

Suplementação alimentar com vitamina C e desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*)

Neidison Carneiro Colombano¹, Jaime Fenerick Júnior¹, Marta Verardino De Stéfani^{1,2}, Flavio Ruas de Moraes^{1,3*}, Milena Alves de Souza¹ e Euclides Braga Malheiros⁴

¹Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14844-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ⁴Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: fruas@fcav.unesp.br

RESUMO. Neste trabalho avaliou-se o desempenho zootécnico de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) cuja dieta foi suplementada com vitamina C. Girinos com peso médio inicial de 12,3 mg $\pm$ 2 mg foram distribuídos em 16 caixas de água de 40 L, na densidade de um girino L⁻¹. Os animais foram alimentados com dieta suplementada com zero (controle), 1.000, 1.500 e 2.000 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração, durante 75 dias. Após esse período foram avaliados quanto à sobrevivência, porcentagem de metamorfose, ganho de peso e taxa de crescimento específico. As maiores taxas de sobrevivência (93%), porcentagem de metamorfose (29%), ganho de peso (4,22 g) e taxa de crescimento específico (6,03% dia⁻¹) foram dos animais que receberam 2.000 mg de vitamina C kg⁻¹. O grupo não-suplementado foi o que apresentou o pior desempenho. Os resultados sugerem que a adição de 2.000 mg de vitamina C kg⁻¹ produz efeitos benéficos para o ganho de peso, crescimento específico, metamorfose e sobrevivência de girinos de rã-touro.

Palavras-chave: *Rana catesbeiana*, rã-touro, girinos, vitamina C, sobrevivência, metamorfose.

ABSTRACT. Alimentary supplementation of Vitamin C and the performance indexes of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). The present study had as objective to evaluate the effects of vitamin C supplementation on the performance indices of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles. The tadpoles, with an average weight of 12.3 $\pm$ 2 mg, were distributed in 16 boxes (40 L), with 1 tadpole L⁻¹. They received diets supplemented with zero (control), 1,000, 1,500 and 2,000 mg of vitamin C kg⁻¹ of diet, during 75 days. After this period, the survival, metamorphosis percentage, weight gain and specific growth rate were evaluated. The tadpoles that received 2,000 mg vitamin C kg⁻¹ ration showed the best results in survival (93%), the best percentage of metamorphosis (29%), the greatest weight gain (4.22 g) and the best specific growth rate (6.03% day⁻¹). The worst performance was observed in the tadpoles that did not receive vitamin C. The results suggest that ration with 2,000 mg of vitamin C kg⁻¹ improves weight gain, specific growth rate, metamorphosis and survival of the bullfrog tadpoles.

Key words: *Rana catesbeiana*, bullfrog, tadpoles, Vitamin C, survival, metamorphosis.

Introdução

As vitaminas são compostos orgânicos presentes em pequenas quantidades nos alimentos naturais e são essenciais para a manutenção das funções fisiológicas e sua deficiência compromete funções específicas (Lovell, 1988; Combs, 1992; Almeida, 2003). A vitamina C tem papel relevante na síntese de colágeno e substância intercelular cementante da osteoide, sendo indispensável para a hidroxilação de prolina e lisina na síntese do colágeno. Portanto, sua carência prejudica o processo cicatricial e retração de

feridas e causa hemorragias pela falta de cemento entre as células endoteliais (Robbins *et al.*, 1986).

A vitamina C, em girinos, como em peixes, participa da formação do tecido ósseo e cartilaginoso, e é responsável pelo seu bom desenvolvimento. Sua carência ocasiona deformações ósseas, hemorragia, anorexia e aumento dos efeitos negativos do estresse (Halver, 1995), além de deformações na cauda (Leibovitz *et al.*, 1982).

A suplementação dietética com vitamina C para peixes teleósteos justifica-se pelo fato de que estes não possuem a enzima L-gulonolactona necessária

para a síntese de ácido ascórbico, e são dependentes de fontes exógenas para manutenção ideal da homeostase (Dabrowski, 1990). Os anfíbios, embora sejam capazes de sintetizar o ácido ascórbico, fazem-no em quantidades insuficientes, sendo necessária a suplementação dietética quando em cativeiro (Nandi et al., 1997).

Leibovitz et al. (1982) não observaram diferenças significativas na taxa de sobrevivência dos animais alimentados com dietas suplementadas com vitamina C. Segundo Stéfani et al. (2001), a suplementação de vitamina C e E não conferiu maior ganho de peso aos animais, mas a taxa de sobrevivência de suplementados foi significativamente maior do que do grupo controle (62,83 e 40,48%, respectivamente); os que receberam vitamina E não apresentaram alterações da taxa de sobrevivência em relação aos não-suplementados.

Tendo em vista esses fatores, a suplementação alimentar com ácido ascórbico na dieta de girinos pode ser alternativa viável para a melhora do desempenho zootécnico e da qualidade dos animais (Halver, 1989). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação com vitamina C sobre os parâmetros de desempenho (ganho de peso, sobrevivência, taxa de crescimento específico e porcentagem de sobrevivência) em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802).

Material e métodos

O experimento foi realizado no Setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Caunesp, Jaboticabal, Estado de São Paulo (21°15'22" Latitude S e 48°18'58" Longitude W, com altitude de 595 m), no período de 22 de março a 4 de junho de 2004 (75 dias). Foram utilizados 640 girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*), originários da mesma desova, com peso médio inicial de 12,3 mg $\pm$ 2 mg. Os girinos foram distribuídos em 16 caixas de cimento amianto impermeabilizadas, contendo 40 L de água, na densidade de um girino por litro de água de acordo com as recomendações encontradas na literatura (Adams e Bruisma, 1987; Seixas Filho et al., 1998a e b; Castro e Pinto, 2000; Hayashi et al., 2004), as quais foram mantidas no interior de uma baia do galpão de engorda, em ambiente fechado e fotoperíodo natural.

A água utilizada era proveniente de poço artesiano, livre de cloro, com renovação constante durante 24 horas e vazão de 30 L hora⁻¹. Quinzenalmente, 20% dos girinos de cada tanque foram pesados, ocasião em que foram realizadas análises físico-químicas da água que se manteve em condições adequadas para a criação de organismos

aquáticos de acordo com Sipaúba-Tavares (1994). A temperatura variou de 27,24 a 30,12°C; o pH entre 7,15 a 7,18; a condutividade elétrica entre 162,30 a 164,45 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e oxigênio dissolvido entre 6,55 a 7,04 mg L⁻¹.

Preparo das rações

Nesse ensaio, foram testados quatro níveis de ácido ascórbico polifosfato protegido com etilcelulose (T₀ – controle; T₁ – 1.000 mg vit C kg⁻¹; T_{1,5} – 1.5000 mg vit C kg⁻¹ e T₂ – 2.000 mg vit C kg⁻¹) e quatro repetições, com 16 parcelas. Todas as rações tinham a mesma formulação (Tabela 1) diferindo apenas na concentração de vitamina C.

Tabela 1. Fórmula e composição calculada das dietas experimentais.

Table 1. Calculated formula and composition of experimental diets.

Ingredientes Ingredients	%
Farelo de soja Soybean meal	37,5
Farelo de Milho Corn meal	22,5
Farinha de peixe Fish meal	16,1
Farinha de trigo Wheat meal	14,0
Farelo de Arroz Rice bran	7,9
Óleo de soja Soybean oil	0,5
Suplemento vitamínico e mineral* Mineral and vitaminic supplement	1,0
Metionina Methionine	0,4
Carboxi Metil Celulose Carboxymethylcellulose	0,1
Composição centesimal**	
PB (%)	31,91
Crude Protein %	
EB (Kcal kg ⁻¹ ração)	4138
Gross Energy Kcal kg ⁻¹ ration	
FB (%)	0,096
Crude Fiber %	
EE (%)	5,35
Crude Lipid %	

*Composição do suplemento mineral e vitamínico: Ferro 15000 mg, Cobre 5000 mg, Iodo 500 mg, Manganês 17000 mg, Zinco 12000 mg, Selênio 70 mg, veículo 1000 g, vitamina A 12000 UI, vitamina D₃ 1500 UI, vitamina E 50 mg, vitamina K 4 mg, vitamina B₁₂ 7 mg, vitamina B₂ 7mg, ácido pantotênico 60 mg, ac. Nicotínico 120 mg, cloreto de colina 600 mg, metionina 700 mg, antioxidante 500 mg, veículo 1000 g (Vitamin and mineral supplement composition: Iron 15,000 mg, Copper 5,000 mg, Iodine 500 mg, Manganese 17,000 mg, Zinc 12,000 mg, Selenium 70 mg, inert filler 100 g, vitamin A 12,000 UI, Vitamin D₃ 1,500 UI, vitamin E 50 mg, vitamin K 4 mg, vitamin B₁₂ 7 mg, panthothenic acid 60 mg, nicotinic acid 120 mg, coline chloride 600 mg, methionine 700 mg, antioxidant 500 mg, inert filler 1,000g). **Proteína bruta (PB); Energia bruta (EB); Fibra bruta (FB); Extrato etéreo (EE).

A ração foi moída, mantida em recipientes plásticos escuros e resfriada a 4°C e oferecida aos animais três vezes ao dia (9h00min., 13h00min. e 17h00min.). Diariamente, antes da primeira alimentação, os aquários foram sifonados, a fim de retirar os dejetos e restos de ração.

Desempenho zootécnico

Para a determinação do desempenho zootécnico,

foi calculada a taxa de sobrevivência, a porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos, o ganho de peso (GP, em gramas) e a taxa de crescimento específico (TCE, % dia⁻¹), sendo:

$$TCE = 100 \times [(\ln PF - \ln PI) \div \text{Per}]$$

em que:

ln PI = logaritmo natural do peso inicial;

ln PF = logaritmo natural do peso final;

Per = período experimental (em dias).

Delineamento experimental e análise estatística

Para análise estatística da taxa de sobrevivência, porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para a análise dos dados de ganho de peso e taxa de crescimento específico, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com repetições (indivíduos) dentro das parcelas (tanques). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Os resultados concernentes à porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e de sobrevivência estão apresentados na Tabela 2.

Os dados demonstram a influência significativa ($p < 0,01$) dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos e porcentagem de sobrevivência. A menor taxa de sobrevivência (68%) ocorreu nos girinos que não receberam suplementação com vitamina C, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Todavia, não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os diferentes níveis de suplementação (T_1 , $T_{1,5}$ e T_2).

Tabela 2. Valores de F, Coeficiente de Variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para porcentagem de girinos que se metamorfosearam e porcentagem de sobrevivência.

Table 2. F Value, Variation coefficient (VC) and means of variation analyze to percentage of tadpoles metamorphosed and survival percentage.

	Variáveis	
	Girinos que se metamorfosearam (%) <i>Tadpoles metamorphosed</i>	Sobrevivência (%) <i>Survival</i>
F para tratamento (TR) <i>F to Treatment</i>	29,80*	12,73*
CV	20,43%	7,18%
T_0	06 ^c	68 ^b
T_1	17 ^b	80 ^a
$T_{1,5}$	16 ^b	84 ^a
T_2	29 ^a	93 ^a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Means, within a column, followed by the same letter do not differ ($p < 0,05$) by Tukey test). *Significativo a 1% de probabilidade (Significance by 1% probability).

Esses resultados são similares aos observados por Stéfani *et al.* (2001) que obtiveram menor taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro, quando não-suplementados (40,48%), alcançando 62,83%, quando suplementados com 500 mg de vitamina C kg⁻¹ de ração.

Esse aumento na taxa de sobrevivência pode ser atribuído à maior eficiência dos mecanismos de defesa orgânica como resultado da suplementação com vitamina C, conforme Martins (1998) que observou, nas brânquias de *P. mesopotamicus* uma significativa diminuição no número de *Anacanthorus penilabialis* (Monogenea) nos peixes que receberam ração suplementada com 2.000 mg vit C kg⁻¹, durante 24 semanas. Petric *et al.* (2003) observaram que peixes suplementados com vitamina C acumularam maior número de macrófagos e formaram maior número de gigantócitos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo. O mesmo foi verificado por Brum (2003) que utilizou o mesmo modelo experimental, acrescido do fato de que, nos peixes suplementados, tal eficiência também foi observada quando mantidos em alta densidade (20 kg m⁻³). Além disso, de acordo com Moraes *et al.* (2003), o reparo de feridas cutâneas é significativamente favorecido, segundo relação de dose e efeito.

Shiau e Hsu (1995) observaram que híbridos jovens de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*), suplementados com vitamina C e E, apresentaram taxa de sobrevivência acima de 97,0%. Resultado semelhante foi observado por Mitra e Mukpadhyay (2003), ao verificar que larvas de carpas alimentadas com zooplâncton enriquecido com ácido ascórbico apresentaram 90% de sobrevivência. Os autores definiram que os requisitos de ácido ascórbico na dieta se encontram em torno de 1.209 µg g⁻¹ da dieta seca, colaborando para o aumento da resistência das larvas aos patógenos oportunistas e alterações ambientais.

Lin e Shiau (2004) detectaram diferença significativa com relação à taxa de sobrevivência entre os grupos de *Epinephelus malabaricus* alimentados com l-ascorbil-monofosfato-Mg e l-ascorbil-2-monofosfato-Na, em relação ao grupo não-alimentado com dietas enriquecidas com ácido ascórbico, tendo para os grupos alimentados com ácido ascórbico taxa de sobrevivência acima de 80%.

A porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (Tabela 2) foi influenciada pelos diferentes níveis de suplementação com vitamina C. Observou-se menor porcentagem de girinos que se metamorfosearam em imagos (6%) nos animais que

não receberam suplementação (T_0), a qual diferiu significativamente ($p < 0,01$) das demais. A maior taxa de girinos que se metamorfosearam em imagos (29%) foi observada nos suplementados com 2000 mg vit C kg^{-1} de ração. Entre os tratamentos T_1 e $T_{1,5}$ não foi observada diferença significativa.

Martinez *et al.* (1996) sugerem que o cultivo de anfíbios está relacionado com diversos fatores que condicionam o bom desenvolvimento dos indivíduos, tais como: competição por comida, estresse e inibição do crescimento. Os autores observaram que girinos cultivados em alta densidade apresentam menor crescimento e metamorfose tardia, assim, como a disputa pelo alimento é causadora da redução nas reservas de energia, impossibilitando, assim, que os indivíduos possam reduzir os efeitos fisiológicos relacionados ao estresse. Neste sentido, sabendo-se que um dos efeitos da suplementação com vitamina C na dieta é a redução do estresse (Combs, 1992; Brum, 2003), é possível supor que neste ensaio os grupos com maior sobrevivência sofreram menores influências de agentes estressores com o aumento da resistência.

Em anfíbios, a enzima l-gulonolactona oxidase está presente, porém não sintetiza o ácido ascórbico em quantidades adequadas para a manutenção das funções fisiológicas (Nandi *et al.*, 1997). Fracalossi *et al.* (2001) estudaram a atividade desta enzima no fígado e rim de 11 espécies de peixes teleósteos e verificaram inexistência de suas ações. Em *Miliobatiformes* e *Lepidosireniiformes*, a enzima encontrava-se ativa, mas, como em ambiente natural a dieta é farta em ácido ascórbico, sua síntese nos animais referidos torna-se insuficiente, com necessidade da suplementação dietética (Nandi *et al.*, 1997; Fracalossi *et al.*, 2001).

Halver *et al.* (1975) definiram a lordose, escoliose, letargia, exoftalmia hemorrágica, ascite, anemia e hemorragia muscular como sinais clínicos de insuficiência de ácido ascórbico em peixes. Esta mesma vitamina é necessária na dieta de girinos dada a redução de mortalidade e de deformações estruturais com a suplementação, embora as informações sobre seus efeitos nestes animais sejam escassas (Leibovitz *et al.*, 1982; Stéfani *et al.*, 2001).

A análise de variância e os valores do ganho de peso e taxa de crescimento específico são apresentados na Tabela 3. Sua análise permite verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os indivíduos de mesmo tratamento. No entanto, com relação aos tratamentos, houve diferença significativa ($p < 0,01$) em ambas as variáveis. O maior ganho de peso dos girinos (4,22 g) foi observado no T_2 (2.000 mg vit C kg^{-1} ração), o qual não diferiu significativamente

do T_1 (4,03 g). O pior ganho de peso (2,93 g) foi observado nos girinos que não receberam suplementação com vitamina C (T_0). O mesmo comportamento foi observado para taxa de crescimento específico, em que os girinos com 2000 mg vit C kg^{-1} ração apresentaram a maior taxa (6,03% dia^{-1}).

Tabela 3. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas na análise da variância para ganho de peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE).

Table 3. F Value, Variation coefficient (VC) and means of variation analyze to weight gain and specific growth indexes.

Estatísticas Statistics	Variáveis	
	GP (g) Weight gain	TCE (%/dia) Specific growth indexes
F para tratamento (T) F to Treatment	8,32**	8,32**
F para Indivíduos (T) F to individuals	1,54	1,54
CV parcela (%) VC bit	41,41	41,41
CV subparcela (%) VC middle bit	33,35	33,35
Médias Means		
	T_0	2,93 ^c
	T_1	4,03 ^{ab}
	$T_{1,5}$	3,27 ^{bc}
	T_2	4,22 ^a
		6,03 ^a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Means, within a column, followed by the same letter do not differ ($p < 0,05$) by Tukey test). **Significativo a 1% de probabilidade (Significance by 1% probability).

Na literatura consultada sobre suplementação com vitamina C, em dieta para girinos de rã-touro, não foi observada interferência sobre o ganho de peso (Leibovitz *et al.*, 1982; Stéfani *et al.*, 2001), provavelmente porque os níveis utilizados foram inferiores aos do presente trabalho. Por outro lado, Soliman *et al.* (1994) observaram que tilápias do Nilo suplementadas com vitamina C, apresentaram maior crescimento do que aquelas sem suplementação de vitamina C. Os autores concluíram que a deficiência em ácido ascórbico deprime a absorção de iodo pela tireóide com aumento da concentração plasmática deste mineral, sugerindo a hipoatividade tireoideana. Deste modo, o retardo do crescimento pode ser atribuído à redução dos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos reguladores do crescimento.

Esses resultados diferem dos observados por Fujimoto (2001) em alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e de Almeida (2003) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que não verificaram diferença significativa entre os tratamentos para ganho de peso e taxa de crescimento específico. No entanto, ambos observaram tendência ao aumento das variáveis acima mencionadas em função do aumento da concentração de vitamina C na dieta. A taxa de crescimento específico observada nesse ensaio foi superior àquela obtida por Lee *et al.* (1998) (0,44 a 1,08% dia^{-1}) em *Sebastes schlegeli* e por Almeida (2003) (média de 2,72% dia^{-1}) em pacu suplementado com vitamina C.

A Figura 1 ilustra que, após 45 dias de período experimental, houve redução do peso dos girinos provavelmente devido à diminuição da temperatura da água e, conseqüentemente, diminuição no consumo de ração. Após 60 dias, o peso dos girinos aumentou novamente, observando-se que os animais do T₂ (2.000 mg vit C kg⁻¹ ração) e T₁ (1.000 mg vit C kg⁻¹ ração) apresentaram peso médio final mais elevado.

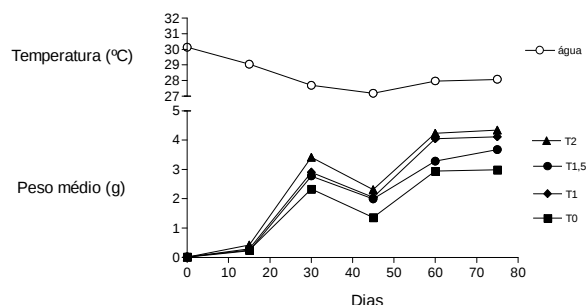


Figura 1. Peso médio de girinos de *Rana catesbeiana* e temperatura da água nos diferentes tratamentos em função do tempo (T₀ = RC; T₁ = RC + 1.000 mg vit C kg⁻¹; T_{1.5} = RC + 1.500 mg vit C kg⁻¹; T₂ = RC + 2.000 mg vit C kg⁻¹).

Figure 1. Middleweight of *Rana catesbeiana* tadpoles and water temperature in different treatments under different periods of time.

Conclusão

Os resultados deste ensaio sugerem que a suplementação com vitamina C na dieta para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) melhora o desempenho zootécnico, e que com 2.000 mg vit C kg⁻¹ foram obtidos os melhores índices. Portanto, a suplementação alimentar com vitamina C pode ser indicada para a obtenção de animais de boa qualidade em criação comercial.

Referências

- ADAMS, I.K.; BRUISMA, E.C. Intensive commercial bullfrog culture: a Brazilian experience. *Aquac. Econ. Manag.*, Oxford, v. 358, n. 4, p. 28-44, 1987.
- ALMEIDA, G.S.C. Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). 2003. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- BRUM, C.D. Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades. 2003. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)–Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- CASTRO, J.C.; PINTO, A.T. Qualidade de água em tanque de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802, cultivados em diferentes densidades de estocagem. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 29, n.6, p. 1903-1911, 2000.

COMBS, G.F. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. New York: Academic Press, 1992.

DABROWSKI, K. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. *Biol. Chem.*, Hoppe-Seyler, v. 371, p. 207-214, 1990.

FRACALOSS, D.M. *et al.* Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 192, p. 321-332, 2001.

FUJIMOTO, R.Y. Adição de ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829). 2001. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

HALVER, J.E. The vitamins. In: HALVER, J.E. (Ed.). *Fish nutrition*. Washington: D.C.: Academic Press, 1989. cap. 2, p. 31-109.

HALVER, J.E. Vitamin requirement study techniques. *J. Appl. Ichthyol.*, Berlin, v. 13, p. 215-228, 1995.

HALVER, J.E. *et al.* Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, v. 258, p. 70-71, 1975.

HAYASHI, C. *et al.* Desenvolvimento de girinos rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivados em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 14-20, 2004.

LEE, K.J. *et al.* Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* (Hilgendorf). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 29, n. 4, p. 237-244, 1998.

LEIBOVITZ, H.E. *et al.* Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively cultured bullfrog larvae *Rana catesbeiana* reared at two pH levels. *J. World Maricul. Soc.*, London, v. 13, p. 322-328, 1982.

LIN, M.F.; SHIAU, S.Y. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacul. Nutr.*, London, v. 10, p. 327-333, 2004.

LOVELL, R.T. *Nutrition and feeding of fish*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988.

MARTINEZ, I.P. *et al.* Response of hatchery-reared *Rana perezii* larvae fed different diets. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 128, p. 235-244, 1994.

MARTINEZ, I.P. *et al.* Growth and metamorphoses of *Rana perezii* larvae in culture: effects of larval density. *Aquaculture*, Amsterdam, n. 142, p. 163-170, 1996.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Claracidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabialis* (monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 31, p. 655-658, 1998.

MITRA, G.; MUKLOPADHYAY, P.K. Dietary essentiality of ascorbic acid in rohy larvae: quantification with ascorbic acid enriched zooplankton. *Aquacult. Intern.*, London, v. 11, n. 1-2, p. 81-93, 2003.

MORAES *et al.* Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *B. Inst. Pesca*, São Paulo,

v. 29, n. 1, p. 57-67, 2003.

NANDI, A. et al. Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. *Free Radical Bio. Med.*, New York, v. 22, n. 6, p. 1047-1954, 1997.

PETRIC, M.C. et al. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2003.

ROBBINS, S.L. et al. Inflamação e reparação. In: *Patologia básica*. São Paulo: Atheneu, 1986. cap. 2, p. 32-68.

SEIXAS FILHO, J.T. et al. Efeitos de níveis de energia e proteína bruta no desempenho de girinos (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 664-669, 1998a.

SEIXAS FILHO, J.T. et al. Efeito da granulometria da ração sobre desenvolvimento de girinos de *Rana catesbeiana*. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 224-230, 1998b.

SHIAU, S.Y.; HSU, T.S. L-Ascorbyl-2-sulfate has equal

antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 133, p. 147-157, 1995.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Limnologia aplicada à aqüicultura*. Jaboticabal: Funep/Unesp, 1994. (Boletim técnico, n. 1).

SOLIMAN, A.K. et al. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirements of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish. Manag.*, Amsterdam, v. 25, p. 269-278, 1994.

STÉFANI, M.V. et al. Suplementação com vitaminas C e E sobre o desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 869-871, 2001.

Received on May 15, 2007.

Accepted on August 08, 2007.