

# AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*), LINHAGEM CHITRALADA, SUPLEMENTADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VITAMINA C

Marcela MATAVELI<sup>1</sup>; Gentil Vanini de MORAES<sup>2</sup>; Danilo Pedro STREIT Jr<sup>1</sup>;  
Lauro Daniel VARGAS Mendez<sup>1</sup>; Eduardo Shiguero SAKAGUTI<sup>1</sup>;  
Jerri Cuque TONINATO<sup>3</sup>; Rejane Cardoso BARBOSA<sup>1</sup>; Luiz MERLINI<sup>3</sup>

## RESUMO

Neste estudo avaliou-se o efeito da suplementação de 0; 75; 150; 225; e 300 mg de vitamina C/kg de ração na qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram analisados parâmetros qualitativos (morfologia espermática, motilidade espermática progressiva e vigor espermático) e quantitativos (concentração de espermatozoides, volume de sêmen e número total de espermatozoides) do sêmen. O volume de sêmen, o vigor espermático, a motilidade espermática progressiva, a concentração de espermatozoides, o número total de espermatozoides no sêmen colhido e porcentagem de espermatozoides normais não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pela adição de vitamina C. Notou-se que houve aumento percentual de patologias primárias e redução percentual de patologias secundárias à medida que se elevava o nível de vitamina C na ração. No entanto, em termos de patologias totais, o melhor resultado foi observado com a suplementação de 300 mg de vitamina C/kg de ração.

**Palavras-chave:** alimentação; espermatozóide; tilápia-do-Nilo; *Oreochromis niloticus*; reprodução; sêmen; vitamina C

## EVALUATION OF SEMEN QUALITY FROM NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT VITAMIN C CONCENTRATIONS

### ABSTRACT

Through this study, the effect of the diet supplementation with 0; 75; 150; 225; 300 mg of vitamin C/kg of ration on semen quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was evaluated. Qualitative (spermatic morphology, progressive spermatic motility and spermatic vigor) and quantitative parameters (spermatic concentration, semen volume and total number of spermatozoa) were analyzed. No differences ( $P > 0.05$ ) on semen volume, spermatic vigor, progressive spermatic motility, spermatic concentration, total number of spermatozoa in the semen released and normal spermatozoa were registered. With the vitamin C increment in the ration, there was observed an increase on the perceptual of primary pathologies and a reduction on the perceptual of secondary pathologies. However, a reduction of the percentage of total pathologies was observed when 300 mg of vitamin C/kg of ration were added.

**Key words:** feeding; Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*; reproduction; semen; spermatozoa; vitamin C

---

**Artigo Científico:** Recebido em 14/09/2005 - Aprovado em 06/09/2006

<sup>1</sup> Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Professor Associado do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá  
Endereço/Address: Avenida Colombo, 5790 - CEP: 87020-900 - Maringá, Paraná, Brasil  
e-mail: gvmoraes@uem.br

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Paranaense - Umuarama, Paraná, Brasil

## INTRODUÇÃO

A vitamina C assume importância considerável em razão da ação que exerce em vários processos metabólicos. Esta vitamina é considerada essencial para a maioria das espécies de peixes, uma vez que estes não a sintetizam, devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, a qual atua em sua formação a partir da glicose (LOVELL, 1973). Portanto, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) não tem capacidade de biossintetizar a vitamina C, esta deve ser acrescentada em sua dieta (LIM, 1997).

As exigências nutricionais dos peixes por vitamina C são influenciadas por vários fatores, dentre outros, idade, tamanho, estado reprodutivo e estresse (TOYAMA *et al.*, 2000). O requerimento de vitamina C, necessário para o crescimento normal da tilápia-do-Nilo, é de 50 mg de ácido ascórbico/kg de dieta (LIM, 1997).

A vitamina C é essencial para a produção e manutenção do sêmen normal. Ainda, segundo LERNER (1998), a vitamina C tem a propriedade de reduzir a aglutinação dos espermatozoides. Recentemente descobriu-se, de maneira casual, que a vitamina C protege o espermatozoide de danos genéticos e tende a evitar os defeitos congênitos (SITIOS, 2001). A vitamina C é necessária para o desenvolvimento de gametas de alta qualidade e resistentes ao estresse (DABROWSKI e MOREAU, 1996). Quando os peixes são expostos a situações estressantes, os requerimentos de vitamina C podem dobrar ou triplicar (HALVER, 1972).

Nos peixes, o estresse causa predisposição para a ocorrência da maioria das doenças, as quais, por sua vez, afetarão o crescimento, a produtividade e a sobrevivência dos mesmos (MARDINI e FERREIRA, 2000). SITIOS (2001) observou, através de experimentos científicos realizados com seres humanos na Califórnia - Estados Unidos, que a diminuição da quantidade diária de vitamina C gerava sêmen de baixa qualidade e que pessoas que ingeriram 60 mg/dia de vitamina C apresentaram melhor qualidade do sêmen, em relação àquelas que ingeriram menores quantidades.

De acordo com HARRIS *et al.* (1979), os efeitos descritos da utilização de vitamina C como suplemento alimentar em uma dieta normal não podem ser atribuídos apenas à vitamina, mas também aos cátions encontrados no sêmen, com os quais ela interage.

Diante do exposto, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de avaliar a influência de

diferentes concentrações de vitamina C, fornecida através da dieta, sobre as características do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada, analisando-se os resultados comparativamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizada no Município de Umuarama, Paraná, no período de agosto a dezembro de 2003, totalizando 150 dias.

Utilizaram-se 150 exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, com peso aproximado de 300 g e comprimento padrão médio de 23 centímetros. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos: 30 animais por tratamento, divididos em cinco repetições com seis indivíduos cada uma. Os conjuntos de seis animais foram alocados em 25 caixas d'água de fibra de plástico, com capacidade de 1.000 litros cada uma e taxa de renovação diária de água de 20%.

Foram avaliados um controle e quatro diferentes suplementações da dieta com ácido ascórbico (vitamina C) monofosfatado (Rovimix Stay C<sup>®</sup> a 35%): grupo 1 (controle) - sem vitamina C; grupo 2 - com 75 mg de vitamina C; grupo 3 - com 150 mg de vitamina C; grupo 4 - com 225 mg de vitamina C; e grupo 5 - com 300 mg de vitamina C por kg de ração. Cada dose de vitamina C suplementar foi incorporada ao suplemento mineral e vitamínico de cada grupo em questão. A seguir, utilizando-se um misturador do tipo Y, esse composto foi misturado durante cerca de 15 minutos aos outros ingredientes da ração, sendo a mistura, finalmente, submetida a peletização.

Os animais foram alimentados com ração peletizada contendo 28% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia digestível/kg de ração (Tabela 1). A dieta foi oferecida três vezes ao dia, em quantidade correspondente a 1% da biomassa total de peixes, calculada para cada caixa d'água.

Para a colheita do sêmen, o animal foi retirado da caixa d'água e envolvido por uma toalha úmida. Logo a seguir, a região genital e a nadadeira anal foram enxutas com papel toalha para a execução do processo de retirada do sêmen, realizado comprimindo-se a região abdominal do animal no sentido ântero-posterior, sendo o sêmen recolhido em seringas de 1 mL (BILLARD *et al.*, 1995).

**Tabela 1.** Composição porcentual dos ingredientes utilizados na ração de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*

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

<sup>1</sup> Valores expressos em 100% de matéria seca

Do sêmen colhido de cada reprodutor foram avaliados o volume, a concentração de espermatozoides, a motilidade progressiva do espermatozoide, o vigor espermático, o pH, a cor, a morfologia espermática e o total de espermatozoides produzidos.

Para a avaliação do sêmen adotaram-se os procedimentos de SORENSEN (1979), adaptados para peixes, descritos como segue:

**Volume de sêmen** - Realizou-se massagem na região abdominal, no sentido encéfalo-caudal, até esgotar a liberação do sêmen, colhido em seringas de insulina, nas quais se fez a leitura do volume.

**Concentração de espermatozoides** - O sêmen foi diluído em béquer, utilizando-se pipeta de Shalli (0,02 mL), em 10 mL de formol-salina tamponada, resultando em diluição de 1:500. Após a diluição, uma câmara de Neubauer foi preenchida por capilaridade, e, em seguida, contaram-se os espermatozoides de cinco quadrados maiores do campo de 1 milímetro quadrado.

**Motilidade espermática progressiva e vigor espermático** - Em lâmina de microscopia ótica de 26x76 mm, uma gota de sêmen de 0,03 mL foi diluída em oito gotas de 0,03 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio a 1%; a seguir, a lâmina foi levada ao microscópio de contraste de fase com objetiva de 40X, avaliando-se ambas as variáveis por método subjetivo. Para a variável motilidade espermática progressiva foi utilizado um escore de 0 a 100%, e para o vigor espermático, um escore de 0 a 5 pontos.

**pH do sêmen** - Uma gota de sêmen foi colocada sobre fita de papel de tornassol, sendo a leitura efetuada em escala própria.

**Cor do sêmen** - Para esta variável foi utilizado um escore de 1 a 3: o número 1 representou a coloração branco-leitosa, o número 2, a coloração branco-aquosa, e o número 3, a coloração amarelo-cítrica.

**Número total de espermatozoides no sêmen colhido** - Foi calculado com os valores obtidos do volume individual e da concentração de espermatozoides.

**Morfologia espermática** - Para esta análise foram feitos dois esfregaços com sêmen diluído em formol-salina tamponada (HANKOCK, 1957), na proporção de 1:500 (sêmen : solução diluente). Os esfregaços foram corados pelo método de Rosa Bengala (CONN, 1918), corante recomendado para peixes por STREIT Jr. *et al.* (2004), e, depois de secos, levados ao microscópio de contraste de fase com objetiva de 40X. Foram consideradas patologias primárias: cauda quebrada, enrolada e degenerada, macrocefalia e microcefalia, e patologias secundárias: cauda dobrada, cabeça solta, gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal. As patologias gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal foram consideradas patologias secundárias quando suas ocorrências não ultrapassaram 3 e 5%, respectivamente, do total das células examinadas. Assim, realizou-se o exame de 400 espermatozoides entre as lâminas feitas de cada amostra de sêmen.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado. As variáveis respostas foram: motilidade espermática progressiva, vigor espermático, pH do sêmen, concentração de espermatozóides, número total de espermatozóides, cor do sêmen, porcentagem de espermatozóides normais, de patologias primárias e de secundárias, sendo utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$y = X\beta + \varepsilon$$

em que

$y$  é o vetor das observações dos animais;

$X$  corresponde à matriz de incidência do efeito fixo;

$\beta$  simboliza o vetor dos efeitos fixos do tratamento;

$\varepsilon$  é o vetor dos erros aleatórios.

Para a realização das análises estatísticas utilizaram-se os Modelos Lineares Generalizados (DOBSON, 2002), através do procedimento GENMOD do SAS (1992), considerando que os erros possuíam diferentes distribuições de probabilidade, com função de ligação canônica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados do ajuste do modelo linear generalizado ( $\eta_i = b_0$ ) referente ao volume de sêmen colhido, vigor espermático, motilidade espermática progressiva, concentração de espermatozóides, número de espermatozóides no volume de sêmen colhido e porcentagem de espermatozóides normais estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Média observada, distribuição de probabilidade e valores entre os limites de confiança dos parâmetros: volume de sêmen, concentração espermática, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, pH do sêmen, cor do sêmen, número de espermatozóides no volume de sêmen colhido e porcentagem de espermatozóides normais, em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*

Parâmetro	Média observada	Média estimada	Distribuição de probabilidade	Valores entre os limites de confiança
Volume de sêmen (mL)	0,40	0,35	Binomial Negativa	- 0,0017 - 0,0038
Concentração espermática (esp./mL) *	2,63	2,46	Binomial Negativa	- 0,0017 - 0,0027
Motilidade espermática progressiva (%)	81,08	77,90	Binomial Negativa	- 0,0005 - 0,0012
Vigor espermático (pontos)	3,21	2,21	Normal	- 0,0018 - 0,0037
pH do sêmen	8,04	6,56	Binomial	- 0,0234 - 0,0047
Cor do sêmen	1,30	0,34	Binomial	- 0,0086 - 0,0054
Número de espermatozóides no sêmen colhido *	7,90	7,37	Binomial Negativa	- 0,0022 - 0,0033
Espermatozóides normais (%)	16,28	15,08	Poisson	- 0,0004 - 0,0001

\*  $\times 10^6$ ; esp. = espermatozóide

Os diferentes níveis de suplementação com vitamina C não influenciaram ( $P > 0,05$ ) o volume de sêmen produzido pelos reprodutores de *O. niloticus*. No entanto, YOUSEF (2005) verificou que a suplementação de vitamina C provocou aumento do volume de sêmen de coelhos, quando

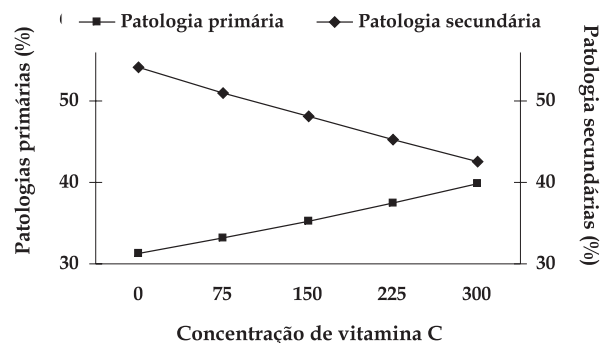
estes animais receberam dose diária de 40 mg de vitamina C/kg de peso vivo. Para BILLARD *et al.* (1995), o aumento do volume de sêmen pode assegurar maior possibilidade de fertilização dos ovócitos, embora isto também esteja relacionado com o número de células.

A motilidade espermática progressiva e o vigor espermático também não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pela adição de vitamina C na dieta de *O. niloticus* (Tabela 2). CIERESZKO e DABROWSKI (2000) observaram, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que a suplementação de 50 mg de vitamina C/L de água, durante 14 dias de estocagem, não melhorou a motilidade espermática progressiva, e que o curto período (14 dias) de suplementação de 50mg de vitamina C pode não ter favorecido a espermatogênese. No presente estudo, o período foi de 150 dias de suplementação de vitamina C, tempo suficiente para se completar a espermatogênese de *O. niloticus*. SONMEZ *et al.* (2005) notaram que, em ratos, a administração oral diária de 500 e 250 mg de vitamina C/kg de peso vivo também não influenciou a motilidade espermática progressiva. Entretanto, DAWSON *et al.* (1992) verificaram, em humanos, melhoria da motilidade espermática progressiva com a suplementação de vitamina C. SALEM *et al.* (2001) observaram os efeitos positivos do ácido ascórbico nas características do sêmen de coelho. De acordo com GUERRA *et al.* (2004), o estresse oxidativo causa diminuição da motilidade espermática progressiva, sendo que a habilidade em contrapor este estresse oxidativo depende da quantidade de antioxidantes celulares, fator que pode melhorar a motilidade espermática progressiva. Assim, a vitamina C apresenta tais propriedades (SONMEZ *et al.*, 2005).

As variáveis concentração espermática e número total de espermatozoides no sêmen colhido de *O. niloticus* também não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pelos diferentes níveis de suplementação de vitamina C (Tabela 2). Para DABROWSKI e CIERESZKO (2001), a ausência de vitamina C na dieta de salmões provocou sensível redução da concentração de espermatozoides. Em ratos, SONMEZ *et al.* (2005) verificaram aumento da concentração espermática ao administrarem, por via oral e por dia, 250 e 500 mg de vitamina C/kg de peso vivo, sugerindo que tal aumento possa ser devido à ativação do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) pelo ácido ascórbico, visto que estes hormônios estimulam a espermatogênese, aumentando a concentração espermática. O aumento da concentração espermática com a suplementação de vitamina C também foi notado em coelhos por YOUSEF (2005), ao administrar doses diárias de 40 mg de vitamina C/kg de peso vivo.

Com relação à cor do sêmen de *O. niloticus*, não se verificou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os reprodutores alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de vitamina C (Tabela 2). No entanto, a coloração branco-leitosa predominou no sêmen dos reprodutores. De modo geral, associa-se a cor branco-leitosa ao sêmen que apresenta maior concentração de espermatozoides, porém, em *O. niloticus* este argumento não ficou claro. A cor do sêmen pode estar associada ao pH, porém, nos cinco tratamentos, o valor predominante do pH foi 8.

Quanto à morfologia dos espermatozoides, a adição de vitamina C não influenciou ( $P > 0,05$ ) no percentual de espermatozoides normais (Tabela 2), fato este que não corrobora as observações de DAWSON *et al.* (1992), os quais verificaram a redução de patologias espermáticas em homens suplementados com vitamina C. Por outro lado, o comportamento das patologias primárias e secundárias foi distinto, em função do aumento da concentração de vitamina C. À medida que se elevavam os níveis de suplementação de vitamina C, a frequência de patologias primárias aumentava ( $P < 0,05$ ), contrapondo-se à redução ( $P < 0,05$ ) das patologias secundárias (Figura 1).



**Figura 1.** Percentual de patologias primárias e secundárias em função de diferentes níveis de suplementação de vitamina C na ração (mg/kg). Equação de regressão obtida para as retas: Patologias primárias,  $y = e^{3,4944 + 0,0008(X)}$ ; Patologias secundárias,  $y = e^{3,9921 - 0,0008(X)}$

A redução do percentual de patologias secundárias pode estar relacionada à melhoria do plasma seminal, em razão da suplementação gradual de vitamina C, visto que, para SITIÓS (2001), a concentração de vitamina C no sêmen é oito vezes maior que no sangue. Entretanto, a suplementação de vitamina C até 300 mg/kg de ração pode ter deixado os espermatozoides mais sensíveis em sua formação, durante a espermatogênese, ocasionando o aparecimento de patologias primárias.

Este fato sugere que teores superiores a 300 mg de vitamina C/kg de ração sejam o ideal. No entanto, neste estudo observa-se elevação ( $P < 0,05$ ) do índice de patologias primárias à medida que o teor de vitamina C na dieta aumenta, atingindo o valor de 44,10%, com a adição de 300 mg de vitamina C/kg de ração, mas as patologias secundárias foram reduzidas com a crescente adição de vitamina C na dieta, atingindo o índice de 34,31% com 300 mg de vitamina C/kg de ração. Os resultados obtidos neste tratamento indicam o menor índice de patologias totais (78,41%) em relação aos demais tratamentos. DAWSON *et al.* (1992) verificaram redução de patologias espermáticas em homens suplementados com vitamina C. THIELE *et al.* (1995) destacaram que níveis elevados de vitamina C no plasma seminal de mamíferos contribuíram para melhorar a morfologia espermática, e SONMEZ *et al.* (2005) notaram que a vitamina C no plasma seminal e nos testículos reduziu significativamente a peroxidação lipídica, indicando que esta vitamina pode proteger os espermatozoides de danos morfológicos. Porém, nesses trabalhos, a origem das patologias registradas não foi indicada, sendo classificadas apenas como patologias. GUERRA *et al.* (2004) relatam que as patologias espermáticas mais relacionadas com o estresse oxidativo são: excesso de citoplasma residual na peça intermediária do espermatozoide, espermatozoides com cabeças anormais, defeitos no acrossoma, defeitos na peça intermediária, defeitos na cauda e defeitos no DNA.

## CONCLUSÃO

A suplementação da dieta de reprodutores de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com níveis crescentes de vitamina C não influenciou a maioria dos parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen avaliados neste estudo, com exceção da ocorrência de patologias espermáticas totais (primárias e secundárias em conjunto), cujo valor foi menor no tratamento com 300 mg de vitamina C/kg de ração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. 1995 Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. (Ed.). *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science. p.25-52.
- CIERESZKO, A. e DABROWSKI, K. 2000 Effect of ascorbic acid supplement *in vitro* on rainbow trout sperm viability. *Aquaculture International*, Netherlands, 8: 1-8.
- CONN, H.J. 1918 The microscopic study of bacteria and fungi in soil. *Bulletin New York State Agricultural Experiment Station*, Nova York, 64(1): 3-20.
- DABROWSKI, K. e MOREAU, R. 1996 Do all fish need ascorbic acid? *Aquaculture Magazine*, Columbus: 96-97.
- DABROWSKI, K. e CIERESZKO, A. 2001 Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research*, 12: 623-638.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C.; PWELL, L.C. 1992 Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. *Fertility and sterility*, Ireland, 58(5): 1034-1039.
- DOBSON, A.J. 2002 *An introduction to generalized linear models*. Boca Raton: CRC Press. 225p.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 2004 Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 28(4): 187-195.
- HALVER, J.E. 1972 *Fish nutrition*. Orlando: Academic Press. 713p.
- HANCOOK, J.L. 1957 The morphology of boar spermatozoa. *Journal Royal Microscopical Society*, Londres, 76(1): 84-87.
- HARRIS, W.A.; ENDUREÇA, T.E.; DAWSON, E.B. 1979 O efeito aparente de medicação de ácido ascórbico em níveis de metal no sêmen. Disponível em: <http://www.healthgate.com/cgi-bin/q> Acesso em: 24/mar./2003.
- LERNER, J. 1998 *Mejorando la calidad del semen*. Disponível em: <http://www.unifertes.com/titulares23.php3> Acesso em: 18/mar./2003.
- LIM, C. 1997 Nutrition and feeding of Tilapias. In: SIMPOSIO CENTROAMERICANO DE ACUACULTURA, 4., Alabama, 1997. *Anais...* p.94-107.
- LOVELL, R.T. 1973 Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. *Journal of Nutrition*, 103: 134-138.
- MARDINI, C.V. e FERREIRA, L.B.L. 2000 *Cultivo de peixes e seus segredos*. Canoas: Ed. Ulbra. 204p.
- SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEI, M.I.; HASSAN, G.A.; EL-NOUTY, F.D. 2001 Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. *Toxicology*, Ireland, 162: 209-218.
- SAS INSTITUTE 1992 *SAS technical report: Release 6.07*. Cary: SAS Institute Inc. 229p.

- SITIOS. 2001 *Protección a la semilla*. Disponível em: <http://www.lacuarta.cl/sitios/vas/2001/01/14/sexil.html> Acesso em: 18/mar./2003.
- SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. 2005 The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male wistar rats. *Theriogenology*, Amsterdam, 63: 2063-2072.
- SORENSEN Jr., A.M. 1979 *A laboratory for animal reproduction*. 4.ed. Boston: American Press. 153p.
- STREIT Jr., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. 2004 Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, 7(2): 157-162.
- THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. 1995 Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, Oxford, 10: 110-155.
- TOYAMA, G.N.; CORRENTE, J.E.; CYRINO, J.E.P. 2000 Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 57(2): 221-228.
- YOUSEF, M.I. 2005 Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. *Toxicology*, Minnesota, 207: 81-89.

