- Efeito significativo no teor em AA no alimento; Y- Efeito significativo do stress; Z- Efeito significativo da interação entre o teor em AA no alimento e o stress.

A Tabela 6.3 apresenta as concentrações em AA no fígado, rim cefálico e baço das douradas. Como se pode observar, em todos os órgãos os grupos stressados apresentavam um aumento da concentração de AA em relação aos respectivos controlos, embora esta diferença não seja sempre significativa, o que indica a existência de uma mobilização desta vitamina nas

condições de stress aplicadas. Este aumento do teor em AA só é significativo no caso dos peixes alimentados com o nível de suplementação de 50 mg AA/Kg de alimento.

Tabela 6.3. Efeito do nível de suplementação em AA e da exposição a uma concentração subletal de amónia na concentração de AA no fígado, rim cefálico e baço (n=12; 4 dias; 22°C).

Nível AA no alimento (mg AA/Kg)		Concentração AA nos tecidos ($\mu\text{g/g}$)		
		Fígado	Rim cefálico	Baço
0	Control	4.21±0.44 ^a	6.22±0.89 ^a	4.55±0.68 ^a
	Stress	6.44±0.53 ^a	7.66±0.53 ^a	7.49±0.56 ^a
10	Control	12.59±0.35 ^a	17.19±1.02 ^{ab}	10.98±2.12 ^{ab}
	Stress	15.74±1.04 ^a	20.28±1.21 ^{bc}	22.48±1.60 ^b
25	Control	19.38±1.40 ^{ab}	31.77±3.20 ^{cd}	28.72±5.31 ^b
	Stress	32.06±1.91 ^{bc}	36.09±2.76 ^d	31.91±3.17 ^{bc}
50	Control	43.06±2.39 ^c	55.83±7.17 ^e	49.51±7.76 ^{cd}
	Stress	77.57±6.67 ^d	67.06±3.13 ^e	58.48±6.45 ^d
ANOVA*		X, Y, Z	X, Y	X, Y

Médias \pm Erro Padrão (EP) na mesma coluna com expoentes diferentes são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

* X- Efeito significativo no teor em AA no alimento; Y- Efeito significativo do stress; Z- Efeito significativo da interacção entre o teor em AA no alimento e o stress.

Os resultados da ANOVA a dois factores mostram que as diferenças encontradas nas concentrações de AA no fígado foram devidas ao nível de suplementação em AA, ao stress de amónia e à interacção entre estes dois factores. No caso do rim cefálico e do baço não se encontraram diferenças significativas na concentração de AA entre os controlos e os peixes stressados alimentados com o mesmo alimento. No entanto, foram detectadas diferenças significativas deste parâmetro entre os controlos e os peixes stressados e alimentados com níveis diferente de AA. Estas diferenças são devidas ao efeito do teor em AA na dieta e ao stress de amónia, não existindo qualquer efeito da interacção entre os dois factores.

5.4. DISCUSSÃO

A sobrevivência da dourada exposta a uma concentração ambiental de UIA-N de 1.48 mg/l (60% do 96h-LC50) não foi melhorada pela suplementação alimentar com AA (10 a 50 mg/kg de alimento). Era esperada uma diferença significativa na mortalidade entre os peixes alimentados sem e com suplementação de AA, uma vez que Mazik *et al.* (1987) observou que o peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) alimentado com um alimento sem AA exibia valores de LC50 significativamente menores do que os grupos alimentados com dietas suplementadas com esta vitamina. Neste estudo, a dourada alimentada com um alimento não suplementado com AA apresentava uma concentração de AA nos tecidos bastante reduzida (4.21-6.22 $\mu\text{g/g}$), pelo que a inexistência de uma diferença significativa na mortalidade não pode ser atribuída à existência de reservas corporais suficientes desta vitamina.

Mais ainda, uma mortalidade superior a 14% era esperada para a concentração de amônia ambiental utilizada nesta experiência. Wajsbrodt *et al.* (1991) determinou que o 96 h-LC50 dos juvenis de dourada (0.4-3g) era de 1.27 mg UIA-N/l, o qual é inferior à concentração utilizada neste estudo. No entanto, esta diferença pode ser atribuída a diferenças do protocolo experimental utilizado. Enquanto Wajsbrodt *et al.* (1991) utilizou um sistema estático para a exposição à amônia ambiental, no presente estudo foi utilizado um sistema de fluxo contínuo, onde a água era continuamente renovada sem recirculação. Person-Le Ruyet *et al.* (1995) utilizou um sistema similar ao utilizado neste estudo e determinou que o 96h-LC50 para a dourada (6-136g) era, em média, 2.5 a 2.6 mg UIA-N/l, uma concentração muito superior e mais de acordo com os resultados obtidos nesta experiência.

O TAN plasmático aumentou significativamente após a exposição à concentração subletal de amônia ambiental. Os valores control do TAN variaram entre 3.2 e 6.2 mg/l, os quais estão dentro do intervalo de valores normais para peixes expostos a concentrações normais de amônia

ambiental (3.6 - 5.3 mg/l) (Ashe *et al.*, 1996; Person-Le Ruyet *et al.*, 1995; Randall *et al.*, 1987; Rasmussen *et al.*, 1998). OTAN plasmático das douradas deste estudo, expostas a cerca de 41 mg/l de TAN ambiental durante 96h, atingiu os 30 mg/l. Person-Le Ruyet *et al.* (1995) mostrou que o TAN plasmático da dourada equivalente ao 96h-LC50 era de 35-40 mg/l. O TAN plasmático obtido neste trabalho não está longe do valor obtido por Person-Le Ruyet *et al.* (1995), o que significa que a concentração de amónia ambiental utilizada é bastante stressante e que os 50% de mortalidade seriam alcançados dentro de pouco tempo se as condições experimentais fossem mantidas. Não foram observadas diferenças significativas no TAN plasmático entre os grupos de dourada alimentadas com os diferentes níveis de AA, o que sugere que o equilíbrio entre a absorção e a excreção da amónia não foi afectado pela suplementação em AA.

Como resposta à exposição à concentração subletal de amónia ambiental, alguns tecidos (fígado, rim cefálico e baço) apresentaram aumentos da concentração em AA em relação ao seu valor inicial. No caso do fígado, esse aumento é devido ao efeito do factor de stress e da interacção entre o stress e o nível de suplementação com AA (Tabela 6.3). Este tipo de resposta ao stress, i.e., aumento da concentração do AA nos órgãos, não tem sido observado com frequência. A maior parte dos autores observa uma diminuição (Dabrowska *et al.*, 1991; Wedemeyer, 1969) ou não observa qualquer alteração (Dunier *et al.*, 1995; Gouillou-Coustans & Guillaume, 1993; Ishibashi *et al.*, 1992b) do estatuto da Vitamina C dos peixes expostos a diferentes tipos de stress. Noutros estudos foram observados aumentos transitórios da concentração tecidular em AA. Após 2h de confinamento a um espaço reduzido, o peixe-gato mostrou uma tendência para apresentar uma concentração de AA hepático superior ao controlo (Li *et al.*, 1998), mas as diferenças não eram significativas. O peixe *Mugil cephalus* sujeito à exposição de concentrações elevadas de cádmio, apresentava concentrações de AA nas brânquias, rim, fígado e cérebro significativamente elevadas, em relação ao valor inicial, após 3 dias de exposição (Thomas *et al.*, 1982). No entanto, no final da experiência (42 dias), as concentrações de AA nos referidos

órgãos tinha baixado de forma significativa, em relação ao valor inicial. Também o peixe *Nemacheilus sinuatus* apresentou concentrações de AA hepático significativamente aumentadas em resposta a uma exposição de curta duração a veneno de sapo (Magare *et al.*, 1996).

Os aumentos da concentração de AA nos tecidos, observados no presente estudo, não podem ser atribuídos a alterações ao nível da absorção desta vitamina a partir do alimento, uma vez que os peixes foram mantidos em jejum nas 24h anteriores ao início da experiência e no decorrer desta. Deste modo, os autores apontam algumas explicações possíveis para os resultados encontrados.

A primeira hipótese prende-se com a biossíntese do AA. A truta arco-íris, tal como a dourada, é uma espécie para a qual o AA é uma vitamina, logo depende do seu aporte alimentar para satisfazer as suas necessidades. No entanto, Hilton *et al.* (1979a) evidenciou a existência de síntese de AA por parte da truta arco-íris, a qual ocorre a uma taxa muito reduzida. É possível que a dourada também possua a capacidade, embora limitada, de biossintetizar AA (o facto de as douradas alimentadas sem suplementação de AA não terem apresentado sintomas de deficiência e manterem sempre um nível baixo, mas estável de AA nos órgãos estudados, suporta esta hipótese) e que, esta capacidade seja aumentada pela exposição a factores de stress. Se bem que esta hipótese possa explicar o aumento da concentração em AA nos órgão dos peixes alimentados sem suplementação em AA, não parece tão plausível quando aplicada aos restantes grupos. Isto porque estes últimos apresentam aumentos bastante grandes da concentração em AA, os quais revelariam uma capacidade elevada de biossíntese de AA, a qual não é real.

Deste modo, é formulada uma segunda hipótese na qual é proposto um mecanismo de mobilização de AA de outros órgão para o fígado, rins, baço e eventualmente outros que não foram estudados, onde o AA pode ser mais necessário. A necessidade de uma maior quantidade de AA por parte do fígado é justificada pelo seu papel como órgão de desintoxicação, e o do rim cefálico pelo seu papel de órgão produtor de linfócitos. O aumento da concentração de AA no baço

será, deste modo, consequência directa da produção de linfócitos com maior concentração de AA por parte do rim cefálico.

Outra hipótese para explicar o aumento da utilização do AA, tem a ver com os mecanismos de toxicidade da amónia. O AA não está, aparentemente, directamente relacionado com o processo de desintoxicação da amónia, ao contrário de outros xenobióticos, que fazem uso do citocromo P450, cuja actividade depende do AA. A desintoxicação da amónia parece conduzir ao aumento da produção em muitos tecidos, como o cérebro e o fígado, de glutamina a partir do glutamato, numa reacção catalisada pela glutamina sintetase (Arillo *et al.*, 1981; Mommsen *et al.*, 1992; Vedel *et al.*, 1998). A desintoxicação da amónia também pode ser feita aumentando a excreção de ureia (Olson & Fromm, 1971; Person-Le Ruyet, *et al.*, 1997a; Person-Le Ruyet *et al.*, 1997b; Walsh *et al.*, 1990; Wright, 1993). Ambos os processos implicam o consumo de energia, pelo que conduzem à produção de radicais livres, os quais levam ao aumento das necessidades de antioxidantes, como é caso do AA. Os processos de desintoxicação da amónia ainda não foram devidamente clarificados nos peixes, no entanto, foram feitos alguns estudos neste domínio em ratos. Kosenko *et al.* (1997; 1998) mostraram que a injeção de acetato de amónia em ratos produzia uma diminuição da actividade das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (enzimas antioxidantes) no fígado e cérebro. Também observou que o tratamento conduzia ao aumento de 100% na produção do radical superóxido em ambos os tecidos. Kosenko *et al.* (1998), demonstrou que a amónia induz a formação aumentada de óxido nítrico, um radical livre que os autores propõem ser o principal responsável pela redução da actividade das enzimas antioxidantes. Eiserich *et al.* (1997) estudou a importância dos óxidos de azoto gerados pelo fumo dos cigarros na oxidação do AA. Os seus estudos mostraram que a oxidação do AA coincide com a acumulação de dióxido de azoto, o produto final da autooxidação do óxido nítrico, conduzindo à diminuição da concentração de AA. Também o aumento da produção de radicais livres e a diminuição da actividade das enzimas antioxidantes, leva a que a desintoxicação não enzimática dos radicais livres se torne mais importante. Os antioxidantes

não enzimáticos são, principalmente, a vitamina E, o AA e a glutathiona, cujos requisitos estão, provavelmente, aumentados nestas condições. Se os mecanismos de toxicidade da amónia descritos são idênticos nos peixes, o aumento dos requisitos de AA por exposição a amónia ambiental é facilmente compreendido. É possível que, após a mobilização do AA dos vários tecidos da dourada, se observe uma diminuição da sua concentração nos órgãos, como resultado da utilização aumentada do AA, tal como Thomas *et al.* (1982) observou no *Mugil cephalus* exposto ao cádmio.

Em conclusão, a exposição da dourada a concentrações elevadas de amónia ambiental parecem aumentar a taxa de utilização do AA e, conseqüentemente, os seus requisitos. No entanto, é necessária mais investigação neste campo, quer para a clarificação do papel do AA nos processos de desintoxicação da amónia, como na determinação dos verdadeiros processos de desintoxicação deste poluente nos peixes.

7. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

7.1. DISCUSSÃO GERAL

A produção de espécies aquáticas em cativeiro é uma actividade em franca expansão e de importância crescente face ao actual estado de sobrexploração e, em alguns casos, esgotamento de grande parte dos principais stocks de pesca. No entanto, a aquacultura apresenta maiores dificuldades do que a produção de animais terrestres, sendo esta última dominada pelo Homem há milhares de anos, ao contrário da primeira. O ambiente aquático, onde se movem os animais, começa por ser a principal dificuldade deste tipo de produção, uma vez que as suas características, tão distintas das do meio terrestre, obrigam a um controlo muito mais apertado das condições de cultura. Por outro lado, a própria investigação na área da produção aquática vê-se dificultada por estas mesmas características, o que impede a aplicação directa dos métodos desenvolvidos para os animais terrestres.

Para além dos problemas inerentes ao meio aquático, a aquacultura apresenta outros problemas. As espécies aquáticas não estão ainda completamente domesticadas e, logo, habituadas às condições de cativeiro e manejo que a sua cultura exige. Deste modo, quando estes animais se encontram em condições de cultura estão sujeitos a inúmeros factores de stress. em consequência desse stress, os aquacultores sofrem, muitas vezes, pesadas perdas económicas, uma vez que os animais não crescem à taxa esperada, bem como ficam mais susceptíveis a infecções e outras patologias, o que provoca mortalidades aumentadas. Este problema leva à procura de meios de protecção contra o stress, por forma a preservar o equilíbrio interno dos animais, evitando ou, pelo menos, diminuindo os efeitos nefastos do stress. OAA é uma substância que parece ter alguma acção de prevenção dos efeitos nefastos do stress nos peixes. Daí o interesse de estudar e determinar as reais potencialidades da utilização desta vitamina como

meio de prevenir o stress, já que a sua ministração é simples (suplementação do alimento) e o seu preço relativamente acessível.

O presente trabalho teve por objectivo clarificar um pouco mais o papel do AA na protecção do organismo dos peixes (neste caso específico, da dourada) quando expostos a factores de stress. A bibliografia sobre esta área específica apresenta resultados muito contraditórios, não permitindo saber exactamente se o AA tem ou não um papel protector em relação ao stress.

7.1.1. CRESCIMENTO E REQUISITOS DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Quando as espécies de peixes para as quais o AA é uma vitamina, não obtêm a concentração de AA necessária para a manutenção do metabolismo, desenvolve-se um quadro clínico de deficiência, o escorbuto. Um dos primeiros sintomas de deficiência de AA nos peixes é a diminuição do apetite e do crescimento, seguindo-se o aparecimento de outros sintomas e sinais tais como deformidades ósseas, principalmente lordoses e escolioses, hemorragias e exoftalmia. No presente estudo o crescimento da dourada e a observação do aparecimento dos sintomas de deficiência foram estudados.

Para a experiência de exposição à amónia (capítulo 6) eram requeridos peixes de tamanho médio e alimentados durante um longo período com os alimentos experimentais para estabilizar as concentrações de AA nos vários órgãos e para permitir a adaptação do seu metabolismo à disponibilidade da vitamina. Deste modo, douradas de aproximadamente 1.8g foram alimentadas até atingirem as 35-40g, o que levou aproximadamente 5 meses. Durante este período, Os resultados mostram que as douradas alimentadas sem suplementação de AA não apresentaram diferenças no crescimento em comparação com as douradas alimentadas com suplementação desta vitamina, e não desenvolveram escorbuto mesmo após 5 meses de crescimento. A maior parte da bibliografia mostra que os sintomas de deficiência em AA aparecem algumas semanas após a remoção desta vitamina da

alimentação dos peixes. Alexis *et al.* (1997) observaram os primeiros sintomas de deficiência em AA em dourada alimentada sem suplementação de AA ao fim de 20 de experiência. O peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) desenvolveu escorbuto ao fim de 14 semanas de alimentação sem suplementação de AA (Lovell, 1984). Gatlin III *et al.* (1986), na mesma espécie, observou o aparecimento de escorbuto ao fim de 13 de alimentação sem AA. Após 14 semanas de falta de AA no alimento o peixe-papagaio japonês (*Oplegnathus fasciatus*) apresentava diminuição da taxa de crescimento Ishibashi *et al.* (1992b). Na truta arco-íris com 0.6g o aparecimento de escorbuto deu-se ao fim de 20 semanas de alimentação deficiente em AA, no entanto, em trutas mais pequenas (0.15g) o escorbuto apareceu ao fim de 14 semanas Ikeda (1992). Este último autor, no mesmo trabalho, mostrou que a truta arco-íris com o peso inicial de 11.0 g não desenvolvia escorbuto mesmo após 40 semanas (aproximadamente 10 meses) de alimentação sem suplementação de AA. O facto de as douradas utilizadas na experiência descrita no capítulo 6 terem um peso inicial de 1.8 g pode ser a justificação da ausência de sintomas de escorbuto durante o período de crescimento. É possível que, se o crescimento tivesse sido prolongado durante mais algumas semanas, os sintomas de deficiência se tivessem desenvolvido.

A contradizer os resultados anteriores estão os resultados descritos no capítulo 4 (stress de hipóxia intermitente). Nesta experiência as douradas alimentadas com o alimento sem suplementação de AA apresentaram sintomas de escorbuto ao fim de 13 semanas de crescimento. No entanto, nesta experiência as douradas tiveram uma infecção parasitária, a qual pode ter sido a responsável pelo aparecimento precoce dos sintomas de deficiência em AA, tal como foi hipotetizado na discussão desse capítulo. Os resultados sugerem, deste modo, que a resposta imunitária à presença de parasitas fez uso das reservas de AA, aumentando os requisitos desta vitamina.

Os resultados encontrados neste estudo e na bibliografia mostram que, há dificuldades no estabelecimento de um período de tempo exacto para o desenvolvimento do escorbuto, quando os peixes são alimentados sem esta vitamina, no que se refere à mesma espécie. Na ausência de

factores de stress (ambientais, de poluição, de infecção, etc.) a justificação para este facto torna-se complicada.

O primeiro factor, que podese responsável por estas diferenças, é o tamanho inicial dos peixes submetidos a deficiência alimentar em AA. Os estudos de Ikeda (1992) e de Sato *et al.* (1978), efectuados em truta arco-íris, apontam para existência de uma maior necessidade de AA por parte dos peixes mais pequenos em relação aos maiores, já que os tempo necessário para desenvolverem os sintomas de deficiência aumentaram com o aumento do tamanho inicial dos peixes. Também em dourada parece existir a mesma relação já que, em douradas mais pequenas (0.5 g) do que as utilizadas em qualquer das experiências deste estudo (1.5 g foi o peso das mais pequenas), o escorbuto apareceu ao fim de 1 mês de alimentação deficiente em AA (Alexis *et al.*, 1997).

Para além do tamanho dos peixes, o alimento fornecido nas diferentes experiências pode também ter influenciado os resultados. Mesmo para a mesma espécie, diferentes autores utilizam diferentes alimentos nas suas experiências, podendo estes conter diferentes concentrações basais de AA. Isto é verdade para os alimentos composto e para os purificados em que não há o cuidado de utilizar caseína sem AA. A existência de AA derivado dos ingredientes constituintes do alimento pode ser o responsável pela disparidade nos resultados do desenvolvimento da deficiência em AA e da determinação do nível pratico de suplementação dos alimentos em AA. No presente estudo não foi possível quantificar a concentração real de AA nos alimentos dado que o método não está adaptado para a quantificação da forma poli-fosfatada utilizada.

A determinação do nível de suplementação em AA para o crescimento máximo da dourada foi também um dos objectivos do estudo. Para tal, foram utilizadas concentrações de AA progressivamente mais baixas, até ao mínimo de 10mg AA eq./kg alimento. Os resultados mostraram que 10 mg AA/kg alimento são suficientes para o crescimento máximo

da dourada, o principal indicador na determinação dos requisitos vitamínicos. Cho & Cowey (1993) também estimaram ser a concentração de 10 mg AA/kg alimento suficiente para o crescimento máximo da truta arco-íris. No robalo, *Dicentrarchus labrax*, Fournier *et al.* (2000) mostraram que a suplementação do alimento com apenas 5 mg AA/kg era suficiente para o crescimento máximo. A continuação de estudos de crescimento na dourada poderia conduzir à obtenção de resultados semelhantes ao do estudo efectuado no robalo. Em qualquer das espécies mencionadas, bem como em quaisquer outras, é possível que os requisitos para o crescimento máximo sejam ainda mais pequenos do que os até agora encontrados. No entanto, estes estudos levantam algumas questões: Será que os peixes são capazes de manter o crescimento máximo por tempo indeterminado com concentrações de AA tão baixas, ou acabarão por desenvolver sintomas de deficiência? Será que, quando na presença de factores de stress (como é o caso das condições de cultura comercial), esta concentração continua a ser suficiente para satisfazer as necessidades dos peixes ou será preciso fornecer uma concentração de AA mais elevada? Relativamente à última questão a experiência descrita no capítulo 4 fornece algumas pistas para a resposta. O facto de a infecção parasitária ter feito aparecer os sintomas de deficiência em AA mais cedo do que o previsto nos animais sem suplementação desta vitamina, indicam a possibilidade de este tipo de stress aumentar os requisitos de AA. Nesta situação, os indivíduos alimentados com suplementações tão baixas de AA podem acabar, também, por desenvolver sintomas de deficiência ou, pelo menos, reduzir a sua taxa de crescimento.

Outro factor que pode influenciar estes resultados é a possibilidade de existir biossíntese de AA, embora muito limitada, mas que seja suficiente para manter uma concentração corporal mínima. Hilton *et al.* (1979b) mostrou que a truta arco-íris sintetiza AA, embora a uma taxa muito reduzida. A possibilidade de existência de alguma biossíntese de AA, por parte da espécie dependentes do seu fornecimento alimentar, pode ser o motivo (ou mais um motivo) pelo qual, mesmo alimentados com alimentos sem suplementação de AA, os peixes demoram tanto tempo a desenvolver os sintomas de deficiência. A Tabela 6.3 mostra que, depois de 5 meses de

ausência de suplementação com AA, as douradas ainda apresentavam concentrações mensuráveis de AA nos órgãos (4 a 6 $\mu\text{g/g}$). A possibilidade de as douradas terem obtido esse nível mínimo de AA a partir do alimento parece ser pouco provável. Dado que o alimento foi produzido algumas semanas antes do início da experiência e que o AA na sua forma desprotegida (ácido L-ascórbico) é extremamente lábil, não é provável que este contivesse durante muito tempo a concentração residual inicial de AA.

7.1.2. ÁCIDO ASCÓRBICO E STRESS

A bibliografia existente sobre o papel protector do AA em relação ao stress apresenta resultados contraditórios, o que impede tirar conclusões fiáveis sobre este assunto. Realmente, os resultados dos vários autores não permitem dizer que o AA protege o organismos dos peixes quando estes são sujeitos ao stress em geral. No entanto, a mesma bibliografia parece indicar que existe realmente um papel protector do AA no caso de alguns factores de stress.

O tipo de stress cujas consequências fisiológicas parecem, mais consistentemente, ser minimizadas pelo AA é o stress de poluição. Agrawal *et al.* (1978) demonstrou que o AA protegia o peixe *channa punctatus* contra a aldrina (pesticida organoclorado). Os peixes alimentados com 0.25% de aldrina apresentaram uma mortalidade de 25% em 30 dias quando a sua dieta era suplementada com 1250 mg AA/kg alimento. A adição de mais 5000 mg AA/kg alimento fez diminuir 10 vezes a mortalidade. A exposição crónica ao toxafeno (insecticida) aumentou os requisitos de AA do peixe-gato e conduziu ao aparecimento de sintomas de deficiência devido à diminuição das reservas hepáticas de AA (Mayer *et al.*, 1978). Já a truta arco-íris não sofreu alterações significativas na concentração de AA no rim cefálico e no fígado devida à injeção intraperitoneal de um outro insecticida, o lindano (Dunier *et al.*, 1995). No que respeita à exposição dos peixes a concentrações elevadas de nitritos (a sua toxicidade está relacionada com a sua capacidade de oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, a qual não pode transportar oxigénio) tanto Scarano *et al.* (1991), em robalo, como Wise *et al.* (1988), em peixe-gato,

demonstraram que a concentração da metahemoglobina era reduzida conforme aumentava a concentração de AA no alimento. Os efeitos da exposição aguda e crónica ao cádmio no estatuto de AA e na acumulação do cádmio nos tecidos do mugem (*Mugil cephalus*) foram estudados por Thomas *et al.* (1982). A concentração de AA do fígado e brânquias diminuiu, aumentando massivamente a concentração de cádmio nesses mesmos órgãos, enquanto no rim e no cérebro as concentrações de AA foram menos afectadas. Em truta arco-íris Yamamoto & Inoue (1985) demonstraram que o tempo de sobrevivência dos peixes alimentados com um alimento contendo 6000 mg AA/kg aumentava significativamente comparado com os peixes alimentados com um alimento sem suplementação de AA e expostos a 0.14 ppm de cádmio na água. Thomas (1987) relatou que a exposição a frações hidrossolúveis de petróleo, ou de combustíveis dele derivados, causou uma diminuição do teor em AA no cérebro, brânquias, rim e fígado do mugem. As concentrações de AA do fígado estavam significativamente reduzidas após apenas uma semana de exposição, mas voltaram ao valor normal ao fim de 20 dias. O efeito do AA alimentar no metabolismo e excreção do Cobre alimentar e contido na água, foi revisto por Hilton (1989). De acordo com este autor, o AA parece não afectar a absorção, excreção e o metabolismo geral do cobre na truta arco-íris. Estes resultados estão em contradição com os obtidos com a exposição da carpa a cobre contido na água (0.05 ppm), onde foi demonstrado que o AA alimentar diminuía a toxicidade e a retenção do cobre nos tecidos (Ikeda, 1992).

O facto de o AA possuir a capacidade de proteger os peixes do stress de poluição, diminuindo a sua absorção e/ou diminuindo os seus efeitos fisiológicos nefastos, pode ser facilmente explicado. De facto, conforme foi mencionado no capítulo 1, o AA tem um papel importante no metabolismo das drogas e xenobióticos, pois o AA previne a perda de actividade do citocromo P₄₅₀, o qual é necessário para a “destruição” destas substâncias, as quais perdem o seu efeito nefasto sobre o organismo. No caso específico dos nitritos, a característica chave do AA é o seu poder antioxidante, o qual previne a formação da metahemoglobina.

No que respeita ao stress de exposição a agentes infecciosos os resultados são muito difíceis de interpretar. Apesar do AA ser essencial para o funcionamento do sistema imune, não está definitivamente provado que o aumento do nível de suplementação alimentar de AA trás um aumento da resistência dos peixes a agentes infecciosos. Os resultados descritos no capítulo 4 mostram que apenas a ausência de suplementação alimentar de AA produziu um aumento da susceptibilidade da dourada ao parasita *Diplectanum aequans*, não se observando diferenças na mortalidade entre os grupos alimentados com 50 ou 100 mg AA/kg alimento. No capítulo 1 estão descritos os resultados encontrados pela autora na bibliografia. Estes mostram que, um aumento da resistência a um determinado agente infeccioso só é observável quando o alimento é suplementado com doses de AA mais elevadas do que as utilizadas na experiência descrita no capítulo 4. É possível que, se tivessem sido utilizadas concentrações de 500 a 2000 mg AA/kg alimento, pudessem ser observadas diferenças na mortalidade, o que indicaria uma acção protectora do AA quando utilizado em mega-doses. A melhor justificação para as diferenças encontradas na bibliografia foi hipotetizada por Li *et al.* (1993) e encontra-se descrita no capítulo 1. Essa hipótese leva a considerar que, neste tipo de estudos, é necessário ter cuidado com a origem dos peixes, com a monitorização da presença de agentes infecciosos antes e durante as experiências, com os métodos de infecção, com a virulência das estirpes utilizadas e com o design das experiências, entre outros. Neste caso, a definição de um design experimental e condições standard talvez fosse o caminho a seguir para permitir a clarificação do papel do AA na resistência a doenças.

Finalmente, o stress ambiental, onde se integram os factores de stress utilizados para o presente estudo (hipóxia e amónia), é o grupo onde os resultados são mais díspares. No caso deste tipo de stress, o envolvimento do AA na sua resistência é avaliado principalmente de duas maneiras: através da observação de indicadores como a mortalidade, crescimento, aparecimento de sintomas de deficiência, alterações no padrão de secreção dos corticosteroides e quantificação de alterações fisiológicas específicas provocadas por factor de stress; através da observação dos

efeitos dos factores de stress sobre as reservas corporais de AA. Muitas vezes são utilizados ambos tipos de avaliação.

Um dos factores de stress onde os resultados são mais consistentes, demonstrando uma acção positiva do AA sobre os peixes a ele sujeitos, é o aumento da temperatura da água. O peixe-espinho, *Terapon jarbua*, cultivado a 36°C (Temperatura óptima = 28°C) desenvolveu deformidades quando alimentado com uma dieta sem suplementação de AA. A mortalidade desta mesma espécie aumentou com o aumento da temperatura da água, mas diminuiu com o aumento da suplementação alimentar de AA (Chien *et al.*, 1999). Wedemeyer (1969) observou uma diminuição marcada da concentração de AA no rim anterior do salmão coho exposto a um choque térmico de mais 7°C. Também Parihar observou uma diminuição do teor em AA no fígado (Parihar *et al.*, 1996), nas brânquias e bexiga natatória (Parihar *et al.*, 1995) do peixe-gato de água-doce (*Heteropneustes fossilis*) com o aumento da temperatura de cultura. O aumento da temperatura de cultura da truta arco-íris de 16 para 20°C produziu uma diminuição significativa da concentração de AA no fígado e um aumento da incidência de deformidades nos peixes alimentados sem suplementação de AA. Já Thomas (1984) não observou alterações no teor em AA do fígado do mugem, mas evidenciou uma diminuição deste parâmetro no cérebro.

Exceptuando o último trabalho citado, todos os outros apontam para um envolvimento do AA na protecção contra o stress térmico. Este envolvimento é facilmente explicável através dos resultados de Parihar. Nos seus estudos, este autor verificou que o aumento da temperatura produziu um aumento da peroxidação lipídica e do stress oxidativo no fígado, brânquias e bexiga natatória do peixe-gato de água-doce, bem como da actividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Parihar & Dubey, 1995; Parihar *et al.*, 1996; Parihar *et al.*, 1997). Dado que o AA é um importante antioxidante, o declínio da sua concentração nos órgãos, bem como a protecção contra a mortalidade dos peixes sujeitos a stress térmico é facilmente compreendido.

Outro tipo de stress estudado, pela sua relação com o manejo em aquacultura, é a manipulação dos peixes. Neste grupo inclui-se a captura com consequente exposição ao ar, confinamento, transporte e elevada densidade de cultura dos peixes. O transporte de truta arco-íris durante 3h não produziu alterações significativas na concentração de AA do fígado, rim e intestino (Dabrowski & Ciereszko, 1993). O mugem sujeito ao stress de manejo (captura, confinamento e exposição ao ar) diminuiu a concentração de AA no rim e brânquias, mas não no fígado e cérebro (Thomas, 1984). A captura e exposição ao ar da dourada não produziu alterações significativas do estatuto de AA no fígado, rim, músculo e plasma (Henrique *et al.*, 1996). Sandnes & Waagbø (1991) também não observaram alterações significativas no teor de AA do rim cefálico do salmão Atlântico após o esvaziamento sucessivo do tanque de cultura. Mesmo quando este último tipo de stress foi aplicado de forma intermitente ao longo de 50 dias, não produziu alterações significativas do nível de AA no fígado e plasma do rodvalho (Gouillou-Coustans & Guillaume, 1993). O stress provocado pelo confinamento também não produziu alterações significativas do estatuto de AA do peixe-gato (Li *et al.*, 1998) nem do salmão Atlântico (Thompson *et al.*, 1993). Já o aumento da densidade de stockagem, através da diminuição da altura da coluna de água provocou a diminuição significativa do nível de AA no fígado, rim e baço da dourada (Henrique *et al.*, 1996) e no rim do salmão coho (Wedemeyer, 1969).

Este último grupo de factores de stress apresenta resultados heterogéneos. Embora alguns factores mostrem sistematicamente um efeito ou ausência de efeito de protecção ou de aumento dos requisitos do AA, outros mostram resultados opostos em estudos diferentes. A primeira questão que se coloca é se as várias espécies diminuem a o nível de AA em órgãos diferentes quando expostas ao mesmo factor de stress. A segunda questão é se diferentes factores de stress conduzem à diminuição da concentração de AA em órgãos diferentes. No caso de resposta afirmativa a ambas as questões talvez sejam de considerar não as alterações no teor de AA de

órgãos individuais mas, antes, do corpo todo. Ou, alternativamente, investigar que órgão é afectado por um determinado factor de stress em cada espécie.

O último grupo de factores de stress é o stress ambiental ou fisico-químico. Neste grupo incluem-se as alterações de salinidade, da concentração de OD, da concentração de amónia, a turbidez, entre outros. Também neste tipo de stress os resultados bibliográficos não são conclusivos. A exposição da dourada a uma salinidade de 20‰ ou 12‰ durante 24h não alterou significativamente o teor em AA do fígado, rim, baço, músculo e plasma (Henrique *et al.*, 1996). Já Thomas, 1984 observou alterações em diversos órgãos do mugem exposto a uma salinidade de 5‰ durante 2 semanas. Durante o período de exposição ao stress, observou-se uma descida significativa do nível de AA no fígado ao fim de 1 dia de stress, voltando no dia 7 ao valor inicial e mantendo-se nessa concentração até ao final da experiência. O teor de AA das brânquias aumentou significativamente ao fim de 12h de stress e não se alterou mais até ao final. Contrariamente, no rim a concentração de AA decresceu significativamente nas primeiras 12 h de exposição e manteve-se estável até ao final da experiência. Finalmente, observou-se um aumento significativo do AA no cérebro no 2º dia de exposição ao stress, mas no final da experiência a sua concentração de AA atingiu o valor inicial.

Seguidamente irão ser apresentados e discutidos os resultados bibliográficos referentes ao stress de hipóxia, os quais vão ser comparados com os resultados obtidos em 3 das experiências que constituem este trabalho. O peixe-gato alimentado com um alimento sem suplementação de AA morreu a níveis de oxigénio residual significativamente mais elevados do que os peixes alimentados com um nível médio (78 mg/kg) ou elevado (390 mg/kg) de AA (Mazik *et al.*, 1987). Ishibashi *et al.* (1992a) verificou que o tempo necessário para a morte de 50% (LTD50) dos peixes-papagaio Japoneses a uma concentração de OD de 0.8 ml/l aumentava proporcionalmente ao nível de AA no alimento, e que o tempo necessário para ocorrer a morte do primeiro peixe-papagaio pintalgado (*Oplegnathus punctatus*) a um OD de 0.8 ml/l aumentava com a suplementação de AA. O peixe-papagaio Japonês sujeito a stress de hipóxia

intermitente e alimentado sem AA exibiu mais cedo os sintomas de deficiência, cresceram significativamente menos e tiveram uma maior mortalidade que o seu controlo (Ishibashi *et al.*, 1992b). Mesmo quando alimentado com 750 mg AA/ kg alimento o crescimento e a mortalidade foram negativamente afectados pelo stress. Apenas com uma suplementação de 3000 mg AA/kg alimento estes parâmetros não foram quase afectados.

No presente trabalho, a dourada foi submetida a stress de hipóxia aguda (OD = 1.2 mg/l, 24h), intermitente (OD = 25%, 1 X/semana) e crónica (OD = 55%, c^{te}). Em nenhuma das experiências de stress de hipóxia se verificaram efeitos negativos do stress, quer no que respeita à mortalidade, crescimento ou ao teor em AA nos órgãos. Ao comparar com os resultados dos estudos supracitados, várias hipóteses podem ser formuladas para justificar o facto de não ter sido evidenciado um papel protector do AA neste trabalho. A primeira é que os níveis de suplementação em AA não foram suficientemente elevados para ser observada a sua acção na resistência ao stress. No entanto, esta hipótese não parece ser a correcta já que, se o nível de suplementação fosse superior, verificar-se-ia a saturação dos tecidos e não seria observável uma eventual diminuição do seu teor em AA. Aliás, ao comparar o teor em AA do fígado dos peixes-papagaio Japonês e pintalgado (Ishibashi *et al.*, 1992a; Ishibashi *et al.*, 1992b) alimentados com mega-doses de AA (30-3000 mg/kg alimento), verificou-se que estes eram da mesma ordem de valor da dourada alimentada com 10-200 mg AA/ kg alimento (capítulos 3, 4 e 5). A segunda hipótese é a de que os níveis de OD aplicados para o stress não foram suficientemente stressantes. Mais uma vez, esta hipótese é refutada pela observação da alteração de comportamento (hipóxia aguda e crónica), indução de alguma mortalidade (hipóxia intermitente) e diminuição do nível de saciedade (hipóxia crónica) das douradas sujeitas ao stress, em comparação com os seus controlos. Finalmente, hipotetizou-se que a dourada pode ser uma espécie mais resistente ao stress de hipóxia do que as utilizadas pelos outros autores. Para a confirmação desta hipótese seria necessário efectuar estes mesmos procedimentos experimentais a outras espécies.

A última experiência deste trabalho (capítulo 6) debruçou-se sobre o papel do AA na protecção da dourada em relação a concentrações elevadas de amónia na água. No que respeita a este tema, apenas uma referencia foi encontrada, a qual mostra que o peixe-gato alimentado sem suplementação de AA e exposto a níveis elevados de amónia, exibiu valores de LC50 (24, 48, 72 e 96h) do que alimentado com AA (Mazik *et al.*, 1987). No entanto, o nível de suplementação em AA não interferiu nos valores de LC50. No presente trabalho também foi evidenciado um papel do AA na intoxicação com amónia. De facto, apesar de ausência de AA no alimento não ter resultado num aumento da mortalidade durante a exposição à concentração subletal de amónia, foi observado um aumento, por vezes significativo, da concentração de AA no rim cefálico, fígado e baço, o qual foi devido à influência do stress. O significado deste aumento do teor em AA nos órgãos da dourada foi já discutido no capítulo 6, pelo que não será aqui repetido. No entanto, o que merece ser salientado é o quão inesperados foram estes resultados, já que a bibliografia descreve, geralmente, uma diminuição dos níveis de AA nos órgãos em consequência da exposição ao stress. É possível que este aumento fosse apenas transitório e que, se a experiência fosse prolongada ou se o teor em AA nos órgãos fosse monitorizado durante mais algum tempo depois do fim do stress, se verificasse uma diminuição do nível de AA. Alternativamente, poderia ser medido o teor em AA total no peixe, o que permitiria verificar se houve um consumo de AA devido ao stress.

Há ainda muito trabalho a fazer nesta área para clarificar o real papel do AA na resistência ao stress. Para já fica a ideia de que o AA não aumenta a resistência dos peixes a qualquer tipo de stress, tendo, no entanto, esta acção no caso de stress devido à acção de poluentes e outros xenobióticos, bem como em casos em que o stress provoque um aumento dos radicais livres, como é o caso do stress de hipertermia. Também parece evidente que a ausência de AA na alimentação diminui a resistência a determinados stress, como é o caso de agentes infecciosos, e que uma suplementação, mesmo com uma quantidade mínima, de AA é suficiente para normalizar essa resistência. Neste momento coloca-se a questão do benefício do

fornecimento de mega-doses de AA aos peixes no intuito de aumentar a resistência ao stress. do que foi analisado na bibliografia, as mega-doses poderão ter este efeito apenas no que respeita ao stress por agentes infecciosos, já que alguns autores demonstraram um aumento da actividade do sistema imune (ver capítulo 1). No entanto, os resultados ainda são pouco claros e mais investigação deve ser efectuada.

Do que aqui foi dito fica a ideia da necessidade de estudos mais aprofundados nesta área, pois o papel do AA na resistência ao stress é um tema que ainda está longe de estar esclarecido.

7.2. CONCLUSÕES

- ✓ O desenvolvimento de sintomas de deficiência em AA na dourada com um peso ≥ 1.5 g e alimentadas com um alimento composto sem suplementação de AA, parece dar-se apenas ao fim de um período muito longo (vários meses).
- ✓ A presença de agentes infecciosos parece precipitar o aparecimento dos sintomas de deficiência em AA nas douradas privadas desta vitamina.
- ✓ A dourada alimentada sem suplementação de AA parece ser mais susceptível ao parasita *Diplectanum aequans*, o qual provoca mortalidades aumentadas.
- ✓ Mesmo após um período de 5 meses de alimentação sem suplementação de AA, as douradas detêm um nível mensurável de AA nos tecidos (4-6 $\mu\text{g/g}$).
- ✓ O requisito de AA da dourada para o crescimento máximo e impedir o desenvolvimento de escorbuto é de 10 mg AA/kg alimento.
- ✓ O stress de hipoxia aguda, intermitente ou crónica não parece alterar significativamente a concentração de AA no fígado, rim e baço da dourada.

✔ O estatuto de AA da dourada parece não ter influência na resistência desta ao stress de hipóxia, seja este agudo, intermitente ou crónico.

✔ O stress devido à exposição da dourada a um nível subletal de amónia conduz ao aumento da concentração de AA no fígado, rim e baço, pelo que esta vitamina parece estar envolvida na desintoxicação da amónia. Este aumento parece ser devido à mobilização desta vitamina a partir de outros órgãos onde esta é, aparentemente, menos necessária nesta situação extrema.

✔ O rim é o órgão, de entre os estudados, que apresenta a maior concentração de AA, na dourada. O baço é o órgão mais sujeito a flutuações da concentração de AA, as quais se explicam pela existência de fenómenos de sequestro e libertação de leucócitos por parte deste órgão.

✔ Não parece que o AA tenha um papel importante na resistência a todos os tipos de stress.

✔ O facto de o AA ter um papel na resistência a um determinado factor de stress, parece depender de esse factor provocar alterações metabólicas que exijam um maior envolvimento desta vitamina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, N. K. & Mahajan, C. L. (1980). Comparative tissue ascorbic acid studies in fishes. *J. Fish Biol.*, 17: 135-141.
- Agrawal, N. K.; Jujena, C. J. & Mahajan, C. L. (1978). Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. *Toxicology*, 11: 369-375.
- Akand, A. M., Sato, M., Yoshinaka, R. & Ikeda, S. (1987). Haematological changes due to dietary ascorbic acid deficiency at various levels of calcium and phosphorus in rainbow trout. *Cur. Sci.*, 56: 298-301.
- Al-Akel, A. S. (1994). Effect of asphyxiation on chichlid fish *Oreochromis niloticus*: Biochemical and haematological responses. *Pakistan. J. Zool.*, 26: 231-235.
- Al-Amoudi, M. M., El-Nakkadi, A. M. N. & El-Nouman, B. M. (1992). Evaluation of optimum dietary requirements of vitamin C for the growth of *Oreochromis spilurus* fingerlings in water from the red sea. *Aquaculture*, 105: 165-173.
- Alexis, M. N., Kalogeropoulos, N. & Argyropoulou, V. (1990). Ascorbic acid distribution in tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to dietary levels and feeding period. Em: Takeda, M & Watanabe, T (Eds.) *Proceedings of the 3rd International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*, 28 de Agosto a 1 de Setembro de 1989, Toba - Japão: 401-409.
- Alexis, M. N., Karanikolas, K. K. & Richards, R. H. (1997). Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 151: 209-218.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) (1983). Official methods of analysis. 13th Edition. AOAC, Washington, DC.
- Aoe, H. & Masuda, I. (1967). Water-soluble vitamins requirements of carp. 2. Requirements for *p*-aminobenzoic acid and inositol. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 33: 674-680.
- Arai, S.; Nose, T. & Hashimoto, Y. (1972). Qualitative requirements of young eels, *Anguilla japonica*, for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms. *Bull. Freshwater Res. Lab. Tokyo*, 22: 69-83.
- Arillo, A., Margiocco, C., Melodia, F., Mensi, P. & Schenone, G. (1981). Ammonia toxicity mechanism in fish: studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Ecotox. Env. Safety*, 5: 316-328.
- Ashe, D., Tomasso, J. R. & Eversole, A. G. (1996). Toxicity of ammonia to fingerling white bass: effect of selected environments on uptake dynamics. *Prog. Fish-Cult.*, 58: 277-280.
- Audet, C., FitzGerald, G. J. & Guderley, H. (1986). Photoperiod effects on plasma cortisol levels in *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61: 76-81.
- Avella, M., Young, G., Prunet, P. & Schreck, C. B. (1990). Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture*, 1990: 359-372.
- Bandeem, J. & Leatherland, J. F. (1997). Transportation and handling stress of white suckers raised in cages. *Aquacult. Int.*, 5: 385-396.
- Barry, T. P., Lapp, A. F., Kayes, T. B. & Malison, J. A. (1993). Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*, 117: 351-363.
- Barton, B. A. & Dwyer, W. P. (1997). Physiological stress effects of continuous- and pulsed-DC electroshock on juvenile bull trout. *J. Fish Biol.*, 51: 998-1008.

- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- Barton, B. A. & Zitzow, R. E. (1995). Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *Prog. Fish-Cult.*, 57: 267-276.
- Barton, B. A., Schreck, C. B. & Fowler, L. G. (1988). Fasting and diet content affect stress-induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile chinook salmon. *Prog. Fish-Cult.*, 50: 16-22.
- Barton, B. A.; Schreck, C. B.; Ewing, R. D.; Hemmingsen, A. R. & Patiño, R. (1985). Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 59: 468-471.
- Barton, B. A., Rahn, A. B., Feist, G., Bollig, H. & Schreck, C. B. (1998). Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120 A: 355-363.
- Bender, D. A. (1992). Nutritional biochemistry of the vitamins. Em: University Press: 431 pp.
- Bendich, A. (1992). Ascorbic acid and immune functions (Review). Em: Wenk, C.; Fenster, R. & Völker, L. (Eds.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9 a 12 Outubro de 1990, Kartause Ittingen-Switzerland: 408-421.
- Bennett, W. A. & Beitinger, T. L. (1995). Overview of techniques for removing oxygen from water and a description of a new oxygen depletion system. *Prog. Fish-Cult.*, 57: 84-87.
- Bigelow, J. C.; Brown, D. S. & Wightman, R. M. (1984). gamma-Aminobutyric acid stimulates the release of endogenous ascorbic acid from rat striatal tissue. *J. Neurochem.*, 42: 412-419.
- Blakeslee, J. R.; Yamamoto, N. & Hinuma, A. (1985). Human T-cell leukemia virus I induction by 5-iodo-2'-deoxyuridine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: inhibition by retinoids, L-ascorbic acid, and dl-alpha-tocopherol. *Cancer Res.*, 45: 3471-3476.
- Bollard, B. A., Pankhurst, N. W. & Wells, R. M. G. (1993). Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Sparidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106 A: 157-162.
- Boonyaratpalin, M., Unprasert, N. & Buranapanidgit, J. (1992). Optimal dietary ascorbic acid level and ascorbic acid deficiency symptoms in sea bass (*Lates calcarifer*). Em: Wenk, C.; Fenster, R. & Völker, L. (Eds.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9 a 12 Outubro de 1990, Kartause Ittingen-Switzerland: 408-421.
- Bennett, W. A. & Beitinger, T. L. (1995). Overview -407.
- Borger, R., De Boeck, G., Van Audekerke, J., Dommissie, R., Blust, R. & Van der Linden, A. (1998). Recovery of the energy metabolism after a hypoxic challenge at different temperature conditions: a ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy study with common carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120 A: 143-150.
- Bourgeois, C. F., Chartois, H. R., Coustans, M. F. & George, P. R. (1989). Dosage automatisé de la vitamine C dans les aliments et les milieux biologiques. *Analisis*, 17: 519-525.
- Brett, J. R. & Blackburn, J. M. (1981). Oxygen requirements for growth of young coho (*Oncorhynchus kisutch*) and sockeye (*O. nerka*) salmon at 15°C. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 399-404.
- Brodeur, J. C., Daniel, C., Ricard, A. C. & Hontela, A. (1998). In vitro response to ACTH of the interrenal tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 42: 103-113.
- Brown, J. A. & Whitehead, C. (1995). Catecholamine release and interrenal response of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to aluminium in acidic water. *J. Fish Biol.*, 46: 524-535.

- Caldwell, C. A. & Hinshaw, J. (1994). Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture*, 126: 183-193.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G. & Sumpter, J. P. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.
- Carmichael, G. J., Tomasso, J. R., Simco, B. A. & Davis, K. B. (1984). Confinement and water quality-induced stress in largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113: 767-777.
- Carragher, J. F. & Rees, C. M. (1994). Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107 A: 49-56.
- Carragher, J. F. & Sumpter, J. P. (1990). Corticosteroid physiology in fish. *Prog. Comp. Endocrinol.*, 342: 487-492.
- Cecchini, S., Saroglia, M., Berni, P. & Cognetti-Varriale, A. M. (1998). Influence of temperature on the life cycle of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae), parasitic on sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 21: 73-75.
- Cech, J., J J, Bartholow, S. D., Young, P. S. & Hopkins, T. E. (1996). Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 125: 308-320.
- Chatterjee, I. B. (1973). Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182: 1271-17-72.
- Chatterjee, I. B. (1978). Ascorbic acid metabolism. *Wld Rev. Nutr. Diet.*, 30: 69-87.
- Chatterjee, I. B., Majumder, A. K., Nandi, B. K. & Subramanian, N. (1975). Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 258: 24-47.
- Chiba, K. (1988). The effect of dissolved oxygen on the growth of young ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 175-181.
- Chick, H. (1975). The discovery of vitamins. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1: 1-20.
- Chien, L. T., Hwang, D. F. & Jeng, S. S. (1999). Effect of thermal stress on dietary requirement of vitamin C in thornfish *Terapon jarbua*. *Fish. Sci.*, 65: 731-735.
- Cho, C. Y. & Cowey, C. B. (1993). Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice* 61, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 149-156.
- Combs, J. G. F. (1998). The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. Em: 2nd Ed., Academic Press: 618 pp.
- Comte, S. (1995). Les indicateurs sanguins, plasmatiques et cellulaires du stress a court terme chez les poissons. Tese de Doutorado. Universidade de Nantes, França.
- Conney, A. H.; Bray, G. A.; Evans, C. & Burns, J. J. (1961). Metabolic interactions between L-ascorbic acid and drugs. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 92: 115-127.
- Coustans, M. F. & Guillaume, J. (1986). Carence en acid ascorbic chez le turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *C.I.E.M.-C.M.*, F:29: 9pp.
- Coustans, M. F., Guillaume, J., Metailler, R., Dugornay, O. & Messenger, J.-L. (1990). Effect of an ascorbic acid deficiency on tyrosinemia and renal granulomatous disease in turbot (*Scophthalmua maximus*) interaction with a slight polyhypovitaminosis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97 A: 145-152.
- Dabrowska, H., Dabrowski, K., Meyer-Burgdorff, K., Hanke, W. & Gunther, K. D. (1991). The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp, *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99 A: 681-685.

- Dabrowski, K. (1994). Primitive actinopterigian fishes can synthesize ascorbic acid. *Experientia*, 50: 745-748.
- Dabrowski, K. & Ciereszko, A. (1993). Influence of fish size, origin, and stress on ascorbate concentration in vital tissues of hatchery rainbow trout. *Prog. Fish-Cult.*, 55: 109-113.
- Dabrowski, K., Lackner, R. & Doblander, C. (1990). Effect of dietary ascorbate on the concentration of tissue ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic sulfate, and activity of ascorbic sulfate sulfohydrolase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 1518-1525.
- Dabrowski, K., Matusiewicz, K., Matusiewicz, M., Hoppe, P. P. & Ebeling, J. (1996a). Bioavailability of vitamin C from two ascorbyl monophosphate esters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Nutr.*, 2: 3-10.
- Dabrowski, K., Moreau, R. & El-Saidy, D. (1996b). Ontogenic sensitivity of channel catfish to ascorbic acid deficiency. *J. Aquat. An. Health*, 8: 22-27.
- Dantzer, C. & Mormede, P. (1979). Le stress en élevage intensif. I.N.R.A. Actualités Scientifiques et agronomiques, Editions Masson, Paris: 210pp.
- Davis, K. B. & Parker, N. C. (1983). Plasma corticosteroid and chloride dynamics in rainbow trout, atlantic salmon, and lake trout during and after stress. *Aquaculture*, 32: 189-194.
- Davis, K. B. & Parker, N. C. (1990). Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*, 91: 349-358.
- Donaldson, E. M. (1981). The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering, A. D. (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press: 11-47.
- Dosdat, A., Gaumet, F. & Chartois, H. (1995). Marine aquaculture effluent monitoring: methodological approach to the evaluation of nitrogen and phosphorus excretion by fish. *Aquacult. Eng.*, 14: 59-84.
- Drath, D. B. & Karnovsky, M. L. (1974). Bactericidal activity of metal-mediated peroxide-ascorbate systems. *Infect. Immun.*, 10: 1077-1083.
- Dunier, M., Vergnet, C., Siwicki, A. K. & Verlhac, V. (1995). Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. IV. Prevention of nonspecific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (ascorbate-2-polyphosphate). *Ecotox. Env. Safety*, 30: 259-268.
- Durve, V. S. & Lovell, R. T. (1982). Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948-951.
- Eiserich, J. P., Cross, C. E. & van der Vliet, A. (1997). Nitrogen oxides are important contributors to cigarette smoke-induced ascorbate oxidation. Em: Packer, L., Fuchs, J. (Eds.) *Vitamin C in Health and Disease*. Maedel Dekker, New York, pp. 399-412.
- Ellis, A. E. (1981). Stress and modulation of defence mechanisms in fish. Em: Pickering, A. D. (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press: 146-169.
- Ellis, A. E. & de Sousa, M. A. B. (1974). Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in the plaice. *Europ. J. Immunol.*, 4: 338-343.
- Evans, R. M.; Currie, L. & Campbell, A. (1982). The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. *Br. J. Nutr.*, 47: 473-482.
- Eya, J. C. (1996). "Broken-skull disease" in African catfish *Clarias gariepinus* is related to a dietary deficiency of ascorbic acid. *J. World Aquacult. Soc.*, 27: 493-498.

- Felton, S. P., Luzzana, U. & Felton, H. M. (1998). Vitamin C lost during adaptation to salt water: ascorbic acid and ascorbyl-2-sulphate measured in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquacult. Res.*, 29: 609-610.
- Fevolden, S. E., Refstie, T. & Gjerde, B. (1993a). Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, 118: 205-216.
- Fevolden, S. E. & Røed, K. H. (1993b). Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. *J. Fish Biol.*, 43: 919-930.
- Flos, R., Reig, L., Torres, P. & Tort, L. (1988). Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 71: 99-106.
- Foo, J. T. W. & Lam, T. J. (1993). Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 145-158.
- Fournier, V., Guillou-Coustans, M. F. & Kaushik, S. J. (2000). Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Nutr.*, 130: 617-620.
- Gabaudan, J., Weier, W., Verlhac, V. & Wahli, T. (1992). Influence of the dietary source and dosage of vitamin C in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): metabolism, histology and immunity. Em: Wenk, C.; Fenster, R. & Völker, L. (Eds.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9 a 12 Outubro de 1990, Kartause Ittingen-Switzerland: 408-421.
- Bennett, W. A. & Beitinger, T. L. (1995). Overview 357-377.
- Gatlin III, D. M., Poe, W. E., Wilson, R. P., Ainsworth, A. J. & Bowser, P. R. (1986). Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 56: 187-195.
- Guillou-Coustans, M. F. (1990). Étude des effets de la carence en acide ascorbique chez le turbot *Scophthalmus maximus* L. Tese de doutoramento. Universidade da Bretanha Ocidental.
- Guillou-Coustans, M. F. & Guillaume, J. (1993). Effect of a non specific stressor on the symptoms of ascorbic acid deficiency in turbot (*Scophthalmus maximus*). Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice 61*, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 209-213.
- Guillou-Coustans, M. F. & Guillaume, J. (1999). Nutrition vitaminique. Em: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Métailler, R. (Eds.), *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. INRA Editions/IFREMER: 187-212.
- Grant, B. F. & Mehrle, P. M. (1973). Endrin toxicosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 30: 31-40.
- Halim, Y., Faisal, M. & Ahmed, I. (1985). Fish diseases, an index of water pollution : a review. *FAO/UNEP Meeting on the effects of Pollution on Marine Ecosystems*, 7 a 11 de Outubro de 1985, Blanes-Espanha, FAO Rep. Suppl. n° 352: 97-104.
- Halpner, A. D., Handelman, G. J., Belmont, C. A., Harris, J. M. & Blumberg, J. B. (1998). Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 9: 355-359.
- Halver, J. E. (1972). The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38: 79-92.
- Halver, J. E.; Ashley, L. M. & Smith, R. E. (1969). Ascorbic acid requirement of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Am. Fis. Soc.*, 98: 762-771.
- Halver, J. E., Smith, R. R., Tolbert, B. M. & Baker, E. M. (1975). Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 81-102.

Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K. & Lie, Ø. (1997). Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Rad. Biol. Med.*, 22: 137-149.

Haney, D. C.; Hursh, D. A.; Mix, M. C. & Winton, J. R. (1992). Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, 4: 48-57.

Hardie, L. J., Fletcher, T. C. & Secombes, C. J. (1991). The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.

Hemre, G. I., Lambertsen, G. & Lie, Ø. (1991). The effect of dietary carbohydrate on stress response in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 95: 319-328.

Henrique, M. M. F., Gomes, E. F., Gouillou-Coustans, M. F., Oliva-Teles, A. & Davies, S. J. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415-426.

Henrique, M. M. F., Morris, P. C. & Davies, S. J. (1996). Vitamin C status and physiological response of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to stressors associated with aquaculture. *Aquacult. Res.*, 27: 405-412.

Herrmann, R. B., Warren, C. E. & Doudoroff, P. (1962). Influence of oxygen concentration on the growth of juvenile coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 91: 155-167.

Hilton, J. W. (1984). Ascorbic acid - mineral interactions in fish. Em: Wegger, I.; Tagwerker, F. J. & Moustgaard, J. (Eds.) *Proceedings of workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 1983, Skjoldenæsholm-Suiça: 218-224.

Hilton, J. W. (1989). The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79: 223-244.

Hilton, J. W., Brown, R. G. & Slinger, S. J. (1979a). The half-life and uptake of ¹⁴C-1-ascorbic acid in selected organs of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 62 A: 427-432.

Hilton, J. W., Cho, C. Y., Brown, R. G. & Slinger, S. J. (1979b). The synthesis, half-life and distribution of ascorbic acid in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63 A: 447-453.

Hilton, J. W., Cho, C. Y. & Slinger, S. J. (1978). Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 431-436.

Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A. & Okihiro, M. S. (1992). Histopathological biomarkers. Em: Huggett, R. B.; Kimerle, R. A.; Mehre, Jr., P. M. & Bergman, H. L. (Eds.) *Biomarkers. Biochem., Physiol. and Histol. Markers of Anthropogenic Stress. Proc. 8th Pellston Workshop*, 23 a 28 de Julho de 1989, Keystone, Colorado-USA: 155-209.

Hopkins, T. E. & Cech Jr., J. J. (1992). Physiological effects of capturing striped bass in gill nets and fyke traps. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121: 819-822.

Hornig, D. (1975). Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 103-118.

Hosokawa, H. (1989) The vitamin requirements of fingerling yellowtail, *Serial quinquerediata*. Tese de Doutorado. Universidade de Kochi, Japão.

Hughes, R. E.; Jones, P. R.; Williams, R. S. & Wight, P. F. (1971). Effect of prolonged swimming on the distribution of ascorbic acid and cholesterol in the tissues of the guinea pig. *Life Sci.*, 10: 661-668.

Hung, S. S. O. (1989). Choline requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 78: 183-194.

- Hunn, J. B. & Greer, I. E. (1991). Influence of sampling on the blood chemistry of Atlantic salmon. *Prog. Fish-Cult.*, 53: 184-187.
- Ikeda, S. (1988). Vitamin C and Biosynthesis of collagen. *Scientific Information from Takeda Chemical Industries, Ltd.*: 4pp.
- Ikeda, S. (1992). Importance of ascorbic acid to fish farming. Em: Wenk, C.; Fenster, R. & Völker, L. (Eds.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9 a 12 Outubro de 1990, Kartause Ittingen-Switzerland: 408-421.
- Ikeda, S.; Ishibashi, Y.; Murata, O.; Nasu, T. & Harada, T. (1988). Qualitative requirements of the Japanese parrot fish for water-soluble vitamins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 54: 2029-2035.
- Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T. & Kumai, H. (1992a). Effect of dietary ascorbic acid on the tolerance for low oxygen stress in fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1555.
- Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T. & Kumai, H. (1992b). Effect of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2147-2152.
- Järvis, T. (1990). Cumulative acute physiological stress in Atlantic salmon smolts: the effect of osmotic imbalance and the presence of predators. *Aquaculture*, 89: 337-350.
- Johansson, O. & Wedborg, W. (1980). The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperature between 5 and 25°C. *J. Solut. Chem.*, 91: 37-44.
- Kato, R.; Tanaka, A. & Oshima, T. (1969). Effect of vitamin C deficiency on metabolism of drugs and NADPH-linked electron transport system in liver microsomes. *Jap. J. Pharmacol.*, 19: 25-33.
- Kaushik, S. J., Gouillou-Coustans, M. F. & Cho, C. Y. (1998). Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and sea bass using practical and purified diets. *Aquaculture*, 161: 463-474.
- Ketola, H. G. (1976). Choline metabolism and nutritional requirement of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *J. Anim. Sci.*, 43: 474-477.
- Kitamura, S.; Ohara, S.; Suwa, T. & Nakagawa, K. (1965). Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* L. 1. On the ascorbic acid. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 31: 818-825.
- Kitamura, S.; Suwa, T.; Ohara, S. & Nakagawa, K. (1967a). Studies on vitamin requirements of rainbow trout. 3. Requirement for vitamin A and deficiency symptoms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 33: 1126-1131.
- Kitamura, S.; Suwa, T.; Ohara, S. & Nakagawa, K. (1967b). Studies on vitamin requirements of rainbow trout. 2. The deficiency symptoms of fourteen kinds of vitamin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 33: 1120-1125.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C. & Felipo, V. (1997). Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Rad. Res.*, 27: 637-644.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Kaminsky, A., Hermenegildo, C. & Felipo, V. (1998). Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant enzymes induced by ammonia intoxication. *Metab. Brain Dis.*, 13: 29-41.
- Krasnov, A., Reinisalo, M., Pitkänen, T. I., Nishikimi, M. & Mölsä, H. (1998). Expression of rat for L-gulonolactone oxidase, the key enzyme of L-ascorbic acid biosynthesis, in guinea pig cells and in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1381: 241-248.

- Laidley, C. W.; Woo, P. T. K. & Leasherland, J. F. (1988). The stress response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *J. Fish. Biol.*, 32: 253-261.
- Lall, S. P. & Olivier, G. (1993). Role of Micronutrients in Immune Response and Disease Resistance in Fish. Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice* 61, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 101-118.
- Lall, S. P.; Olivier, G.; Weerakoon, D. E. M. & Hines, J. A. (1989). The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Em: Takeda, M & Watanabe, T (Eds.) *Proceedings of the 3rd International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*, 28 de Agosto a 1 de Setembro de 1989, Toba - Japão: 427-441.
- Langhorne, P. & Simpson, T. H. (1986). The Interrelationship of Cortisol, Gill (Na+K) ATPase, and Homeostasis During the Parr-Smolt Transformation of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 61: 203-213.
- Leach, G. J. & Taylor, M. H. (1980). The Role of Cortisol in Stress-Induced Metabolic Changes in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 42: 219-227.
- Leatherland, J. F. (1985). Studies of the correlation between stress-response, osmoregulation and thyroid physiology in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 A: 523-531.
- Levine, M. & Morita, K. (1985). Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitam. Horm.*, 42: 1-64.
- Li, Y. & Lovell, R. T. (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *J. Nutr.*: 123-131.
- Li, M. H., Johnson, M. R. & Robinson, E. H. (1993). Elevated Dietary Vitamin C Concentrations did not Improve Resistance of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Against *Edwardsiella ictaluri* Infection. *Aquaculture*, 117: 303-312.
- Li, M. H., Wise, D. J. & Robinson, E. H. (1998). Effect of Dietary Vitamin C on Weight Gain, Tissue Ascorbate Concentration, Stress Response, and Disease Resistance of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 29: 1-8.
- Lim, C. & Lovell, R. T. (1978). Pathology of the Vitamin C Deficiency Syndrome in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 108: 1137-1146.
- Liu, P. R.; Plumb, J. A.; Guerin, M. & Lovell, R. T. (1989). Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Dis. Aquat. Organisms*, 7: 191-194.
- Lovell, R. T. (1984). Ascorbic Acid Metabolism in Fish. Em: Wegger, I.; Tagwerker, F. J. & Moustgaard, J. (Eds.) *Proceedings of workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 1983, Skjoldenæsholm-Suiça: 196-205.
- Lovell, R. T. & Lim, C. (1978). Vitamin C in pond diets for channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 321-325.
- Luzzana, U., Valfré, F. & Lanari, D. (1995). Protective Role of Vitamin C Against Environmental Stressors and Pathogens in Intensive Aquaculture. *Riv. Ital. Acquacol.*, 30: 49-64.
- Mæland, A. & Waagbø, R. (1998). Examination of the Qualitative Ability of Some Cold Water Marine Teleosts to Synthesise Ascorbic Acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121 A: 149-255.
- Magare, S. R. & Kulkarni, A. B. (1996). Effect of Toad poison on Ascorbic Acid Levels in the Fish. *Env. Ecol.*, 14: 488-489.
- Mahajan, C. L. & Agrawal, N. K. (1979). Vitamin C Deficiency in *Channa punctatus* Bloch. *J. Fish Biol.*, 15: 613-622.

- Martins, M. L. (1995). Effect of Ascorbic Acid Deficiency on the Growth, Gill Filament Lesions and Behavior of Pacu Fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- Martins, M. L. (1998). Evaluation of the Addition of Ascorbic Acid to the Ration of Cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the Infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatius* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 655-658.
- Martins, M. L., Castagnolli, N., Zuim, S. M. F. & Urbinati, E. C. (1995). Influência de Diferentes Níveis de Vitamina C na ração sobre Parâmetros Hetatológicos de Alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). *Revta. Braz. Zool.*, 12: 609-618.
- Masumoto, T., Hosokawa, H. & Shimeno, S. (1991). Ascorbic Acid's Role in Aquaculture Nutrition. Em: Akiyama, D. M. & Tan, R. K. H. (Eds.) *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*, 19 a 25 de Setembro de 1991, Tailândia e Indonésia: 42-48.
- Mathews, C. K. & van Holde, K. E. (1990). *Biochemistry*. Redwood city, California: Benjamin/Cummings.
- Mayer, F. L.; Mehrle, P. M. & Crutcher, P. L. (1978). Interactions of toxafene and vitamin C in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 326-333.
- Mazeaud, M. M. & Mazeaud, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. Em: Pickering, A. D. (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press: 49-75.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F. & Donaldson, E. M. (1977). Primary and Secondary Effects of Stress in Fish : Some New Data With a General Review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106: 201-212.
- Mazik, P. M., Brandt, T. M. & Tomasso, J. R. (1987). Effects of Dietary Vitamin C on Growth, Caudal Fin Development, and Tolerance of Aquaculture-Related Stressors in Channel Catfish. *Prog. Fish-Cult.*, 49: 13-16.
- Mazur, C. F. & Iwama, G. K. (1993). Effect of Handling and Stocking Density on Hematocrit, Plasma Cortisol, and Survival in Wild and Hatchery-reared Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 112: 291-299.
- McDonald, D. G., Goldstein, M. D. & Mitton, C. (1993a). Responses of Hatchery-Reared Brook Trout, Lake Trout, and Splake to Transport Stress. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 122: 1127-1138.
- McDonald, D. G. & Robinson, J. G. (1993b). Physiological Responses of Lake Trout to Stress: Effects of Water hardness and Genotype. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 122: 1146-1155.
- Mesa, M. G., Poe, T. P., Maule, A. G. & Schreck, C. B. (1998). Vulnerability to Predation and Physiological Stress Responses in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus mykiss*): Experimentally Infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 1599-1606.
- Miller, T. E. (1969). Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme. *J. Bacteriol.*, 98: 949-955.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R. & Sakaguchi, M. (1995). Effect of Vitamin C on Lipid and Carnitine Metabolism in Rainbow Trout. *Fish. Sci.*, 61: 501-506.
- Molinero, A. & Gonzalez, J. (1995). Comparative Effects of MS 222 and 2-Phenoxyethanol on Guilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) during Confinement. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111 A: 405-414.
- Mommsen, T. P. & Walsh, P. J. (1992). Biochemical and Environmental Perspectives on Nitrogen Metabolism in Fishes. *Experientia*, 48: 583-593.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M. & Tort, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.

- Morales, A. E., García-Rejón, L. & De la Higuera, M. (1989). Use of Anaesthesia "in situ" for Handling Stress Suppression in Rainbow Trout. Em: *Short Communications and Abstracts, Aquaculture Europe'89*, 2 a 4 de Outubro de 1989, Bordéus-França, Special Publication n° 10: 173-174.
- Morales, A. E., García-Rejón, L. & De La Higuera, M. (1990). Influence of Handling and/or Anaesthesia on Stress Response in Rainbow Trout. Effects on Liver Primary Metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95 A: 87-93.
- Morata, P., Faus, M. J., Perez-Palomo, M. & Sánchez-Medina, F. (1982). Effect of Stress on Liver and Muscle Glycogen Phosphorylase in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72 B: 421-425.
- Moreau, R. & Dabrowski, K. (1998). Body pool and synthesis of ascorbic acid in adult lamprey (*Petromyzon marinus*): An agnathan fish with gulonolactone oxidase activity. *Proc. Ntl. Acad. Sci.*, 95: 10279-10282.
- Moreau, R., Kaushik, S. & Dabrowski, K. (1996). Ascorbic Acid Status as Affected by Dietary Treatment in the Siberean Sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt): Tissue Concentration, mobilization and L-gulonolactone Oxidase Activity. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 431-438.
- Morigaki, T. & Ito, Y. (1982). Intervening effect of L-ascorbic acid on Epstein-Barr virus in human lymphoblastoid cells and its comparison with the effect of retinoic acid. *Cancer letters*, 15: 255-259.
- Muusze, B., Marcon, J., Van der Thillart, G. & Almeida-Val, V. (1998). Hypoxia Tolerance of Amazon fish Respirometry and Energy Metabolism of the Cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120 A: 151-156.
- Nakano, T. & Tomlinson, N. (1967). Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. *J. Fish. Res. Board Can.*, 24: 1701-1715.
- Navarre, O. & Halver, J. E. (1989). Disease Resistance and Humoral antibody Production in Rainbow Trout Fed High Levels of Vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- NRC (1993). Nutrient Requirements of Fish. Em: National Academy Press: 114 pp.
- Ogino, C.; Uki, N.; Watanabe, T.; Iida, Z. & Ando, K. (1970). B vitamin requirements of carp. 4. Requirement of choline. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 36: 1140-1146.
- Olsen, Y. A., Einarsdottir, I. E. & Nilsen, K. J. (1995). Metomidate Anaesthesia in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Prevents Plasma Cortisol Increase During Stress. *Aquaculture*, 134: 155-168.
- Olson, K. R. & Fromm, P. O. (1971). Excretion of Urea by two teleosts exposed to different concentrations of ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40: 999-1007.
- Palace, V. P., Klaverkamp, J. F., Lockhart, W. L., Metner, D. A., Muir, D. C. G. & Brown, S. B. (1996). Mixed -Function Oxidase Enzyme Activity and Oxidative Stress in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*) Exposed to 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB-126). *Env. Tox. Chem.*, 15: 955-960.
- Parihar, M. S. & Dubey, A. K. (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112 C: 309-313.
- Parihar, M. S., Dubey, A. K., Javeri, T. & Prakash, P. (1996). Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 21: 323-330.

- Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K. & Prakash, P. (1997). Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 22: 151-156.
- Pearson, C. M.; Clements, P. J. & Yu, D. T. Y. (1978). The effects of corticosteroids on lymphocyte functions. *Eur. J. Rheumatol. Inflam.*, 1: 216-225.
- Person-Le Ruyet, J., Chartois, H. & Quemener, L. (1995). Comparative Acute Ammonia Toxicity in Marine Fish and Plasma Ammonia Response. *Aquaculture*, 136: 181-194.
- Person-Le Ruyet, J., Delbard, C., Chartois, H. & Le Delliou, H. (1997a). Toxicity of Ammonia to Turbot Juveniles: I- Effects on Survival, Growth and Food Utilization. *Aquat. Living Resour.*, 10: 307-314.
- Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A. & Chartois, H. (1997b). Chronic Ammonia Toxicity in Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 154: 155-171.
- Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M. & Storch, V. (1997). Different Concentrations of Ascorbyl-2-Monophosphate- Magnesium as Dietary Sources of Vitamin C for Seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 151: 225-243.
- Pichavant, K., Person-Le Ruyet, J., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Quémener, L., Maxime, V., Nonnotte, G. & Boeuf, G. (in press). Effects of Hypoxia on Metabolism and Growth in Juvenile Turbot. *Aquaculture*,
- Pickering, A. D. (1981). Introduction: the concept of biological stress. Em: Pickering, A. D. (ed.), *Stress and Fish*. Academic Press: 1-9.
- Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 253-258.
- Planas, J., Gutierrez, J., Fernandez, J., Carrillo, M. & Canals, P. (1990). Annual and Daily Variations of Plasma Cortisol in Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 91: 171-178.
- Pouliot, T. & De la Noüe, J. (1989). Feed Intake, Digestibility and Brain Neurotransmitters of Rainbow Trout under Hypoxia. *Aquaculture*, 79: 317-327.
- Ragab-Depre, N. J. (1982). Water disinfection with hydrogen peroxyde-ascorbic acid-copper (II) system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 555-560.
- Rand, T. G. & Cone, D. K. (1990). Effects of *Ichthyophonus hoferi* on condition indices and blood chemistry of experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Wildl. Dis.*, 26: 323-328.
- Randall, D. J. & Wright, P. A. (1987). Ammonia Distribution and Excretion in Fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 3: 107-120.
- Rantin, F. T. & Kalin, A. L. (1996). Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Clossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. Em: Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. & Randall, D. J. (eds.), *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. INPA: 169-180.
- Rasmussen, R. S. & Korsgaard, B. (1998). Ammonia and Urea in Plasma of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in Response to External Ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120 A: 163-168.
- Reddy, P. K., Vijayan, M. M., Leatherland, J. F. & Moon, T. W. (1995). Does RU486 Modify Hormonal Responses to Handling Stressor and Cortisol Treatment in Fed and Fasted Rainbow Trout? *J. Fish Biol.*, 46: 341-359.
- Rivers, J. M. (1987). Safety of high-level vitamin C ingestion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 498: 445-451.

- Robertson, L.; Thomas, P & Arnold, C. R. (1988). Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, 68: 115-130.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C. R. & Trant, J. M. (1987). Plasma Cortisol and Secondary Stress Response of Red Drum to Handling, transport, Rearing Density and Disease Outbreak. *Prog. Fish-Cult.*, 49: 1-12.
- Roche, H., Chaar, K. & Pérès, G. (1989). The Effect of a Gradual Decrease in Salinity on the Significant Constituents of Tissue in the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* Pisces). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93 A: 785-789.
- Rotllant, J. & Tort, L. (1997). Cortisol and Glucose Response After Acute Stress by Net Handling in Sparid Red Porgy Previously Subjected to Crowding Stress. *J. Fish Biol.*, 51: 21-28.
- Salo, R. J. & Cliver, D. O. (1978). Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 68-75.
- Sandnes, K. (1991). Vitamin C in Fish Nutrition - A Review. *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ern ering*, IV: 3-32.
- Sandnes, K., Hansen, T., Killie, J. E. A. & Waagbø, R. (1990). Ascorbate-2-Sulfate as a Dietary Vitamin C Source for Atlantic Salmon (*Salmo salar*): 1. Growth, Bioactivity, Haematology and Humoral Immune Response. *Fish Physiol. Biochem.*, 8: 419-427.
- Sandnes, K., Torrissen, O. & Waagbø, R. (1992). The Minimum Dietary Requirement of Vitamin C in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fry Using Ca Ascorbate-2-Monophosphate as Dietary Sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 315-319.
- Sandnes, K. & Waagbø, R. (1991). Effects of Dietary vitamin C and Physical Stress on Head Kidney and Liver Ascorbic Acid, Serum Cortisol, Glucose and Haematology in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ern ering*, IV: 41-49.
- Santinha, P. J. M., Gomes, E. F. S. & Coimbra, J. O. (1996). Effects of Protein Level of the Diet on Digestibility and Growth of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata* L. *Aquacult. Nutr.*, 2: 81-87.
- Sato, P. H. & Udenfriend, S. (1978). Scurvy-prone animals including man, monkey and guinea pig do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 187: 158-162.
- Sato, P. H. & Zannoni, V. G. (1976). Ascorbic acid and hepatic drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 198: 295-307.
- Sato, P. H.; Nishikimi, M. & Udenfriend, S. (1976). Is L-gulonolactone-oxidase the only enzyme missing in animals subjected to scurvy? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 293-299.
- Sato, M., Yoshinaka, R. & Ikeda, S. (1978). Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1029-1035.
- Satyabudhy, A. M. A.; Grant, B. F. & Halver, J. E. (1989). Effect of L-ascorbyl-2-phosphates (AsPP) on growth and immunoresistance of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus. Em: Takeda, M & Watanabe, T (Eds.) *Proceedings of the 3rd International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*, 28 de Agosto a 1 de Setembro de 1989, Toba - Jap o: 411-426.
- Scarano, G., Saroglia, M. & Sciaraffia, F. (1991). Protective Role of Ascorbic Acid Against Nitrite Intoxication in Sea Bass (*D. labrax*, L.). *Riv. Ital. Acquacol.*, 26: 19-25.
- Schreck, C. B. (1981). Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors. Em: Pickering, A. D. (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press: 295-321.
- Schreck, C. B. (1982). Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, 28: 241-249

- Schreck, C. B. & Lorz, H. H. (1978). Stress response of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 1124-1129.
- Schreck, C. B., Solazzi, M. F., Johnson, S. L. & Nickelson, T. E. (1989). Transportation Stress Affects Performance of Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 82: 15-20.
- Schwager, J. & Schulze, J. (1998). Modulation of Interleukin Production by Ascorbic Acid. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 64: 45-57.
- Schwerdt, P. R. & Schwerdt, C. E. (1975). Effect of ascorbic acid on rhinovirus replication in WI 38 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148: 1237-1243.
- Seyle, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32.
- Seyle, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.*, 1: 1383-1392.
- Shiau, S. Y. & Hsu, T. S. (1995). L-Ascorbyl-2-Sulfate has Equal Antiscorbutic Activity as L-Ascorbyl-2-Monophosphate for Tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture*, 133: 147-157.
- Shiau, S. Y. & Jan, F. L. (1992). Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 671-675.
- Siegal, B. V. (1975). Enhancement of interferon production by poly(rL) poly(rC) in mouse cell cultures by ascorbic acid. *Nature*, 254: 531-532.
- Soliman, A. K., Jauncey, K. & Roberts, R. J. (1985). Qualitative and Quantitative Identification of L-Gulonolactone Oxidase Activity in Some Teleosts. *Aquacult. Fish. Manag.*, 4: 249-256.
- Stankova, L.; Rigas, D. A. & Bigely, R. H. (1975). Dehydroascorbate uptake and reduction by human neutrophils, erythrocytes and lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 238-242.
- Sunyer, J. O., Gómez, E., Navarro, V., Quesada, J. & Tort, L. (1995). Physiological Responses and Depression of Humoral Components of the Immune System in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Following Daily Acute Stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2339-2346.
- Tanaka, K., Hashimoto, T., Tokumaru, S., Iguchi, H. & Kojo, S. (1997). Interactions between Vitamin C and Vitamin E are Observed in Tissues of Inherently Scorbutic Rats. *J. Nutr.*, 127: 2060-2064.
- Teh, S. J., Adams, S. M. & Hinton, D. E. (1997). Histopathologic Biomarkers in Feral Freshwater Fish Populations Exposed to Different Types of Contaminant Stress. *Aquat. Toxicol.*, 37: 51-70.
- Teshima, S. I., Kanazawa, A., Koshio, S. & Itoh, S. (1993). L-Ascorbyl-2-Phosphate-Mg as Vitamin C Source for the Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice* 61, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 157-166.
- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K. D., Inselmann, S. & Rosenthal, H. (1999). Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, 174: 355-367.
- Thomas, P. (1984). Influence of Some Environmental Variables on the Ascorbic Acid Status of Mullet, *Mugil cephalus* L., Tissues. I. Effect of Salinity, Capture Stress, and Temperature. *J. Fish Biol.*, 25: 711-720.
- Thomas, P. (1987). Influence of Some Environmental Variables on the Ascorbic Acid Status of Striped Mullet, *Mugil cephalus* Linn., Tissue. III. Effects of Exposure to Oil. *J. Fish Biol.*, 30: 485-494.
- Thomas, P. (1990). Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8: 9-28.

- Thomas, P. & Neff, J. M. (1985). Plasma and glucose responses of pollutant in striped mullet: different effects of naphthalene, benzo[a]pyrene and cadmium exposure. Em: Thurberg, F.P.; Calabrese, A.; Vernberg, F. J. & Vernberg, W. B. (eds.) Marine pollution and physiology: recent advances. University of south Carolina Press: 63-82.
- Thomas, P., Bally, M. & Neff, J. M. (1982). Ascorbic Acid Status of Mullet, *Mugil cephalus* Linn., Exposed to Cadmium. *J. Fish Biol.*, 20: 183-196.
- Thomas, P., Bally, M. & Neff, J. M. (1985). Influence of Some Environmental Variables on the Ascorbic Acid Status of Mullet, *Mugil cephalus* L., Tissues. II. Seasonal Fluctuations and Biosynthetic Ability. *J. Fish Biol.*, 27: 47-57.
- Thomas, P. & Robertson, L. (1991). Plasma Cortisol and Glucose Stress Responses of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) to Handling and Shallow Water Stressors and Anesthesia with MS-222, Quinaldine Sulfate and Metomidate. *Aquaculture*, 96: 69-86.
- Thomas, P., Woodin, B. R. & Neff, J. M. (1980). Biochemical Responses of the Striped Mullet *Mugil cephalus* to Oil Exposure I. Acute Responses - Interrenal Activations and Secondary Stress Responses. *Mar. Biol.*, 59: 141-149.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F. & Secombes, C. J. (1993). The Effect of Stress on the Immune Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) fed diets Containing Different Amounts of Vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- Tomasso, J. R. (1994). Toxicity of Nitrogenous Wastes to Aquaculture Animals. *Rev. Fish. Sci.*, 2: 291-314.
- Tomasso, J. R., Davis, K. B. & Parker, N. C. (1981). Plasma Corticosteroid Dynamics in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), During and After Oxygen Depletion. *J. Fish Biol.*, 18: 519-526.
- Touhata, K., Toyohara, H., Mitani, T., Kinoshita, M., Satou, M. & Sakaguchi, M. (1995). Distribution of L-Gulonolactone Oxidase among Fishes. *Fish. Sci.*, 61: 729-730.
- Tucker, B. W., Tolbert, B. M., Halver, J. E. & Balaban, M. (1987). Brain Ascorbate Depletion as a Response to Stress. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 57: 289-295.
- Tukey, J. W. (1949). comparative individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5: 99-114.
- USEPA (1989). Ambient water quality criteria for ammonia (salt-water). Em: Vol. EPA 440/5-88-04. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division: 28 pp.
- Val, A. L., Silva, M. N. P. & Almeida-Val, V. M. F. (1998). Hypoxia Adaptation in Fish of the Amazon: a Never-Ending Task. *S. Afr. J. Zool.*, 33: 107-114.
- van Dam, A. A., Huisman, E. A. & Rabbinge, R. (1996). Simulation of Food and Oxygen Limitations on the Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in Fishponds. *Aquacult. Res.*, 27: 463-478.
- van Dam, A. A. & Pauly, D. (1995). Simulation of the Effects of Oxygen on Food Consumption and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Res.*, 26: 427-440.
- van den Thillart, G., Dalla Via, J., Vitali, G. & Cortesi, P. (1994). Influence of Long-Term Hypoxia Exposure on the Energy Metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ Levels for Aerobic and Anaerobic Metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 104: 109-117.
- van Ginneken, V. J. T., van Eersel, R., Balm, P., Nieveen, M. & van den Thillart, G. (1997). Tilapia are Able to Withstand Long-Term Exposure to Low Environmental pH, Judged by their Energy Status, Ionic Balance and Plasma Cortisol. *J. Fish Biol.*, 51: 795-806.
- van Weerd, J. H. & Komen, J. (1998). The Effects of Chronic Stress on Growth in Fish: a Critical Appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120 A: 107-112.

- Vedel, N. E., Korsgaard, B. & Jensen, F. B. (1998). Isolated and Combined Exposure to Ammonia and Nitrite in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on Electrolyte Status, Blood Respiratory Properties and Brain Glutamine/Glutamate Concentrations. *Aquat. Toxicol.*, 41: 325-342.
- Verlhac, V. & Gabaudan, J. (1992). Effect of a High Dietary Dose of Ascorbate-2-Monophosphate on the Immune Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Em: Wenk, C.; Fenster, R. & Völker, L. (Eds.) *Proceedings of the 2nd Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals*, 9 a 12 Outubro de 1990, Kartause Ittingen-Switzerland: 408-421.
- Verlhac, V., N'Doye, A., Gabaudan, J., Troutaud, D. & Deschaux, P. (1993). Vitamin Nutrition and Fish Immunity: Influence of Antioxidant Vitamins (C and E) on Immune Response of Rainbow Trout. Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice* 61, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 167-177.
- Vijayan, M. M., Pereira, C. & Moon, T. W. (1994). Hormonal Stimulation of Hepatocyte Metabolism in Rainbow Trout Following an Acute Handling Stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108 C: 321-329.
- Völker, L. & Fenster, R. (1994). Efficacy of Ascorbyl-2-Polyphosphate in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 124: 213-217.
- Waagbø, R. & Sandnes, K. (1996). Effects of Dietary Vitamin C on Growth and Parr-Smolt Transformation in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutr.*, 2: 65-69.
- Wahli, T., Frischknecht, R., Schmitt, M., Gabaudan, J., Verlhac, V. & Meier, W. (1995). A Comparison of the Effect of Silicone Coated Ascorbic Acid and Ascorbyl Phosphate on the Course of Ichthyophthiriosis in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 18: 347-355.
- Wahli, T., Meier, W. & Pfister, K. (1986). Ascorbic Acid Induced Immune-Mediated Decrease in Mortality in Ichthyophthirius multifiliis Infected Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica*, 43: 287-289.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Krom, M. D. & Popper, D. M. (1991). Acute Toxicity of Ammonia to Juvenile Gilthead Seabream *Sparus aurata* under Reduced Oxygen Levels. *Aquaculture*, 92: 277-288.
- Walsh, P. J., Danulat, E. & Mommsen, T. P. (1990). Variation in Urea Excretion in the Gulf Toadfish *Opsanus beta*. *Mar. Biol.*, 106: 323-328.
- Waring, C. P., Stagg, R. M. & Poxton, M. G. (1992). The Effects of Handling on Flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *J. Fish Biol.*, 41: 131-144.
- Waring, C. P., Stagg, R. M. & Poxton, M. G. (1996). Physiological Responses to Handling in the Turbot. *J. Fish Biol.*, 48: 161-173.
- Wedemeyer, G. (1969). Stress-Induced Ascorbic Acid Depletion and Cortisol Production in Two Salmonid Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29: 1247-1251.
- Wedemeyer, G. A. & McCleay, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. Em: Pickering, A. D. (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press: 247-275.
- Wedemeyer, G. A. & Yasutake, W. T. (1977). Clinical Methods for the Assessment of the Effects of Environmental Stress on Fish Health. *Technical Papers of the U.S. Fish and Wildlife Service*, nº 89: 18 pp.
- White, A. & Fletcher, T. C. (1989). The Effect of Physical Disturbance, Hypoxia and Stress Hormones on Serum Components of the Plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93 A: 455-461.

- White, A., Fletcher, T. C., Secombes, C. J. & Houlihan, D. F. (1993). The Effect of Different Dietary Levels of Vitamins C and E on Their Tissue Levels in the Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. Em: Kaushik, S. J. & Luquet, P. *Fish Nutrition in Practice* 61, 24 a 27 de Junho de 1991; Biarritz-França: 203-207.
- White, L. A.; Freeman, C. Y.; Forrester, B. D. & Chappel, W. A. (1986). In vitro effect of ascorbic acid infectivity of herpesviruses and para myxoviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 527-531.
- Wilson, R. P. (1973). Absence of Ascorbic Acid Synthesis in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* and Blue Catfish, *Ictalurus frucatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46 B: 635-638.
- Wilson, R. P. & Poe, W. E. (1973). Impaired Collagen Formation in the Scorbutic Channel Catfish. *J. Nutr.*, 103: 1359-1364.
- Wilson, R. P. & Poe, W. E. (1988). Choline nutrition of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 68: 68-71.
- Wilson, R. P., Poe, W. E. & Robinson, E. H. (1989). Evaluation of L-Ascorbyl-2-Polyphosphate (AsPP) as a Dietary Ascorbic Acid Source For Channel Catfish. *Aquaculture*, 81: 129-136.
- Winkler, P. (1987). A Method to Minimize Stress During Fish Transport. *Prog. Fish-Cult.*, 49: 154-155.
- Wise, D. J., Tomasso, J. R. & Brandt, T. M. (1988). Ascorbic acid inhibition of Nitrite-Induced Methemoglobinemia in channel Catfish. *Prog. Fish-Cult.*, 50: 77-80.
- Woodward, B. (1994). Dietary Vitamin Requirements of Cultured Young Fish, with Emphasis on Quantitative Estimates for Salmonids. *Aquaculture*, 124: 133-168.
- Wright, P. A. (1993). Nitrogen excretion and enzyme pathways for ureagenesis in freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiol. Zool.*, 66: 881-901.
- Yamamoto, Y. & Inoue, M. (1985). Effects of dietary ascorbic acid and dehydro-ascorbic acid on the acute cadmium toxicity in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51: 1299-1303.
- Yamamoto, Y., Sato, M. & Ikeda, S. (1978). Existence of L-Gulonolactone Oxidase in Some Teleosts. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44: 775-779.
- Yone, Y.; Furuichi, M. & Shitanda, K. (1971). Vitamin requirements of the red sea bream. 1. Relationship between inositol requirements and glucose levels in the diet. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 37: 149-155.
- Young, P. S. & Cech, J., J J (1993). Physiological Stress Responses to Serial Sampling and Confinement in Young-of-the-Year Striped Bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Comp. Biochem. Physiol.*, 105 A: 239-344.
- Young, G.; Björnsson, B. T.; Prunet, P.; Lin, R. J. & Bern, H. A. (1989). Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 74: 335-345.
- Zannoni, V. G. & Sato, P. H. (1975). Effects of Ascorbic acid on Microsomal Drug Metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 119-131.
- Zannoni, V. G.; Flynn, E. J. & Lynch, M. (1972). Ascorbic acid and drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 1377-1392.
- Zannoni, V. G.; Smith, C. R. & Rikans, L. E. (1977). Drug metabolism and ascorbic acid. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 47 (supl. 16): 99-125.

Anexo I Principais sinais e sintomas de deficiência em ácido ascórbico em algumas espécies de peixes (NRC, 1993).

Salmonídeos	Peixe-gato	Enguia Japonesa	Carpa comum	Seriola	Red Seabream
Letargia Exofetalmia hemorrágica Hemorragia intramuscular Filamentos branquiais distorcidos Lordose Escoliose Ascite Anemia	Hemorragias externas e internas Erosão das barbatanas Colagéneo ósseo reduzido Lordose Escoliose	Hemorragias nas barbatanas e pele Erosão da mandíbula	Diminuição do crescimento	Hemorragias na pele Melanose Lordose Escoliose Anemia Mortalidade rápida e elevada	Diminuição do crescimento

Anexo I | Requisitos vitamínicos de 5 espécies de peixes (NRC, 1993).

Vitamina (mg/kg)	Peixe-gato	Truta arco- íris	Salmão do Pacífico	Carpa comum	Tilápia
A (IU/kg)	1000-2000	2500	2500	4000	NT
D (IU/kg)	500	2400	NT	NT	NT
E (IU/kg)	50	50	50	100	50
K	R	R	R	NT	NT
Riboflavina	9	4	7	7	6
Ácido Pantoténico	15	20	20	30	10
Niacina	14	10	R	28	NT
B12	R	0.01E	R	NR	NR
Colina	400	1000	800	500	NT
Biotina	R	0.15	R	1	NT
Folato	1.5	1	2	NR	NT
Tiamina	1	1	R	0.5	NT
B6	3	3	6	6	NT
Mioinositol (mg/kg)	NR	3200	300	440	NT
Ácido Ascórbico	25-50	50	50	R	50

R- Requerido da dieta mas não quantificado.

NR- Sem requisito alimentar demonstrado em condições experimentais.

NT- Não testado.

E- Estimado.

Anexo III Actividade da enzima GLO em diversas espécies de peixes.

Ordem	Espécie	Actividade GLO ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Orgão	Referência
Petromyzontiformes	<i>Petromyzon marinus</i>	126-159	Rim	Moreau <i>et al.</i> , 1998
	<i>Lampetra japonica</i>	0.88	Rim	Touhata <i>et al.</i> , 1995
Lamniformes	<i>Mustelus manazo</i>	3.35	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
	<i>Squalus acanthias</i>	513	Rim	Mæland <i>et al.</i> , 1998
		N.D.	Fígado	
Rajiformes	<i>Dasyatis akajei</i>	1.02	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
Lepidosireniformes	<i>Protopterus aethiopicus</i>	2.73	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
Lepisosteiformes	<i>Lepisosteus oculatus</i>	N.D.	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
Polypteriformes	<i>Polypterus senegalus</i>	N.D.	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
Lophiiformes	<i>Lophiomus setigerus</i>	N.D.	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
Pleuronectiformes	<i>Parachlithys olivaceus</i>	N.D.	Rim	Touhata, <i>et al.</i> , 1995
	<i>Carassius auratus</i>	45.1	Rim	Thomas <i>et al.</i> , 1985
		1.9	Fígado	
	<i>Tilapia aurea</i>	4.1	Rim	Thomas, <i>et al.</i> , 1985
	<i>Mugil cephalus</i>	1.9	Rim	Thomas, <i>et al.</i> , 1985
		2.0	Fígado	
	<i>Fundulus grandis</i>	6.2	Fígado	Thomas, <i>et al.</i> , 1985
	<i>Anguilla anguilla</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Clupea harengus</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Salmo salar</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Gadus morhua</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Scomber scombrus</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Scophthalmus maximus</i>	N.D.	Rim	Mæland & Waagbø,
		N.D.	Fígado	1998
	<i>Cyprinus carpio</i>	12	Rim	Yamamoto <i>et al.</i> , 1978
		54	Fígado	Soliman <i>et al.</i> , 1985
		21.0	Rim	
		59.2	Fígado	

	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Salmo trutta</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oreochromis niloticus</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oreochromis spilurus</i>	58.9	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oreochromis aureus</i>	46.8	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Oreochromis macrochir</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>O. niloticus X</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
	<i>O. mossambicus</i>	N.D.	Fígado	
	<i>Tilapia zillii</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Tilapia buttikoferi</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
	<i>Sarotherodon galilaeus</i>	N.D.	Rim	Soliman, <i>et al.</i> , 1985
		N.D.	Fígado	
Acipenceriformes	<i>Acipenser baeri</i>	10-69	Rim	Moreau <i>et al.</i> , 1996
	<i>Acipenser ruthenus</i>	11.4	Rim	Mæland & Waagbø, 1998
	<i>Ictalurus frucatus</i>	N.D.	Rim	Wilson, 1973
		N.D.	Fígado	

N.D. não detectável.

Anexo V I Método de dosagem do ácido ascórbico pelo método de Bourgeois et al. (1989)**REAGENTES**

- Ácido Metafosfórico a 5%
- Solução de Iodo 0.005 M
- Tiosulfato de Sódio 0.01 M
- Tampão A
- Tampão B
- Tampão C
- Solução de 4,5-dietil-1,2-fenileno Diamina (DMPD) a 0.1%
- Álcool isoamílico saturado

MÉTODO**Preparação das Amostras***Tecidos Animais*

- Pesar 0.1 a 0.5 g do tecido a analisar e homogeneizar com a ajuda de um homogeneizador em 5 ml de HPO₃ a 5%
- Verter o homogeneizado para um tubo de ensaio, lavar o homogeneizador com 2 ml de HPO₃ a 5% e juntar ao homogeneizado. Perfazer o volume até 10 ml com a mesma solução, rolar os tubos e colocar a amostra a 4°C durante 24 horas.
- Centrifugar os tubos durante 10 min a 2500-3000 RPM com refrigeração (4°C) e recolher o sobrenadante e filtrar.
- Colocar 2ml do sobrenadante nos godés do autoanalisador para a primeira dosagem.
- Mudar o tampão A pelo tampão B no autoanalisador e dosear as interferências em mais 2 ml de sobrenadante.

Plasma Sanguíneo

- Pipetar 0.5 ml de plasma e juntar 4.5 ml de HPO₃ a 5%. Agitar, esperar 15 minutos, centrifugar e recuperar o sobrenadante
- Filtrar e fazer diluição 1:2 antes de dosear.

NOTAS:

- Todo o processo de preparação da amostra até à sua colocação no autoanalisador, deve ser efectuado mantendo constantemente as amostras e o HPO₃ a 5% em gelo.

-As amostras, podem ser congeladas para posterior utilização, antes da centrifugação ou após a filtração. Podem também ser recongeladas para posterior confirmação dos resultados.

-As dosagens devem ser feitas até 2 meses após o seu processamento.

Curva Padrão

-Dissolver 100 mg de ácido ascórbico em 100 ml de HPO₃ a 5%.

-Pipetar 2 ml desta solução para um balão volumétrico de 100 ml e ajustar o volume com HPO₃ a 5% (20 µg AA/ml)

-Utilizar esta última solução para fazer os padrões, de acordo com o quadro seguinte:

Concentração (µg ml ⁻¹)	Solução de AA (µl)	HPO ₃ a 5% (µl)
2.0	200	1800
1.6	160	1840
1.2	120	1880
0.8	80	1920
0.4	40	1960
0.2	20	1980

-Fazer três leituras de cada uma das soluções padrão e fazer uma regressão linear com os valores obtidos, para achar a equação da recta que relaciona o valor do espectrofluorímetro com a concentração de ácido ascórbico na amostra.

CÁLCULO

$$\text{Ácido Ascórbico } (\mu\text{g/g}) = \frac{(a * (HA - HB) + b) * D}{Pa}$$

a - Declive da recta

b - Intercepção com o eixo das abcissas

HA - Altura do pico obtido com o tampão A (mm)

HB - Altura do pico obtido com o tampão B (mm)

D - Diluição (ml)

Pa - Peso da amostra (mg)

AUTOANALIZADOR PARA DOSEAMENTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Modo Operatório

- Ligar a bomba peristáltica e lavar o circuito com água destilada durante 30 minutos
- Bombear, de seguida, simultaneamente o HPO_3 a 5%, o Tiosulfato de Sódio 0.01 M, o Tampão A, a solução de iodo e o DMPD durante mais 30 minutos
- Ligar os restantes aparelhos (distribuidor de amostras, espectrofluorímetro e registador), introduzir os restantes reagentes (Álcool Isoamílico e Tampão C), acertar a linha de base e começar imediatamente a leitura dos padrões.
- Os padrões devem ser lidos por ordem decrescente de concentração, após o que se faz uma lavagem com 1 godé contendo apenas HPO_3 a 5%.
- Fazer, então a leitura das amostras, tendo o cuidado de começar pelas de menor concentração.
- No final das leituras, lavar com HPO_3 a 5%, usando 3 godés. Durante a recolha do 2º godé substituir o Tampão A pelo Tampão B e ler outra vez as mesma amostras, para determinar as interferências
- No final das análises e após o registo da última medição, esperar 10 minutos e retirar o HPO_3 e a solução de iodo (guarda-las a 40C), após mais 10 minutos retirar o tampão B e a solução de Tiosulfato (guardar o último a 40C) e depois de sair o último pico retirar os restantes reagentes e lavar o circuito com água destilada durante 2 horas.

NOTA:

Comprimentos de onda do espectrofluorímetro

Excitação	362 nm
Emissão	432 nm

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão A

Num balão volumétrico de 2000 ml, dissolver 508 g de dihidrogenofosfato de sódio em 1400 ml de água destilada. Juntar 208 ml de NaOH 4 M e ajustar o volume com água destilada. Filtrar com filtro de vidro nº 3 e verificar o pH, que deve ser 5.4. Conserva-se 1 semana á temperatura ambiente

Tampão B

Num balão de 2000 ml dissolver 608 g Dedihidrogenofosfato de Sódio em 1500 ml de água destilada. Dissolver de seguida 200 g de Tetraborato de Sódio, ajustar o volume, filtrar em filtro de vidro nº 3 e verificar o pH, que deve ser 5.3. Precauções como tampão A.

Tampão C

Dissolver 10 g de Hidrogenocarbonato de Sódio num balão de 2000 ml, em 1800 ml de água destilada. Juntar 18 ml de NaOH 4 M e ajustar o volume com água destilada. Filtrar num filtro de vidro nº 3 e verificar o pH = 10,2. Conservar como os outros tampões.

Anexo V Método de dosagem da hidroxiprolina na pele pelo método de Bonnet & Kopp (1984)

REAGENTES

- Acetona
- Ácido Perclórico 1.8N
- Hidróxido de Sódio 1.8N
- Tampão A
- Solução Oxidante
- Reagente de Erlich
- Solução Mãe de Hidroxiprolina 1mg/ml

MÉTODO

Preparação das Amostras

Pele

- Coloque uma amostra de pele, previamente pesada, em 4-5ml de acetona num tubo estanque e deixar difundir durante 24 horas-Solução Oxidante
- Renovar 2 vezes a acetona. Secar a amostra e mineralizar

Carcaça

- Extrair os lipídios de uma amostra, previamente pesada, de carcaça por Soxlet ou Fölch. Secar bem e mineralizar.
- Ter em conta nos cálculos a percentagem de lipídios.

Hidrólise

- Pesar exactamente 500mg de carcaça ou pele (deslipidados) e transferir para um tubo de mineralização graduado de 100ml (tipo Tecator)
- Juntar 15 ml de ácido perclórico 70-72% (HClO₄), agitar suavemente no vortex.
- Colocar os tubos no mineralizador aquecido a 100°C durante 4 horas.
- Retirar do mineralizador, deixar arrefecer, ajustar a 100ml com água destilada e homogeneisar. Neste ponto a normalidade do ácido perclórico é 1.8N
- Filtrar ou centrifugar uma aliquota de 20ml, aproximadamente, e congelar em frascos caso a dosagem não se efectue de imediato

Curva Padrão

- Em 8 balões volumétricos preparar cada uma das soluções padrão de acordo com a tabela:

Padrão ($\mu\text{g/ml}$)	Solução Mãe (μl)	HClO ₄ 70-72% (ml)
0	0	15
1	100	15
2	200	15
3	300	15
5	500	15
10	1000	15
15	1500	15
20	2000	15

-Completar com água destilada até perfazer 100 ml

Dosagem

-Transferir para tubo de ensaio de 10ml com tampa 0.5ml da solução a analisar ou das soluções padrão

-Juntar 0.5ml de NaOH 1.8N e agitar no vortex

-Juntar 1ml de Tampão A e agitar no vortex

-Juntar 1ml de Solução Oxidante e agitar no vortex

-Deixar reagir durante 4 minutos e juntar 5ml do Reagente de Erlich. Fechar os tubos e agitar bem.

-Aquecer os tubos em banho-maria a 60°C durante 25min.

-Deixar arrefecer os tubos e ler no espectrofotômetro a 558nm dentro de 2-3 horas

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão A:

Dissolver 57g de acetato de sódio, 44.4g de citrato trisodico e 5.5g de ácido cítrico em 385ml de álcool isopropílico, misturando cuidadosamente. Completar até 1l com água destilada, verificar o pH e ajustar a 6.0 se necessário Esta solução conserva-se durante vários meses.

Solução Oxidante:

Dissolver 1.4g de N-cloro-p-tolueno-sulfonamida de sodio (cloramina T) em 20 ml de água destilada. Completar até 100ml com tampão A e agitar bem. Esta solução deve ser preparada extemporaneamente

Reagente de Erlich:

Misturar 20 g de dimetilamino-4-benzaldeido(PDBA) com 30ml de ácido perclórico 70-72% e 130ml de álcool isopropílico. Preparar extemporaneamente.