

Jorgelia de Jesus Pinto Castro

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, QUALIDADE ESPERMÁTICA  
E HEMATOLOGIA DE MACHOS DE TAINHA, *Mugil liza*,  
SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO  
ASCÓRBICO DIETÉTICO DURANTE A PRIMEIRA  
MATURAÇÃO EM CATIVEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Débora Machado Fracalossi

Florianópolis- SC  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Castro, Jorgelia de Jesus Pinto

Desempenho zootécnico, qualidade espermática e hematológica de machos de tainha, Mugil liza, submetidos a diferentes concentrações de ácido ascórbico dietético durante a primeira maturação em cativeiro / Jorgelia de Jesus Pinto Castro ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira, coorientadora, Débora Machado Fracalossi, 2018.  
54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Reprodução. 3. Sêmen. 4. Vitamina C. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani . II. Fracalossi, Débora Machado . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Desempenho zootécnico, qualidade espermática e hematológica de machos de tainha, *Mugil liza*, submetidos a diferentes concentrações de ácido ascórbico dietético durante a primeira maturação em cativeiro**

Por

JORGELIA DE JESUS PINTO CASTRO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



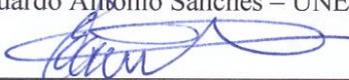
---

Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira – *Orientador*



---

Dr. Eduardo Antônio Sanches – UNESP



---

Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



Este trabalho é dedicado a minha querida mãe: Jovelina Castro e sobrinhas: Emmily Melissa e Kévellyn Kamilly.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela família e por todas as bênçãos e maravilhas por Ele concedida;

A minha Rainha, amiga e Mãe: Jovelina de Jesus Pinto Castro, agradeço pela força, confiança, paciência, carinho, dedicação e todo amor ao longo de toda a minha vida, foi com ela que pude reimprimir a dignidade, honestidade e paixão por aquilo que se faz e pela vida;

Agradeço aos meus irmãos, Jorgiane, Nilce e Mário, por serem parte de mim, pela força e confiança, de maneira mais especial à minha querida Lene, que tem fundamental importância na escolha desta profissão e sempre me apoiou nas decisões.

A minha segunda família, aquela que com toda certeza foi minha base durante esses dois anos em Florianópolis, (Leyci, Ewerton, Moara, Greyci e Thamy), foram muitas alegrias, tristezas, medos e desafios divididos, vocês sempre estarão no meu coração independente da distância e do tempo, amo todos vocês.

A família Lapmar (Ewertinho, Fernanda, Fabiola, Fábio, João, Ulysses, Cleize de modo especial a Caio, Morgana ( obrigada pelas caronas de todos os dias) e Filipe que estiveram junto comigo e me apoiaram nas etapas de execução desse trabalho, meu muito obrigada!.

Agradeço ao Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira pela orientação durante o mestrado e contribuição com conhecimento e a professora Dr<sup>a</sup>. Débora Machado Fracalossi pela co-orientação e toda ajuda durante o mestrado.

Agradeço às empresas: DSM, São Paulo/SP, na pessoa do Eng. e M.Sc. em Aquicultura Thiago Soligo, e Nicoluzzi Rações Ltda. (Penha, SC) na pessoa do Eng. de Aquicultura Alexander Hilata, pela parceria e fornecimento de material para execução do trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura-PPGAQI, que não mediram esforços para transmitir conhecimento.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo fomento da bolsa de estudo.

Todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meu muito OBRIGADA!!!



“Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ele vai gastar toda sua vida acreditando que ele é estúpido”.

(Albert Einstein)



## RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a influência da suplementação dietética de vitamina C no desempenho zootécnico, hematológico e qualidade espermática de machos de tainha, *Mugil liza*, na primeira maturação sexual. Foram testadas seis dietas com diferentes níveis de vitamina C (0; 53; 107; 216; 482 e 708 mg Kg<sup>-1</sup>), em triplicata, num experimento com duração de 75 dias. Foram utilizados 144 indivíduos (299,2 ± 10,8 g; 25,4 ± 0,4 cm) em 18 tanques circulares de 500 L, com densidade de 8 peixes por tanque em fluxo contínuo de água. No final do experimento todos os peixes foram amostrados para avaliação de peso e comprimento. O sangue foi coletado (9 peixes por tratamento) para análise de glicose, proteína total e contagem de eritrócitos. Doze peixes de cada tratamento foram sacrificados para determinar os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). O sêmen foi coletado (9 peixes por tratamento) para avaliação de motilidade, concentração espermática e integridade da membrana. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no desempenho zootécnico. Os resultados de IGS, IHS e proteína total também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Mas o número de eritrócitos foi menor no tratamento controle (sem vitamina C). Além disso, a qualidade espermática foi influenciada pela suplementação de vitamina C, pois os valores mais altos para o tempo de motilidade foram com 53 e 107 mg kg<sup>-1</sup>, para a taxa de motilidade foram com 107, 216 e 708 mg kg<sup>-1</sup>, e para a integridade da membrana celular foram com 107 e 216 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que o menor valor de densidade espermática foi no controle. Conclui-se que a suplementação de vitamina C na dieta não afetou o desempenho zootécnico, mas níveis entre 107 e 216 mg kg<sup>-1</sup> melhoraram a qualidade espermática de machos de tainha na primeira maturação sexual.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Reprodução, Sêmen, Vitamina C



## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of the ascorbic acid on growth parameters and sperm quality of Lebranche mullet, *Mugil liza*. Six diets with different levels of ascorbic acid (0; 53; 107; 216; 482 and 708 mg Kg<sup>-1</sup>) were provided before the breeding period, during 75 days. At the end of the experiment weight and total length measurements were taken for each fish. Blood samples were collected for glucose and total protein analyses, and red blood cells counting. Twelve fish from each treatment were euthanized for hepatosomatic (HSI) and gonadosomatic index (GSI) determination. Semen was collected from nine fish per treatment for analyses (sperm motility, sperm cell concentration and plasma membrane integrity). Growth parameters, total protein, HSI and GSI did not differ significantly ( $P > 0,05$ ) among groups. However, red blood cell level was significantly lower in the control (without vitamin C). Further, semen quality was influenced by vitamin C concentration, as the highest levels were found for motility time with 53 and 107 mg kg<sup>-1</sup>, for percentage of motility with 107, 216 and 708 mg kg<sup>-1</sup>, and for membrane integrity with 107 and 216 mg kg<sup>-1</sup>, while the lowest level of sperm concentration was in the control. Considering these results, this study suggests that vitamin C supplementation didn't affect growth performance, but dietary levels of ascorbic acid between 107 and 216 mg kg<sup>-1</sup> increased most spermatic parameters of *M. liza*.

**Keywords:** Aquaculture, Reproduction, Semen, Ascorbic acid



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Exemplar de tainha ( <i>Mugil liza</i> ) .....	22
--	----



## LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1** Principais resultados do efeito do ácido ascórbico na qualidade de gametas e no desempenho reprodutivos de peixes..... 25
- TABELA 2** Formulação e composição da dieta experimental de tainha, *Mugil liza* contendo diferentes níveis de vitamina C ..... 33
- TABELA 3** Parâmetros zootécnicos de adultos de *Mugi liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias ..... 36
- TABELA 4** Índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) e parâmetros hematológicos de adultos de *M. liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias ..... 36
- TABELA 5** Parâmetros espermáticos de *Mugil liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias ..... 37



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
1.1	PISCICULTURA MARINHA .....	21
1.1.1	<b>Família Mugilidae</b> .....	21
1.1.2	<b>Nutrição de Reprodutores</b> .....	23
1.1.3	<b>Parâmetros Espermáticos</b> .....	25
1.1.4	<b>Motilidade Espermática</b> .....	26
1.1.5	<b>Concentração Espermática</b> .....	26
1.1.6	<b>Morfologia Espermática</b> .....	27
1.2	OBJETIVOS .....	27
1.2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	27
1.2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	27
1.3	FORMATAÇÃO DO ARTIGO .....	28
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	29
2.1	INTRODUÇÃO .....	30
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
2.2.1	<b>Material Biológico e Delineamento Experimental</b> .....	32
2.2.2	<b>Dietas Experimentais e Manejo</b> .....	32
2.2.3	<b>Índices Zootécnicos e Coleta de Sangue</b> .....	34
2.2.4	<b>Parâmetros Reprodutivos e Coleta de Sêmen</b> .....	34
2.2.5	<b>Análise estatística</b> .....	35
2.3	RESULTADOS .....	35
2.4	DISCUSSÃO.....	37
2.5	REFERÊNCIAS .....	40
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	47



# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 PISCICULTURA MARINHA

O Brasil, a piscicultura marinha teve início no século XVII, sendo o Estado de Pernambuco pioneiro nessa atividade. Inicialmente foram cultivados robalos (*Centropomus* sp.), tainhas (*Mugil* sp.) e carapebas (*Eugerres* sp. e *Diapterus* sp.) em viveiros de maré em sistema extensivo (VON IHERING, 1932). O litoral brasileiro possui uma diversidade íctica com potencial para essa atividade, entre as espécies destacam-se: robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), ciobas (*Lutjanus analis*), ariacó (*Lutjanus synagris*), garoupa (*Epinephelus marginatus*), pampo (*Trachinotus marginatus*), peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*), bijupirá (*Rachycentron canadum*) e tainha (*Mugil liza*). Várias dessas espécies, ou congêneres, são criadas comercialmente em outros países, entretanto, apesar do grande número de espécies, infelizmente a produção nacional comercial ainda não é uma realidade (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011).

### 1.1.1 Família Mugilidae

As espécies do gênero *Mugil* pertencem à família Mugilidae, da ordem Perciformes e classe Actinopterygii. Segundo (MENEZES, N. A., 1983), sete espécies do gênero *Mugil* ocorrem no litoral brasileiro: *M. liza*, *M. curema*, *M. platanus*, *M. incilis*, *M. gaimardianus*, *M. curvidens* e *M. trichodon*. Porém, posteriormente Menezes et al. (2010) consideraram como uma única espécie a *M. platanus* e *M. liza*. Problemas envolvendo identificação, morfologia e comportamento das populações dessas espécies são comuns por apresentarem características merísticas e morfológicas muito semelhantes. Recentemente, o gênero teve o seu status taxonômico revisado (FRAGA et al., 2007; MENEZES et al., 2010; DURAND et al., 2012). A tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Figura 1), se destaca em relação às demais espécies por apresentar características produtivas mais atrativas (LEMOS et al., 2014; MENEZES et al., 2015). Os peixes dessa família tem ampla distribuição, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil ocorre praticamente em toda a costa, desde o litoral do Maranhão até o Rio Grande do Sul (CERVIGÓN, 1992), principalmente em regiões costeiras, estuarinas, marinhas e também em lagoas hipersalinas. Normalmente são encontradas em profundidades médias de 20 m, pois são peixes catádromos, com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários; possuem hábito alimentar zooplânctofago quando juvenil e iliófago quando adulto (MENEZES, N. A., 1983).

**FIGURA 1.** Exemplar de tainha (*Mugil liza*).

Fonte: acervo pessoal: Jorgelia Castro, 2017



Os jovens permanecem no estuário, ambiente calmo e rico em alimento, ideal para a formação das gônadas, enquanto a desova ocorre em alto mar durante o período de migração reprodutiva. São explorados comercialmente em todas as regiões de ocorrência, possuindo uma grande importância na alimentação humana. Entre os anos de 2008 e 2009 a tainha foi a nona espécie mais capturada pela pesca extrativa no Brasil (Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA, 2009).

Várias espécies de mugilídeos apresentam potencial para aquicultura. Países como Itália, Israel, Taiwan, Egito, Cuba e Colômbia possuem cultivo consolidado dessas espécies (GODINHO, SERRALHEIRO e SCORVO FILHO, 1988).

Trabalhos com a *Mugil liza* tem sido realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha-LAPMAR/UFSC. As pesquisas envolveram diversos aspectos como captura no ambiente natural, transporte e adaptação de reprodutores selvagens em cativeiro, indução hormonal, desova, larvicultura e qualidade e conservação de espermatozoides (CARVALHO et al., 2014; PASSINI et al., 2015; MAGNOTTI, 2017). Para aprimorar o manejo e cultivo dessa espécie, desde 2015 estão sendo realizadas pesquisas sobre o controle da maturação, desova em laboratório e alimentação de larvas, efeito da dureza no cultivo em água doce e frequência alimentar em juvenis.

Dentre as espécies de peixe marinho cultivadas no Brasil, a tainha tornou-se uma das melhores alternativas por reunir características ideais como: rusticidade, rápido crescimento, fácil adaptação ao cativeiro, ampla tolerância à temperatura e salinidade, hábito alimentar onívoro e facilidade em consumir rações artificiais, além de eficiência com alimentos de origem vegetal, sem comprometer o desempenho zootécnico (GISBERT et al., 2016).

A piscicultura marinha é uma atividade que tem grande potencial no Brasil em função da sua privilegiada extensão litorânea ( 8,5 mil km), seu mar territorial e sua zona Econômica Exclusiva (ZEE) de duzentas milhas (4,5 milhões de Km<sup>2</sup>) e mais de 2,5 milhões de hectares de áreas estuarina, além de uma biodiversidade de organismos aquáticos (CASTELLO, 2010). Entretanto, é necessário que essa atividade encontre formas de melhorar a produção de ovos, larvas e alevinos, melhorando os índices reprodutivos, pois este é um fator limitante para o desenvolvimento dessa atividade (ANDRADE e YASUI, 2003). Uma das formas de melhorar a produção de larvas é através de avanços nos estudos de nutrição e manejo de reprodutores.

### 1.1.2 Nutrição de Reprodutores

A nutrição dos reprodutores tem fundamental importância no desenvolvimento gonadal e especialmente na qualidade da desova. Portanto, o estado nutricional dos reprodutores é um fator determinante na reprodução de peixes em cativeiro (IZQUIERDO, FERNANDEZ-PALACIOS e TACON, 2001; WATANABE e KIRON, 1994). Uma dieta ineficiente tem efeitos negativos na maturação de peixes, por exemplo com *Dicentrarchus labrax* (CERDÁ et al., 1994) foram testadas duas dietas variando níveis de proteína, lipídeos e carboidratos, que influenciaram negativamente no desempenho reprodutivo. Em *Clarias gariepinus*, uma dieta contendo 40% de proteína bruta resultou em melhor desenvolvimento gonadal e também no desempenho das larvas (SOTOLU, 2010). O aumento dos níveis de lipídios de 12% para 18% em dietas para reprodutores de “rabbitfish” (*Siganus guttatus*) teve um aumento significativo na fecundidade (DURAY, KOHNO e PASCUAL, 1994).

Quanto aos micronutrientes, suas exigências nutricionais são específicas para cada espécie de peixe, estado fisiológico, fase de desenvolvimento, além da disponibilidade no ingrediente alimentar (NAVARRO et al., 2010). As vitaminas são necessárias em pequenas quantidades para os peixes apresentarem saúde, crescimento normal e metabolismo adequado, além de promover o sucesso na reprodução através da transferência dos nutrientes dos reprodutores para os gametas (PEZZATO, 1999). A transferência de nutrientes como o ácido ascórbico pode influenciar na qualidade dos gametas, fecundidade, qualidade de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas (NAVARRO et al., 2009).

O ácido ascórbico tem uma considerável importância para os peixes devido à ação que tem sobre processos metabólicos (crescimento, reprodução, resposta ao estresse e resistência a doenças). Apesar dessa

importância, os peixes não conseguem sintetizá-lo devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase que possibilita a sua síntese a partir da glicose (FUJIMOTO e SANTOS; CARNEIRO, 2013; TOUHATA et al., 1995). A incapacidade dos vertebrados em sintetizar o ácido ascórbico se deve à abundância desse nutriente na dieta natural, consequentemente não necessitaram preservar a habilidade biosintética (FRACALOSSO et al., 1998).

O ácido ascórbico é o agente redutor mais potente disponível às células, atuando como antioxidante, pelo alto potencial de redução (ROTTA, 2003). Participa como cofator nas reações de hidroxilação para a síntese de carnitina, norepinefrina (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; SOLIMAN, JAUNCEY e ROBERTS, 1986), colágeno e resposta imune (ZHOU et al., 2012), além de manter a integridade da membrana celular, impedindo sua peroxidação lipídica em ação sinérgica com a vitamina E (GAO et al., 2014; JOBLING, 2012)..

A relação do ácido ascórbico com a reprodução nos peixes está na sua participação na fase de vitelogênese e embriogênese (ROTTA, 2003), e se estende até alimentação exógena das larvas. Alguns estudos mostram que dietas isentas ou com baixas concentrações de ácido ascórbico tem efeito negativo no desempenho reprodutivo de fêmeas e machos (NAVARRO et al., 2009). Segundo Chinoy et al. (1986), a vitamina C é essencial para a síntese, desenvolvimento e manutenção do sêmen, pois além de reduzir as aglutinações nas células espermáticas, diminui a quantidade das alterações morfológicas primárias e secundárias (MATAVELI et al., 2007). Os efeitos do ácido ascórbico têm atraído a atenção de vários pesquisadores nos últimos anos, devido a sua importância no crescimento, sobrevivência, resistência ao estresse e diminuição da incidência de algumas anormalidades morfológicas em larvas de peixes (DARIAS et al., 2011; HAMRE et al., 1997). A Tabela 1 apresenta uma revisão sobre a influência do ácido ascórbico no desempenho reprodutivo e qualidade espermática em peixes.

**TABELA 1.** Principais resultados do efeito do ácido ascórbico na qualidade de gametas e no desempenho reprodutivos de peixes.

Espécie	Ácido ascórbico (mg Kg <sup>-1</sup> )	Resultados	Autor
<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 261, 599 e 942	A motilidade, o vigor e a concentração foram maiores com 599 e 942 mg Kg <sup>-1</sup> .	Sarmento et al. (2017)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	300 e 800	800 mg Kg <sup>-1</sup> melhorou concentração e motilidade espermática e a capacidade de fertilização dos espermatozoides.	Canyurt e Akhan (2008)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 75, 150, 225, e 300	As características físico-químicas do sêmen não foram influenciadas pela suplementação.	Mataveli et al. (2007)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	0 e 870	Aumentou o tempo de motilidade e teve declínio na capacidade de fertilização.	Ciereszko e Dabrowski (2000)
<i>Perca flavescens</i>	C E, +C E, +E C +C+E e -C-E	A utilização das vitaminas em conjunto +C +E, resultou em melhor crescimento, qualidade do sêmen e fertilização.	Lee e Dabrowski (2004)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 150, 300 e 600	150 e 300 mg Kg <sup>-1</sup> resultaram em aumento do IGS.	Martins et al. (2016)
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	500 e 1000	500 mg Kg <sup>-1</sup> aumentou o tempo de motilidade e 1000 mg Kg <sup>-1</sup> melhorou a taxa da motilidade e concentração espermática.	Metwally e Fouad (2009)
<i>Onchorynchus mykiss</i>	0, 110 e 870	A peroxidação lipídica diminuiu com a suplementação de ácido ascórbico.	Liu, Ciereszko e Dabrowski (1997)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0, 75, 150 e 225	A motilidade espermática aumentou linearmente com a adição do ácido ascórbico.	Mataveli et al. (2010)

### 1.1.3 Parâmetros Espermáticos

O conhecimento sobre a qualidade espermática permite maior eficiência na reprodução, pois as características espermáticas variam muito entre as espécies de peixes e a sua avaliação é de grande importância para promover a fertilização artificial (SOLIS-MURGAS et al., 2011). Características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e características morfológicas são importantes para a descrição de um perfil espermático (ROUTRAY et al., 2007). A qualidade do sêmen não está limitada apenas na capacidade de fertilizar o ovócito mas também na contribuição para um desenvolvimento

embrionário bem sucedido, através da transferência dos nutrientes dos reprodutores para os gametas (MILIORINI, 2006).

O espermatozoide da maioria dos peixes, ao contrário dos mamíferos, não possui motilidade no plasma seminal dentro do testículo, necessitando de um meio aquoso (TAKAI e MORISAWA, 1995), onde há influência de vários fatores, sendo a osmolaridade, composição iônica, pH e temperatura os principais (VETTORAZZI, 2012).

#### **1.1.4 Motilidade Espermática**

A motilidade espermática é caracterizada pelo tempo e porcentagem de células em movimento após ativação. É considerada o principal parâmetro para avaliar a qualidade do sêmen, pois requer um alto consumo de energia pelo espermatozoide para início do movimento flagelar (COSSON et al., 1999). O tempo de motilidade varia muito entre as espécies, peixes de água doce possuem um tempo muito curto quando comparados com espécies marinhas e estuarinas. A análise da motilidade é útil para comparar diferentes condições experimentais, como procedimentos de coleta, diluição do sêmen, condições de armazenamento, efeitos de biotecnologia como vitrificação e criopreservação.

O método mais simples de determinar a taxa de motilidade é através de análise subjetiva que é feita pela observação direta no microscópio, o avaliador estima uma taxa de 0 a 100% de células móveis (CUEVAS-URIBE et al., 2015). Para determinar o tempo de motilidade utiliza-se um cronômetro que mede desde o momento da ativação até a último movimento dos espermatozoides. Outro método muito utilizado no estudo da motilidade é o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), um sistema automático (hardware e software *Sperm Class Analyser* - SCA) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas. Neste caso, a motilidade e seus diversos componentes, como velocidade, trajetória, batimento flagelar e movimento dos espermatozoides, são aferidos para avaliar e diferenciar os padrões de movimento da célula, como velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) (MORTIMER, 2000). Para isto, utiliza-se a vídeo micrografia que faz o monitoramento constante e a análise sequencial do movimento do espermatozoide (KAY e ROBERTSON, 1998).

#### **1.1.5 Concentração Espermática**

A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozoide por mililitro de sêmen, é facilmente calculada por

diferentes técnicas como contagem microscópica, espectrofotometria ou espermátocrito. A densidade pode variar de acordo com o peso ou idade do peixe, época do período reprodutivo, frequência de coleta e volume coletado (SOLIS-MURGAS et al., 2011; VIVEIROS e GODINHO, 2009).

### **1.1.6 Morfologia Espermática**

Os espermatozoides de peixes são morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda, e não possuem acrossoma, o que é compensado pela presença da micrópila no ovócito, que facilita a entrada do espermatozoide no momento da fecundação (COSSON et al., 1999).

A morfologia espermática tem sido utilizada principalmente para identificar e quantificar deformidades ou anomalias. Essas alterações podem ser divididas em dois grupos: as primárias, que são resultados da espermatogênese, enfermidades, consanguinidades, restrição alimentar ou estresse ambiental (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas próxima e distal) e as secundárias, que são relacionadas ao procedimento de manejo durante a coleta do sêmen (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia e microcefalia) (HERMAN et al., 1994). A avaliação é feita através de esfregaços corados (Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros), contagem de 200 células por lâmina em microscópio ou ainda com auxílio de programas específicos para análise de imagem.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Verificar a influência da suplementação de ácido ascórbico dietético no desempenho zootécnico, qualidade espermática e parâmetros hematológicos de machos de tainha (*Mugil liza*), durante o primeiro período reprodutivo.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o desempenho zootécnico: crescimento em comprimento e peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar;

Avaliar parâmetros reprodutivos: índice gonadossomático e hepatossomático;

Avaliar parâmetros hematológicos: glicose, proteínas totais e concentração de eritrócitos;

Avaliar as características espermáticas: tempo de motilidade, taxa de motilidade, concentração espermática e integridade de membrana celular.

### 1.3 FORMATAÇÃO DO ARTIGO

No desenvolvimento desta dissertação será apresentado um artigo científico, redigido seguindo as regras da revista *Aquaculture Research* (JCR 1,606, Qualis A2)

## 2. ARTIGO CIENTÍFICO

### EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE TAINHA, *Mugil liza*

Effect of ascorbic acid supplementation on zootechnical performance, hematological parameters and spermal quality of Lebranche mullet *Mugil liza*

Jorgelia Castro<sup>1</sup>, Caio Magnotti<sup>1</sup>, Morgana Angelo<sup>1</sup>, Fabio Sterzelecki<sup>1</sup>, Maria Fernanda Oliveira<sup>2</sup>, Débora Fracalossi<sup>2</sup>, Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>1</sup>

1 Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha-CCA/UFSC (LAPMAR), Florianópolis, SC, CEP 88062-601, Brasil.

2 Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - CCA/UFSC (LABNUTRI), Florianópolis, SC, CEP 88066-260, Brasil.

#### RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a influência da suplementação dietética de vitamina C no desempenho zootécnico, hematológico e qualidade espermática de machos de tainha, *Mugil liza*, na primeira maturação sexual. Foram testadas seis dietas com diferentes níveis de vitamina C (0; 53; 107; 216; 482 e 708 mg Kg<sup>-1</sup>), em triplicata, num experimento com duração de 75 dias. Foram utilizados 144 indivíduos (299,2 ± 10,8 g; 25,4 ± 0,4 cm) em 18 tanques circulares de 500 L, com densidade de 8 peixes por tanque em fluxo contínuo de água. No final do experimento todos os peixes foram amostrados para avaliação de peso e comprimento. O sangue foi coletado (9 peixes por tratamento) para análise de glicose, proteína total e contagem de eritrócitos. Doze peixes de cada tratamento foram sacrificados para determinar os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). O sêmen foi coletado (9 peixes por tratamento) para avaliação de motilidade, concentração espermática e integridade da membrana. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no desempenho zootécnico. Os resultados de IGS, IHS e proteína total também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Mas o número de eritrócitos foi menor no tratamento controle (sem vitamina C). Além disso, a qualidade espermática foi influenciada pela suplementação de vitamina C, pois os valores mais altos para o tempo de motilidade foram com 53 e 107 mg

kg<sup>-1</sup>, para a taxa de motilidade foram com 107, 216 e 708 mg kg<sup>-1</sup>, e para a integridade da membrana celular foram com 107 e 216 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que o menor valor de densidade espermática foi no controle. Conclui-se que a suplementação de vitamina C na dieta não afetou o desempenho zootécnico, mas níveis entre 107 e 216 mg kg<sup>-1</sup> melhoraram a qualidade espermática de machos de tainha na primeira maturação sexual.

**Palavras-chave:** Reprodução, Sêmen, Vitamina C

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate the influence of the ascorbic acid on growth parameters and sperm quality of Lebranche mullet, *Mugil liza*. Six diets with different levels of ascorbic acid (0; 53; 107; 216; 482 and 708 mg Kg<sup>-1</sup>) were provided before the breeding period, during 75 days. At the end of the experiment weight and total length measurements were taken for each fish. Blood samples were collected for glucose and total protein analyses, and red blood cells counting. Twelve fish from each treatment were euthanized for hepatosomatic (HSI) and gonadosomatic index (GSI) determination. Semen was collected from nine fish per treatment for analyses (sperm motility, sperm cell concentration and plasma membrane integrity). Growth parameters, total protein, HSI and GSI did not differ significantly ( $P > 0,05$ ) among groups. However, red blood cell level was significantly lower in the control (without vitamin C). Further, semen quality was influenced by vitamin C concentration, as the highest levels were found for motility time with 53 and 107 mg kg<sup>-1</sup>, for percentage of motility with 107, 216 and 708 mg kg<sup>-1</sup>, and for membrane integrity with 107 and 216 mg kg<sup>-1</sup>, while the lowest level of sperm concentration was in the control. Considering these results, this study suggests that vitamin C supplementation didn't affect growth performance, but dietary levels of ascorbic acid between 107 and 216 mg kg<sup>-1</sup> increased most spermatoc parameters of *M. liza*.

**Keywords:** Reproduction, Semen, Ascorbic acid

## 2.1 INTRODUÇÃO

A família Mugilidae é representada por 66 espécies e 17 gêneros, com distribuição mundial em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (Monteiro-Ribas & Bonecker, 2001). A *Mugil liza* é a principal espécie dessa família na costa Atlântica da América do Sul, com grande importância na pesca artesanal e industrial, apesar dos últimos anos as

condições ambientais terem sido favoráveis para recrutamento dessa espécie, foi observado uma queda dos estoques de juvenis em decorrência do aumento do esforço de pesca sobre esse recurso, essa espécie tornou-se um importante alvo durante o período reprodutivo, devido ao alto valor de mercado das gônadas (Morais; Lemos; Castello & Vieira, 2012). No estado de Santa Catarina a pesca da tainha é voltada principalmente por pescadores artesanais, tendo a maior produção em 1980 com um máximo de produção de 2.700 t, a menor produção foi em 2007 com 250 t, desde então uma crescente com uma produção de 500 t em 2013 (FEPESC, 2013).

O cultivo de mugilídeos é uma realidade em vários países como Itália, Israel e Egito, destacando-se a produção de *Mugil cephalus* (FAO, 2011). A tainha *Mugil liza* também se destaca por seu potencial produtivo, principalmente por suportar ampla variação de temperatura e salinidade, fácil adaptação ao ambiente de cativeiro e hábito alimentar onívoro, o que facilita na aceitação de dietas artificiais e diminui o custo de produção (Baldisserotto, 2013). Pesquisas sobre a sua reprodução em cativeiro, indução hormonal, desova e larvicultura tem sido desenvolvidas em território brasileiro (Cerqueira et al., 2017).

Apesar dos avanços já obtidos com as pesquisas é necessário que a piscicultura marinha encontre formas de melhorar a produção de larvas e juvenis, aperfeiçoando os índices reprodutivos, que muitas vezes estão diretamente relacionadas às condições nutricionais dos reprodutores (Izquierdo; Fernandez-Palacios & Tacon, 2001). Uma dieta ineficiente prejudica o funcionamento do sistema endócrino, a funcionalidade dos órgãos reprodutivos e a qualidade gamética (Maggioni et al., 2008).

As vitaminas são requeridas em pequenas quantidades e sua exigência nutricional depende da espécie, estado fisiológico, fase de desenvolvimento, além da disponibilidade no ingrediente alimentar (Navarro et al., 2010). O ácido ascórbico, vitamina C, é uma vitamina essencial devido à incapacidade de sua síntese pelos teleósteos, em função da ausência da enzima L-gulonolactona oxidase (Touhata et al., 1995). Ela tem efeito no crescimento, sobrevivência, resistência ao estresse e diminuição da incidência de algumas anormalidades morfológicas de larvas de peixes (Darias et al., 2011 & Hamre et al., 1997). Também é essencial para a síntese, desenvolvimento e manutenção normal do sêmen, além de reduzir as aglutinações nas células espermáticas (Chinoy et al., 1986), e a sua deficiência causa redução na performance reprodutiva (Sönmez, Türk, & Yüce, 2005). Assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética de ácido ascórbico na qualidade espermática da tainha (*Mugil*

*liza*), em seu primeiro período reprodutivo, assim como no desempenho zootécnico e nos parâmetros hematológicos.

## 2. 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Material Biológico e Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura Marinha (UFSC). O experimento teve início no mês de maio, período em que inicia a época reprodutiva da espécie (Esper et al., 2001), e foi finalizado em julho de 2017. Todos os procedimentos com os peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA PP-00861). Foram utilizados 144 espécimes de tainha, *Mugil liza*, com peso de  $299,2 \pm 10,8$  g e comprimento  $25,4 \pm 0,4$  cm em 18 tanques circulares de 500 L, com densidade de 8 peixes por tanque. Os tanques foram mantidos em sistema de fluxo contínuo de água, com taxa de renovação de 100-300% do volume e fotoperíodo natural. Parâmetros físico-químicos da água foram aferidos diariamente, a salinidade por meio de um refratômetro manual (RHS – 10ATC, Magnum Media, USA) a temperatura e o oxigênio dissolvido por um oxímetro digital ((Pro20, YSI, USA),) e pH por medidor digital (EcoSense, YSI, USA). Os valores obtidos foram: salinidade  $36 \pm 0,4$ ; oxigênio  $4,18 \pm 0,4$  mg/L; temperatura  $23,1 \pm 0,8$  °C e pH  $8,4 \pm 0,08$ . Os tanques foram limpos diariamente por sifonamento no final da tarde após a alimentação.

### 2.2.2 Dietas Experimentais e Manejo

Os tratamentos experimentais consistiam em seis dietas isoenergéticas e isotprotéicas. As dietas foram formuladas no programa (Optimal Fórmula 2000) de acordo com a exigência proteica da espécie (De Carvalho, Bianchini, Tesser, & Sampaio, 2010). A dieta foi fabricada no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas / UFSC. Foram estipulados seis níveis de suplementação de ácido ascórbico: 0; 75; 150; 300; 600 e 1200 mg Kg<sup>-1</sup> (Tabela 1).

**TABELA 2.** Formulação e composição da dieta experimental de tainha, *Mugil liza* contendo diferentes níveis de vitamina C

Ingredientes <sup>a</sup> (g 100 g <sup>-1</sup> )	Tratamentos (mg Kg <sup>-1</sup> Vitamina C)					
	0	75	150	300	600	1200
<b>Farinha de peixe</b>	34,4	34,4	34,4	34,4	34,4	34,4
<b>Farelo de soja</b>	35	35	35	35	35	35
<b>Farelo de milho</b>	27	27	27	27	27	27
<b>Óleo de peixe</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Óleo de soja</b>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>Premix<sup>b</sup></b>	1	1	1	1	1	1
<b>Colina<sup>c</sup></b>	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
<b>Ascorbil monofosfatado<sup>d</sup></b>	0,00	214,2	428,5	857,1	1.714,1	3.428,1
<b>Celulose<sup>e</sup></b>	61,7	57,8	54,0	46,2	30,8	0,00
<b>Composição Centesimal (%)</b>						
<b>Proteína Bruta</b>	46,05	46,11	46,71	46,64	47,11	46,82
<b>Umidade</b>	87,45	87,03	88,22	88,08	86,10	88,17
<b>Cinzas</b>	11,40	11,14	11,14	11,40	10,81	11,14
<b>Extrato etéreo</b>	9,59	9,70	9,34	9,16	9,65	9,90
<b>Vitamina C (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	0	53	107	216	482	708

<sup>a</sup>Valores expressos em 100% de matéria seca, Nicoluzzi Rações Ltda. Penha, SC, Brasil

<sup>b</sup>Complexo mineral e vitamínico (mg.kg<sup>-1</sup> ou UI/kg premix): Ácido fólico: 2500; Ácido pantotênico: 3750; BHT: 2500; Biotina: 125; Zinco: 20; Cobre: 2000; Cobalto:25; Ferro: 13,75; Iodo: 125; Vit K3: 500; Manganês: 3750; Niacina: 7800; Selênio: 75; Vit A: 1000.000; Vit E: 20000; Vit B1: 500; Vit B12: 3.750 mg/kg; Vit B2: 1750; Vit B6: 1,1250 ; Vit D3: 500.000, Mig-Plus Agroindustrial, Casca- RS, Brasil. <sup>c</sup> Colina 14, 4mg.Kg<sup>-1</sup>. <sup>d</sup> Valores de vitamina C,

DSM, Nutritional Products, Suíça, <sup>e</sup>Celulose em mg kg<sup>-1</sup>, Nicoluzzi Rações Ltda. Penha, SC, Brasil.

Os ingredientes foram moídos e posteriormente pesados, utilizando um misturador do tipo Y e homogeneizados durante 20 minutos, sendo posteriormente extrusados (Extrusora Inbramaq MX – 40, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A dieta foi fornecida três vezes ao dia (8:30; 12:30 e 16:30 h) até a saciedade aparente dos peixes

A composição das dietas foi realizada segundo os procedimentos padrão da AOAC (2012). A proteína bruta foi feita pelo método (Kjeldahl, método 945.01), lipídios (Soxhlet, método 920.39C), cinzas (incineração a 550 ° C, método 942.05) e umidade (secagem a 105 ° C

até peso constante, método 950.01) (Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas-UFSC). A vitamina C nas dietas foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) realizadas no Laboratório da DSM Nutritional Products (R&D, Analytical Research Center – ARC, Suíça).

### 2.2.3 Índices Zootécnicos e Coleta de Sangue

Para avaliação do desempenho zootécnico, foi realizada biometria de todos os peixes de cada tanque. Foram calculados os seguintes parâmetros: conforme, Fu et al., (1998).

Ganho de peso=Peso inicial–Peso final;

Eficiência alimentar=100 x (Peso inicial (g)–Peso final (g)) /Consumo de ração;

Taxa de crescimento específico =100 x (ln Peso inicial (g)–ln Peso final (g)) /tempo;

Com auxílio de seringas de 1 mL heparinizada o sangue foi coletado por punção caudal, a glicose foi medida com glicosímetro digital (OneTouch Ultra blood, São Paulo, SP, Brasil). A contagem de eritrócitos, consistiu na diluição de 5 µL de sangue em 1 ml de soro fisiológico e posteriormente a contagem de células na câmara de Neubauer com microscópio óptico. O restante do sangue foi centrifugado (Interprise MiniSpin Centrifuge) a 3500 rpm por 10 minutos para extração do plasma, armazenado em -20°C para a análise de proteínas totais (Ref.: 99, Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil).

### 2.2.4 Parâmetros Reprodutivos e Coleta de Sêmen

O fígado e as gônadas de três peixes por unidade experimental (n=9 por tratamento) foram amostrados para avaliar os índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS) utilizando as fórmulas:

$IGS = (W_g/W_t) \times 100$ ;

$IHS = (W_f/W_t) \times 100$ ;

Onde:  $W_g$ =peso das gônadas,  $W_f$ =peso do fígado e  $W_t$ =peso total.

O sêmen foi coletado de nove indivíduos de cada tratamento, exceto no tratamento 482 mg kg<sup>-1</sup>, no qual não estavam maduros o suficiente. Os peixes foram anestesiados com Benzocaína (50 mg L<sup>-1</sup>). Em seguida a região urogenital e a nadadeira anal foram limpas e secas com papel toalha. A coleta do sêmen foi feita com uma pressão abdominal leve com seringas de 1 mL (escala de 0,02 mL), imediatamente armazenado em um recipiente com gelo (sem contato direto com as seringas) a 4 ± 2 °C (temperatura do ar) protegido da luz.

Amostras contaminadas com fezes ou urina foram descartadas (Fauvel et al., 1999).

A motilidade espermática foi ativada na proporção de 1:10 (sêmen: meio ativador) (Sampaio et al., 2010) com água do mar com salinidade de 36, pH 8,55 e temperatura de 20,7 °C. Imediatamente após a ativação, um único observador fez a análise com microscopia óptica (Leica LCC50HD) (200x), em um campo de visão escolhido aleatoriamente e sem luz intensa. O tempo da motilidade foi medido com cronômetro, desde o momento da ativação até a imobilidade de todos os espermatozoides. A taxa de motilidade foi avaliada com valores de 0% a 100%, com critérios definidos em estudos prévios (Cuevas-Urbe et al., 2015; Figueroa et al., 2015) em triplicata.

Para a concentração espermática o material coletado foi fixado em solução de formol salina (0,1%) na proporção de 1 µL de sêmen para cada 1000 µL de solução. A contagem dos espermatozoides foi feita em câmara de Neubauer, com três repetições por amostra.

A avaliação da integridade da membrana foi feita pelo método da eosina-nigrosina (Maria, Azevedo, & Carneiro, 2011). O sêmen *in natura* foi depositado na proporção 1:3 (sêmen: corante) em uma lâmina e feito esfregaço. Com duração inferior a 60 segundos, foram fotografados três campos aleatórios da lâmina, com a câmera digital acoplada ao microscópio (Leica LCC50HD) (400x), para posteriormente realizar a leitura com contagem de 500 células por lâmina, diferenciando as pigmentadas (espermatozoides mortos) das não pigmentadas (espermatozoides vivos).

### **2.2.5 Análise estatística**

Os valores em porcentagem foram transformados para arco-seno ( $y$ )<sup>0,5</sup> antes da análise estatística. Os demais resultados foram submetidos a ANOVA de uma via ( $P < 0,05$ ). O teste Levene foi utilizado para verificar a homocedasticidade e o teste Shapiro Wilk para verificar a normalidade. Quando diferenças significativas foram identificadas na análise de variância, o teste Tukey ( $P < 0,05$ ) foi usado para separação de médias.

## **2.3 RESULTADOS**

A suplementação de ácido ascórbico não propiciou diferença significativa entres os tratamentos quanto ao peso final, ganho de peso, eficiência alimentar e taxa de crescimento específico (Tabela 2). Durante o período do experimento, não houve nenhuma mortalidade.

**TABELA 3.** Parâmetros zootécnicos de adultos de *Mugi liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias.

Vitamina C (mg Kg <sup>-1</sup> )	CF (cm)	PF (g)	GP (g)	EA (%)	TCE (%)
0	29,6±0,69	275,2±15,96	59,6±16,37	25,5±6,61	0,35±0,11
53	30,3±0,29	281,8±15,84	79,5±17,11	29,5±4,62	0,44±0,09
107	29,5±0,82	282,5±9,82	78,1±11,67	24,5±5,46	0,44±0,06
216	30,3±0,89	273,7±29,26	68,7±26,82	24,8±2,9	0,39±0,12
482	30,5±0,33	281,9±10,16	64,3±7,28	19,94±2,99	0,35±0,06
708	30,1±0,98	290,1±18,29	88,9±14,53	27,38±4,71	0,52±0,06

Nota: todos os valores são médias ± DP de três replica

CP (comprimento final); PF (peso final); GP (ganho de peso); EA (eficiência alimentar) e TCE (taxa de crescimento específico).

O mesmo foi observado nos resultados dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS), glicose e proteína total (Tabela 3). O número de eritrócitos apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ), com menor valor no tratamento isento de vitamina C ( $2,4 \pm 0,2 \times 10^6 / \mu\text{L}^{-1}$ ), o maior nível de suplementação obteve o número máximo de eritrócito ( $3,7 \pm 0,2 \times 10^6 / \mu\text{L}^{-1}$ ).

**TABELA 4.** Índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) e parâmetros hematológicos de adultos de *M. liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias.

Vitamina C (mg Kg <sup>-1</sup> )	IGS (%)	IHS (%)	Glicose (mmol L <sup>-1</sup> )	Proteína (g L <sup>-1</sup> )	Eritrócito ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )
0	1,8±0,4	2,8±0,3	5,5±2,0	51,3±5,5	2,4 ±0,2 <sup>b</sup>
53	2,2±0,7	0,9±0,1	3,2±3,3	56,3±3,8	3,0±0,5 <sup>a</sup>
107	2,1±0,5	1,8±0,3	3,8±1,3	57,1±4,0	3,3±0,1 <sup>a</sup>
216	2,1±0,4	1,7±0,1	5,2±0,8	55,7±8,3	3,3±0,1 <sup>a</sup>
482	1,2±0,4	1,6±0,1	4,9±1,7	52,4±7,1	3,3±0,1 <sup>a</sup>
708	2,1±0,3	2,0±0,1	3,3±1,1	67,0±3,6	3,7 ±0,2 <sup>a</sup>

Nota: todos os valores são médias ± DP de três replica

\*Letras sobrescritas diferentes demonstram diferença significativa no teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A inclusão do ácido ascórbico na dieta, resultou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros espermáticos (Tabela 4) tempo de motilidade, porcentagem de células móveis, densidade espermática e integridade da membrana celular.

**TABELA 5.** Parâmetros espermáticos de *Mugil liza* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 75 dias.

Vitamina C (mg kg <sup>-1</sup> )	Tempo de motilidade (s)	Taxa de motilidade (%)	Densidade espermática (x10 <sup>9</sup> mL <sup>-1</sup> )	Integridade membrana (%)
<b>0</b>	76,2±1,07 <sup>c</sup>	57±5,8 <sup>c</sup>	20,70±2,04 <sup>b</sup>	56,69 ± 3,3 <sup>b</sup>
<b>53</b>	133,3±4,25 <sup>a</sup>	75±5,0 <sup>b</sup>	41,75±2,08 <sup>a</sup>	61,81±0,8 <sup>b</sup>
<b>107</b>	135±2,77 <sup>a</sup>	92±2,9 <sup>a</sup>	40,78±3,88 <sup>a</sup>	70,12±9,1 <sup>ab</sup>
<b>216</b>	98,22±9,43 <sup>b</sup>	93±5,8 <sup>a</sup>	42,00±0,39 <sup>a</sup>	76,30±3,1 <sup>a</sup>
<b>482**</b>	-	-	-	-
<b>708</b>	70± 1,83 <sup>c</sup>	93±5,8 <sup>a</sup>	41,65±0,33 <sup>a</sup>	66,71±6,0 <sup>ab</sup>

Nota: Todos os valores são médias ± DP de três replica

\*Letras sobrescritas diferentes demonstram diferença significativa no teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

\*\* Tratamento não apresentou espermição.

Os maiores tempos de motilidade foram observados nos tratamentos 53 e 107 mg Kg<sup>-1</sup> com média de 133,3 ± 4,25 s e 135 ± 2,77 s, respectivamente, e os menores tempos foram observados no controle e no maior nível de suplementação, com duração de 76,2±1,07 e 70 ± 1,83 s, respectivamente. A taxa de motilidade obteve seu máximo no tratamento 107 mg Kg<sup>-1</sup> e se estabilizou até o nível máximo de suplementação.

O tratamento controle resultou na menor densidade espermática, de 20,7 ± 2,04 x10<sup>9</sup> mL<sup>-1</sup>, não apresentando diferenças entre os tratamentos suplementados ( $P < 0,05$ ). A integridade da membrana teve o maior valor no tratamento 216 mg Kg<sup>-1</sup>, com 76,30±3,1% das células íntegras.

## 2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a suplementação de ácido ascórbico não teve influência no desempenho zootécnico da tainha. Resultados diferentes foram encontrados em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Toyama et al., 2000); *Cirrhinus mrigala* (Zehra & Khan, 2012); bagre-amarelo *Pelteobagrus fulvidraco* (Liang et al., 2017); robalo-japonês *Lateolabrax japonicus* (Ai et al., 2004) e matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Affonso et al., 2007), pois a suplementação de ácido ascórbico influenciou significativamente no desempenho zootécnico dessas espécies, o que pode ser justificado pela fase de vida em que se encontravam. Nestes trabalhos, todos os peixes estavam em fases iniciais

do seu ciclo de vida, período em que a exigência em vitamina C é maior que na fase adulta.

Segundo Matusiewicz et al. (1995) a necessidade dietética de ácido ascórbico nos peixes decresce com a idade. No presente estudo os peixes foram alimentados durante o período reprodutivo, de maio a julho, época em que ocorre uma mobilização da energia para crescimento e amadurecimento de gônadas (Navarro et al., 2006), um fator limitante para o crescimento e que pode ter interferido no desempenho zootécnico dos peixes.

As características espermáticas são muito variadas entre as espécies de peixes, além disso podem sofrer influências de vários fatores como estação do ano, período reprodutivo, ambiente, clima e método de coleta das células. Algumas características do sêmen da *Mugil liza*, foram descritas por Magnotti et al (2018), analisando tainhas cultivadas (F1) também de primeira maturação e tainhas selvagens durante a migração reprodutiva. Foi verificado melhores resultados de integridade de membrana celular, porcentagem de células móveis e concentração espermática em tainhas cultivadas ( $96\pm 13\%$ ,  $83,6\pm 15,7\%$  e  $31,8\pm 2,9\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ ) respectivamente. No presente estudo foram encontrados valores aproximados aos obtidos por estes autores, com valores superiores na taxa de motilidade ( $93\pm 5,8\%$ ) e a concentração espermática ( $42\pm 0,39\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ ). O tempo de motilidade também já foi avaliado em outros mugilídeos como *Mugil cephalus* (Yeganeh et al., 2008) onde observaram que a salinidade influenciava positivamente no tempo motilidade, tempo médio foi de  $117,2 \pm 3.87$ , tempo inferior ao encontrado neste trabalho, em *Liza abu* (Sahioz et al, 2008) eles avaliaram o tempo da motilidade durante o período reprodutivo, encontraram um tempo de motilidade superior ao encontrado neste trabalho com tempo médio de  $330.15 \pm 37.92$  segundo.

O efeito mais notável da suplementação de vitamina C para os machos de tainha foi na qualidade do sêmen (taxa e tempo de motilidade, integridade da membrana plasmática e densidade de espermatozoides). A taxa de motilidade teve um aumento de aproximadamente 30% no maior nível de suplementação em relação ao controle, efeito que já foi previamente observado na tilápia-do-Nilo (Sarmiento et al., 2016). Por outro lado, o sêmen das tainhas no tratamento controle teve a menor taxa de motilidade. Uma dieta isenta de ácido ascórbico promove danos nas células reprodutivas (Dawson et al., 1992; Ciereszko et al., 1999), principalmente pela função de proteção do ácido ascórbico a danos oxidativos. Essa proteção ocorre de forma direta ou indireta sobre as

membranas celulares, atuando eficientemente sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Vasconcelos et al., 2007).

Outra característica importante que define a qualidade do espermatozoide é o tempo de motilidade, pois limita sua capacidade para fertilizar o ovócito (Lahnsteiner & Mansour, 2010). O efeito positivo do ácido ascórbico no tempo de motilidade da tainha foi até o nível de 107 mg Kg<sup>-1</sup>, enquanto que o maior nível (708 mg Kg<sup>-1</sup>) não diferiu do controle. Altas doses de ácido ascórbico podem causar prejuízo no tempo de motilidade do espermatozoide de peixe, o que já foi observado em várias espécies, como a carpa capim *Ctenopharyngodon idellus*, com 1000 mg Kg<sup>-1</sup> (A Ciereszko & Dabrowski, 2000; Metwally & Fouad, 2009) e a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, com 500 mg Kg<sup>-1</sup> (Canyurt & Akhan, 2008).

A queda do tempo de motilidade também está relacionada ao estresse oxidativo, que diminui o nível de ATP intracelular. Esse estresse inicia com peroxidação lipídica da membrana dos espermatozoides, ocasionando danos na estrutura e atua nas reações acrossômicas, afetando diretamente o processo de fertilização das células (Ball, 2008). Isto já foi comprovado no sêmen de ratos alimentados com dietas isentas de vitamina C, que apresentaram aumento da peroxidação lipídica, enquanto que suplementações de 250 e 500 mg Kg<sup>-1</sup> melhoraram a qualidade espermática (Sönmez et al., 2005). Dessa forma, é provável que o aumento de ácido ascórbico na dieta da tainha, diminuindo o estresse oxidativo, também tenha contribuído para os melhores resultados de outro aspecto importante do sêmen, a integridade da membrana plasmática, pois o nível de 216 mg Kg<sup>-1</sup> foi superior ao controle.

Complementando os efeitos sobre a qualidade do sêmen da tainha, todos os níveis de suplementação de vitamina C apresentaram densidade espermática superior ao controle, sem diferenças entre eles. Embora ainda não se tenha esclarecimento do efeito do ácido ascórbico na densidade espermática, vários trabalhos relataram a sua influência positiva. Em truta-arco-íris (Canyurt & Akhan, 2008; Andrzej Ciereszko & Dabrowski, 1995) a deficiência de vitamina C diminuiu significativamente a densidade espermática. O mesmo foi verificado em seres humanos e outros mamíferos (Chinoy et al., 1986; Thiele, Freisleben, Fuchs, & Ochsendorf, 1995; Yousef, 2005).

Outro aspecto que no presente trabalho também chamou a atenção foi o efeito da suplementação de ácido ascórbico no incremento de eritrócitos. Um efeito semelhante foi verificado no tambaqui, *Colossoma macropomum*, em que o maior número de eritrócitos foi encontrado no maior nível de suplementação de vitamina C (Chagas & Val, 2003). No

sangue, o ácido ascórbico está envolvido na maturação de eritrócitos, manutenção da hemoglobina e na coagulação em níveis normais (Nelson & Cox, 2000). Portanto, é provável que peixes suplementados com vitamina C estejam mais preparados para enfrentar condições estressantes, tanto no período de engorda quanto no de reprodução.

Em conclusão, a suplementação de ácido ascórbico com níveis de 107 e 216 mg kg<sup>-1</sup> na dieta de machos de tainha, *Mugil liza*, influenciou positivamente na qualidade do sêmen, resultando em aumento na taxa e no tempo de motilidade, na integridade celular e na densidade espermática. Além de não afetar o desempenho zootécnico durante o período reprodutivo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelo Projeto “Sustentabilidade e inovação de espécies marinhas nativas - Desenvolvimento de técnicas para a produção de juvenis de tainha *Mugil liza* em cativeiro” do Edital Ciências do Mar II (Proc. nº 1969/2014); ao CNPq pelo Projeto “Efeito da salinidade, da dureza e do uso de anestésicos na criação e no transporte de juvenis de tainha, *Mugil liza*, obtidos em cativeiro” da Chamada Universal 01/2016 (Proc. nº 422460/2016-8); à CAPES pela bolsa de Mestrado concedida a J. Castro; aos técnicos e alunos dos Laboratórios de Piscicultura Marinha-LAPMAR.

## 2.5 REFERÊNCIAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2012). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (19th ed.). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

Affonso, E. G., da Costa, S.E., Tavares-Dias, M., de Menezes, G. C., de Carvalho, C. S. M., Nunes, É. D. S. S., & Marcon, J. L. (2007). Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 383–388. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.004

Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., & Liufu, Z. (2004). Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of

Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 242, 489–500. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.08.016

Andrade, D. R., & Yasui, G.S (2003). Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27, 166–172.

Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107, 257-267. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.014

Canyurt, M. A., & Akhan, S. (2008). Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 171-175.

Cerqueira, V. R., de Carvalho, C. V. A., Sanches, E. G., Passini, G., Baloi, M., & Rodrigues, R. V.(2017). Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira.

Carvalho, C. V., Bianchini, A., Tesser, M. B., & Sampaio, L. A. (2010). The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research*, 45, 511-518. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02340.x

Chagas, E. C., & Val, A. L. (2003). Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 397-402.

Ciereszko, A., Dabrowski, K., lin, F., & liu, L. (1999). Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 178-183. doi.org/doi:10.1139/f98-161

Chinoy, N. J., Mehta, R. R., Seethalakshmi, L., Sharma, J. D., & Chinoy, M. R. (1986). Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *International journal of fertility*, 31, 232-239.

Cosson, M. P., Cosson, J., & Billard, R. (1991). Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence of movement parameters whatever the incubation medium. *Cell motility and the cytoskeleton*, 20, 55-68. doi:10.1002/cm.970200107

Cosson, M. P., Billard, R., Gatti, J. L., & Christen, R. (1985). Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 1, 71-75. doi:10.1016/0044-8486(85)90178-4

Cuevas-Uribe, R., Chesney, E. J., Daly, J., & Tiersch, T. R. (2015). Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture research*, 46, 1770-1784. doi:10.1111/are.12337

Darias, M. J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 315, 49-60. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.12.030

Esper, M. D. L. P., de Menezes, M. S., & Esper, W. (2001). Época reprodutiva de *Mugil platanus* (Günther, 1880), Pisces Mugilidae da Baía de Paranaguá (Paraná, Brasil). *Acta Biológica Paranaense*, 30, 5-17. doi:10.1111/j.1095-8649.1998.tb00114.x

Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J., & Suquet, M. (1999). Characteristics of sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, 54, 356-369. doi:/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00835.x

FEPESC Federação de Pescadores de Santa Catarina (2003-2012) – *Informes estatísticos referentes aos anos de 2003 a 2012*. FEPESC. Florianópolis/SC.

Figueroa, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., & Valdebenito, I. (2015). Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology*, 83, 238-245. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.015

Fu, C., Cui, Y., Hung, S. S. O., & Zhu, Z. (1998). Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of Fish Biology*, 53, 115-129. doi: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb00114.x

Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K., & Lie, Ø. (1997). Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 137-149. doi: 10.1016/S0891-5849(96)00281-X

Kime, D. E., Van look, K. J. W., Mcallister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., & Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 425-433. doi: 10.1016/S1532-0456(01)00270-8

Lahnsteiner, F., & Mansour, N. (2010). A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*, 307, 130-140. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.07.011

Lanes, C. F. C., Okamoto, M. H., Bianchini, A., Marins, L. F., & Sampaio, L. A. (2010). Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*, 41, 199-207. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02501.x

Liang, X. P., Li, Y., Hou, Y. M., Qiu, H., & Zhou, Q. C. (2017). Effect of dietary vitamin C on the growth performance, antioxidant ability and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson). *Aquaculture Research*, 48, 149-160. doi:10.1111/are.12869

Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., & Pena, F. J. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in domestic animals*, 46, 141-148. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x

Magnotti, C., Figueroa, E., Farias, J. G., Merino, O., Valdebenito, I., Oliveira, R. P. S., & Cerqueira, V. (2018). Sperm characteristics of wild and captive lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), subjected to sperm activation in different pH and salinity conditions. *Animal Reproduction Science*, 192, 164-170. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.004

Maria, A. N., Azevedo, H. C., & Carneiro, P. C. F. (2011). Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Collossoma macropomum*). Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., & Matusiewicz, K. (1995). Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model. *The Journal of nutrition*, 125, 3055-3061. doi: 10.1093/jn/125.12.3055

Metwally, M. A. A., & Fouad, I. M. (2009). Effects of L-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Global Vet Online*, 3, 132-136.

Navarro, R. D., Navarro, F. K. S. P., Seixas-filho, J., & Ribeiro-Filho, O. P. (2010). Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. *Revista Augustus*, 30, 108-118.

Nsonga, A. R., Kang'ombe, J., Mfithlodze, W., soko, C. K., & Mtethiwa, A. H. (2009). Effect of varying levels of dietary vitamin C (ascorbic acid) on growth, survival and hematology of juvenile tilapia, *Oreochromis karongae* (Trewavas 1941) reared in aquaria. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 13, 17-23. doi: 10.14210/bjast.v13n2.p17-23

O'keefe, T.(2003) Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. 2001. *Singapore: American Soybean Association - United Soybean Board*, 2001

Passini G., et al. Reprodução e larvicultura da tainha (*Mugil liza*) no Estado de Santa Catarina. In: FENACAM & LACQUA/SARA (WAS), Brasil. 2015.

Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., Andre, F., & Billard, R. (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 108, 747-753.

Rotta, M. A. (2003). Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)

Sahinöz, E., Aral, F., & Dou, Z. (2008). Determination of spermatological properties of male *Liza abu* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Sanliurfa. *Fish physiology and biochemistry*, 34(1), 71. doi: 10.1007/s10695-007-9148-3

Sarmento, N. L. A. F., Martins, E. F. F., Costa, D. C., Silva, W. S., Mattioli, C. C., Luz, M. R., & Luz, R. K. (2017). Effects of supplemental dietary vitamin C on quality of semen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeders. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 144-152. doi: 10.1111/rda.12870

Sönmez, M.; Türk, G.; Yüce, A (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63, 2063–2072. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.003

Thiele, J. J., Freisle, B. E.N, H. J., Fuchs, J., & Ochsendorf, F. R. (1995). Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, 10, 110-115. doi: 10.1093/humrep/10.1.110

Touhata, K., Toyohara, H., Mitani, T., KINOSHITA, M., Satou, M., & Sakaguchi, M. (1995). Distribution of L-gulonolactone oxidase among fishes. *Fisheries science*, 61, 729-730. doi: 10.2331/fishsci.61.729

Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 5, 1323 -1338. doi: 10.1590/S010040422007000500046

Zehra, S., & Khan, M. A. (2012). Dietary vitamin C requirement of fingerling, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), based on growth, feed conversion, protein retention, hematological indices, and liver vitamin C concentration. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43, 648-658. doi:10.1111/j.1749-7345.2012.00597.

Yeganeh, S., Amiri, B. M., & Alavi, S. M. H. (2008). Motility of *Mugil cephalus* L. spermatozoa in coelomic fluid, seminal fluid and saline media. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 517-518. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01143.x

Yousef, M. I. (2005). Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. *Toxicology*, 207, 81-89. doi:10.1016/j.tox.2004.08.017

Sönmez, M., Yüce, A., & Türk, G. (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels in male wistar rats. *Theriogenology*, 63, 2063–2072. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.10.003

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AFFONSO, E. G., da Costa Silva, E., Tavares-Dias, M., de Menezes, G. C., de Carvalho, C. S. M., Nunes, É. D. S. S., ... & Marcon, J. L. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 2, p. 383–388, 2007.

AI, Q., MAI, K., ZHANG, C., XU, W., DUAN, Q., TAN, B., & LIUFU, Z. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 242, n. 1-4, p.489-500, 2004.

ANDRADE, D. R., YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166–172, 2003.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 257–267, 2008.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora da UFSM., 3ª Ed. 350 p. 2013.

CANYURT, M. A., AKHAN, S. Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, n. 1, p. 171–175, 2008.

CASTELLO, J. P. O futuro da pesca da aquicultura marinha no Brasil: a pesca costeira. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 32–35, 2010.

CAVALLI, R. O., DOMINGUES, E. C., HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. ssupl. especial, 2011.

CERDÁ, J., CARRILLO, M., ZANUY, S., RAMOS, J., & de LA HIGUERA, M. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. **Aquaculture**, v. 128, n. 3–4, p. 345–361, 1994.

CERVIGÓN, F. **Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América**. Roma: FAO Fisheries Report. 513 p.1992

CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. Effect of ascorbic acid supplement in vitro on rainbow trout sperm viability. **Aquaculture international**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2000.

CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 5, p. 982–988, 1995.

CHINOY, N. J., MEHTA, R. R., SEETHALAKSHMI, L., SHARMA, J. D., & CHINOY, M. R. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **International journal of fertility**, v. 31, n. 3, p. 232–239, 1986.

COSSON, J., DREANNO, C., BILLARD, R., SUQUET, M., CIBERT, C. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**, p. 161–186, 1999.

DARIAS, M. J., MAZURAI, D., KOUMOUNDOUROS, G., CAHU, C. L., ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. **Aquaculture**, v. 315, n. 1, p. 49–60, 2011.

De CARVALHO, C. V., BIANCHINI, A., TESSER, M. B., SAMPAIO, L. A. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). **Aquaculture research**, v. 41, n. 4, p. 511–518, 2010.

DURAY, M., KOHNO, H., PASCUAL, F. The effect of lipid-enriched broodstock diets on spawning and on egg and larval quality of hatchery-bred rabbitfish (*Siganus guttatus*). **The Philippine Scientist**, v. 31, p. 42–57, 1994.

FRACALOSSO, D. M., ALLEN, M. E., NICHOLS, D. K., OFTEDAL, O. T. Oscars *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1745–1751, 1998.

- FUJIMOTO, R. Y., SANTOS, R. F. B., CARNEIRO, D. J. Morphological deformities in the osseous structure in spotted sorubim *Pseudoplatystoma coruscans* (agassiz & spix, 1829) with vitamin c deficiency. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 379–384, 2013.
- GAO, J., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., & MAMAUAG, R. E. P. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. **Aquaculture**, v. 422, p. 84–90, 2014.
- GISBERT, E., MOZANZADEH, M. T., KOTZAMANIS, Y., & ESTÉVEZ, A. Weaning wild flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry with diets with different levels of fish meal substitution. **Aquaculture**, v. 462, p. 92–100, 2016.
- GODINHO, H. M.; SERRALHEIRO, P. C. DA S.; SCORVO FILHO, J. D. Revisão e discussão de trabalhos sobre as espécies do gênero Mugil (Teleostei, Perciformes, Mugilidae) da costa brasileira (Lat. 3 S-33 S). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 15, n. 1, p. 67–80, 1988.
- HAMRE, K., WAAGBØ, R., BERGE, R. K., & LIE, Ø. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 1, p. 137–149, 1997.
- IZQUIERDO, M. S., FERNANDEZ-PALACIOS, H., TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 25–42, 2001.
- JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, E. Molecular characterization and transcriptional regulation of the sodium-dependent vitamin C transporter genes (slc23a1 and slc23a2) in a teleost fish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 3, p. 208–218, 2012.
- JOBLING, M. **National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp**. . [S.l.]: Springer Science & Business Media. , 2012

KAY, V. J., ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. **Human reproduction update**, v. 4, n. 6, p. 776–786, 1998.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, v. 307, n. 1, p. 130–140, 2010.

LEMONS, V. M., VARELA JR, A. S., SCHWINGEL, P. R., MUELBERT, J. H., VIEIRA, J. P. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of fish biology**, v. 85, n. 3, p. 671–687, 2014.

LIANG, X. P., LI, Y., HOU, Y. M., QIU, H., ZHOU, Q. C. Effect of dietary vitamin C on the growth performance, antioxidant ability and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 1, p. 149–160, 2017.

MACÍAS GARCÍA, B., GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L., ORTEGA FERRUSOLA, C., SALAZAR-SANDOVAL, C., MORILLO RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ MARTINEZ, H., PENA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 1, p. 141–148, 2011.

MAGGIONI, D., ROTTA, P. P., ZAWADZKI, F., MARQUES, J., PRADO, R. M., & PRADO, I. N. Influência da proteína sobre a reprodução animal: uma revisão. **Campo Digital**, v. 3, n. 1, p. 105–110, 2008.

MAGNOTTI, C. C. F. **Espermatologia e conservação do sêmen da tainha (*Mugil liza*)**. 2017. Tese (Doutorado em Aquicultura)-Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARIA, A. N., AZEVEDO, H. C., CARNEIRO, P. C. F. Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2011.

MATAVELI, M., MORAES, G. V., STREIT JR, D. P., VARGAS, L. D. M., SAGAGUTI, E., TONINATO, J. C., MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim do instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 2007.

MENEZES, N. A., NIRCHIO, M., OLIVEIRA, C., SICCHARAMIREZ, R. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. **Zootaxa**, v. 3918, n. 1, p. 1, 2015.

MENEZES, N. A. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 1983.

MENEZES, N. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v. 68, p. 59–68, 2010.

METWALLY, M. A. A.; FOUAD, I. M. Effects of L-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Global Veterinaria**, v. 3, n. 2, p. 132–136, 2009.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. Unpublished Master's Degree Dissertation, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MONTEIRO-RIBAS, W. M.; BONECKER, A. C. T. Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). **Bulletin of marine science**, v. 68, n. 3, p. 427–433, 2001.

DIANA, R., PINTO, O., MOTTA, W., SILVA, F. K. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 6, 2009.

NAVARRO, R. D., PINTO DA MATTA, S. L., TEIXEIRA LANNA, E. A., LOPES DONZELE, J., SOUZA RODRIGUES, S., FORTES DA SILVA, R., ... RIBEIRO FILHO, O. P. Níveis de energia digestível na dieta de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) no desenvolvimento

testicular em estágio pós-larval. **Zootecnia Tropical**, v. 24, n. 2, p. 153–163, 2006.

NAVARRO, R. D., NAVARRO, F. K. S. P., SEIXAS FILHO, J., RIBEIRO-FILHO, O. P. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. **Revista Augustus**, v. 30, n. 30, p. 108–118, 2010.

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

PERCHEC, G., JEULIN, C., COSSON, J., ANDRE, F., & BILLARD, R. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 2, p. 747–753, 1995.

PEZZATO, L. E. Alimentação de peixes—Relação custo benefício. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de ROUSTRAY, P., VERMA, D. K., SARKAR, S. K., SARANGI, N.** Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish physiology and biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 413–427, 2007 **Zootecnia**, v. 36, p. 109, 1999.

ROTTA, M. A. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. **Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquaculture**, v. 59, n. 3–4, p. 197–208, 1986.

SOLIS-MURGAS, L. D., FELIZARDO, V. O., FERREIRA, M. R., ANDRADE, E. S., VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.

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

SOTOLU, A. O. Effects of varying dietary protein levels on the breeding performance of *Clarias gariepinus* broodstocks and fry growth rate. **Blood**, v. 18, n. 21.2, p. 22–26, 2010.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K<sup>+</sup> concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 3, p. 1175–1181, 1995.

THIELE, J. J., FREISLEBEN, H. J., FUCHS, J., & OCHSENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 110–115, 1995.

TOUHATA, K., TOYOHARA, H., MITANI, T., KINOSHITA, M., SATOU, M., SAKAGUCHI, M. Distribution of L-gulonolactone oxidase among fishes. **Fisheries science**, v. 61, n. 4, p. 729–730, 1995.

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

VETTORAZZI, M. B. **Caracterização do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza

VIVEIROS, A. T. DE M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–150, 2009.

VON IHERING, R. Criação de peixes em viveiros no Recife. **Boletim da Secretaria de Agricultura de Pernambuco**, v. 1, p. 35–40, 1932.

WATANABE, T.; KIRON, V. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**, v. 124, n. 1–4, p. 223–251, 1994.

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

ZEHR, S.; KHAN, M. A. Dietary vitamin C requirement of fingerling,

*Cirrhinus mrigala* (Hamilton), based on growth, feed conversion, protein retention, hematological indices, and liver vitamin C concentration. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 5, p. 648–658, 2012.

ZHOU, Q. *et al.* Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 6, p. 969–975, 2012.