

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

MICÁILA BOLZON GONZALEZ

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Rhamdia quelen* PROVENIENTE DE
FÊMEAS ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO
FÓLICO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

MICÁILA BOLZON GONZALEZ

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Rhamdia quelen* PROVENIENTE DE
FÊMEAS ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO
FÓLICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre” em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Bolzon Gonzalez, Micáila

Desenvolvimento embrionário de Rhamdia quelen proveniente de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico / Micáila Bolzon Gonzalez; orientador Robie Allan Bombardelli. -- Marechal Cândido Rondon, 2023.

65 p.

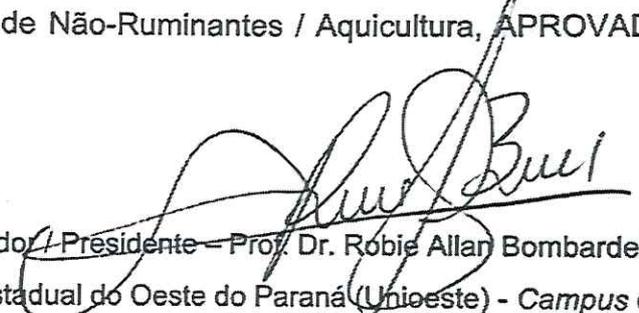
Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.

1. Bagre. 2. 5-metiltetrahydrofolato. 3. ontogenia. 4. vitamina. I. Bombardelli, Robie Allan, orient. II. Título.

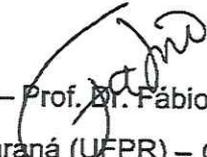
MICÁILA BOLZON GONZALEZ

Desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* proveniente de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de "Mestra em Zootecnia", Área de Concentração "Produção e Nutrição Animal", Linha de Pesquisa "Produção e Nutrição de Não-Ruminantes / Aquicultura, APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:


Orientador / Presidente – Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Toledo


Membro – Prof.ª Dr.ª Maria Cecilia de Lima Rorig
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) – Campus de Toledo


Membro – Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Campus de Jandaia do Sul

Marechal Cândido Rondon, 10 de outubro de 2023.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata Micáila Bolzon Gonzalez, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que a candidata foi considerada **APROVADA** na banca realizada em 10/10/2023, com o trabalho intitulado "**Desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* proveniente de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Nada consta.

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli - ORIENTADOR/PRESIDENTE

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / Campus de Mal. Cândido Rondon
Docente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Modelo 2 - Para orientador(a) da Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.^a Dr.^a Maria Cecília de Lima Rorig**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Micáila Bolzon Gonzalez**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada **APROVADA** na banca realizada em 10/10/2023, com o trabalho intitulado "**Desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* proveniente de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Prof.^a Dr.^a Maria Cecília de Lima Rorig
PUC-PR – Campus de Toledo



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Fábio Meurer**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Micáila Bolzon Gonzalez**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 10/10/2023, com o trabalho intitulado "**Desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* proveniente de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Sem observações.



Prof. Dr. Fábio Meurer

UFPR – Campus de Jandaia do Sul

*Dedico este trabalho à minha mãe, meu irmão
e todos aqueles que fizeram parte desta conquista.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que tudo isso acontecesse, por me dar força e sabedoria para superar todas as adversidades que ocorreram nestes anos e, ainda assim, amadurecer e não desistir.

À minha mãe, Gecilda Inês Bolzon, por todo suporte dado durante minha vida, por me incentivar a continuar e entender todas as ausências devidas ao estudo, por ser meu exemplo de força e garra, por todo esforço feito para que eu alcançasse meus sonhos, e por me amar incondicionalmente. Ao meu irmão, Hugo Carlos Bolzon, por ser parceiro, refúgio, porto seguro, orientador e corretor de tantas versões deste trabalho. Por dividir tempo da sua vida para me ensinar, me auxiliar no experimento, análises e escrita. Por lidar com todas as crises que tive, e por me lembrar que a Disney pode ser minha fuga, mas não minha morada, “a vida não é um morango”. Obrigada por se fazerem presente mesmo que distante. Amo vocês.

Ao meu namorado, Leonardo Arthur, por entender as patadas gratuitas devido ao estresse e cansaço, por fazer o possível para aprender sobre os temas dessa dissertação mesmo não sendo da área, por continuar ao meu lado enquanto escrevia estas linhas e por ter me ajudado de todas as formas. Amo você, obrigada por tanto.

Às minhas amigas, Amanda, Anna, Bruna, Jhessica, Sharine, Tais, Thaise, Thayna, e colegas de pós-graduação. Vocês foram essenciais para que os dias fossem mais leves e felizes.

Aos meus colegas, Janderson Garcez e Leonardo Baumgartner, por dividirem o experimento, a companhia, os ensinamentos, as aventuras e risadas. Tivemos ótimos dias juntos, sou muito grata a vocês. Ao meu orientador, professor Robie Allan Bombardelli, por acreditar em mim, me apoiar e me incentivar a encarar esse desafio. Pelos ensinamentos passados, por entender todas as minhas dúvidas, medos e inseguranças, aceitar minhas decisões e me guiar nessa conquista da melhor forma possível.

A todos os colegas do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) e LATRAAC (Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis), pela estrutura concedida para realização deste trabalho, pelo auxílio no experimento e análises laboratoriais. À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por ceder o laboratório e a estrutura para a realização deste trabalho.

À SALUS® - Nutrição Animal pela doação do ácido fólico e a FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo apoio financeiro por meio do edital 12/2022-POSGFE. Agradeço, também, à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado fornecida.

*“Basta escutar seu coração e ele dirá o que já não serve mais e
o que deixava sua alma leve e feliz.
Autor desconhecido.*

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Rhamdia quelen* PROVENIENTE DE FÊMEAS ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO FÓLICO

RESUMO – A suplementação nutricional das matrizes pode ser uma estratégia para resolver a falta de alevinos de qualidade no mercado, visto que a deposição de um vitelo mais rico nutricionalmente poderá atender melhor às necessidades dos embriões e larvas. Estudos comprovam que o ácido fólico atua na formação do DNA, na eritropoiese, na síntese proteica e no desenvolvimento embrionário de diferentes espécies. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do ácido fólico no desenvolvimento de embriões provenientes de fêmeas de *Rhamdia quelen* alimentadas com ácido fólico. Um total de 540 alevinos de jundiá ($3,71 \pm 0,01$ g) foram alojados em 18 gaiolas com dimensões de 4x2x1m e com malha de 15mm, instaladas em dois viveiros escavados revestidos em alvenaria (200m²) e com fundo de terra. Os peixes foram alimentados com dietas contendo seis níveis de inclusão de ácido fólico: 0,00; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00 e 3,75 mg de ácido fólico. O experimento teve duração de 300 dias. No início da primavera, os peixes foram classificados pelo gênero. As 270 fêmeas ($155,70 \pm 1,97$ g) foram alojadas entre as gaiolas, onde passaram a ser alimentadas 2x ao dia com os respectivos tratamentos. Ao alcançarem a maturidade sexual, 5 fêmeas de cada gaiola foram submetidas ao protocolo de reprodução artificial com CPE para coleta e fertilização dos ovócitos. Um pool de 5ml dos ovócitos de cada fêmea por tratamento foi fertilizado com uma dose inseminante de 100.000 espermatozoides móveis por ovócito. Os ovos foram ativados em recipientes de 2000ml com adição de 200ml de água. As amostras dos ovos foram coletadas com uma pipeta de 10ml e passados para frascos de 10ml com formalina 4% tamponada com carbonato de cálcio. Durante 36 horas pós fertilização (HPF) as amostras foram coletadas em horários específicos. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) *main effects* e ao teste de médias de Duncan para comparações múltiplas. Os descendentes provenientes de fêmeas que receberam 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹ foram os que tiveram uma aceleração ($p < 0,05$) nos estágios de neurula e faringula e a maior porcentagem de normalidade. As anormalidades encontradas podem colaborar com a realização de estudos futuros sobre desenvolvimento embrionário de peixes. O ácido fólico melhorou o desenvolvimento dos embriões, portanto, recomenda-se a suplementação desta dose para matrizes de *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: bagre, 5-metiltetraidrofolato, folato, ontogenia, vitamina

EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *Rhamdia quelen* FROM FEMALES FED DIETS SUPPLEMENTED WITH FOLIC ACID

ABSTRACT – Nutritional supplementation of broodstock can be a strategy to improve the quality of fry in the market, as the deposition of a more nutritionally rich yolk could better meet the needs of embryos and larvae. Studies have proven that folic acid plays a role in DNA formation, erythropoiesis, protein synthesis, and embryonic development in different species. This work aims to evaluate the effect of folic acid on the development of embryos from female *Rhamdia quelen* fed with folic acid. A total of 540 *R. quelen* fry (3.71 ± 0.01 g) were housed in 18 cages with dimensions of 4x2x1m and with a mesh size of 15mm, installed in two dug ponds lined with masonry (200m²) and with an earthen bottom. The fish were fed diets containing six levels of folic acid inclusion: 0.00; 0.75; 1.50; 2.25; 3.00 and 3.75 mg of folic acid. The experiment lasted for 300 days. At the beginning of spring, the fish were classified by gender. The 270 females (155.70 ± 1.97 g) were housed among the cages, where they began to be fed twice a day with their respective treatments. Upon reaching sexual maturity, five females from each cage underwent artificial reproduction protocol with CPE for oocyte collection and fertilization. A pool of 5ml of oocytes from each female per treatment was fertilized with an inseminating dose of 100,000 motile sperm per oocyte. The eggs were activated in 2000ml containers with the addition of 200ml of water. Egg samples were collected with a 10ml pipette and transferred to 10ml bottles with formalin buffered with calcium carbonate at 4%. During the 36 hours post-fertilization (HPF), samples were collected at specific times. The data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) main effects and Duncan's multiple comparison test for mean comparisons. The offspring from females who received 3.00 mg of folic acid kg⁻¹ were those that had an acceleration ($p < 0.05$) in neurula and pharyngula stages and the highest percentage of normality. The abnormalities found may contribute to future studies in fish ontogenetic development. Folic acid improved embryo development, therefore, supplementation at this dose is recommended for *Rhamdia quelen* broodstock.

Keywords: catfish, 5-methyltetrahydrofolate, folate, ontogeny, vitamin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Atual cenário da aquicultura	11
2.2	Espécie em estudo: Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	12
2.3	Nutrição de peixes reprodutores.....	13
2.4	Desenvolvimento embrionário e sua relação com a vitelogênese.....	16
2.5	Ácido fólico.....	19
2.6	Ácido fólico na embriologia de peixes	27
2.7	Referências.....	28
3	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Rhamdia quelen</i> PROVENIENTE DE FÊMEAS ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO FÓLICO	38
3.1	Introdução	40
3.2	Material e métodos	42
3.2.1	Local e período de experimentação	42
3.2.2	Rações e manejo alimentar.....	42
3.2.3	Delineamento experimental.....	45
3.2.4	Qualidade da água.....	45
3.2.5	Manejo reprodutivo.....	45
3.2.6	Incubação dos ovos e amostragem.....	47
3.2.7	Desenvolvimento embrionário e larval	47
3.2.8	Anormalidades embrionárias e larvais	48
3.2.9	Análises estatísticas.....	48
3.3	Resultados	49
3.4	Discussão	58
3.5	Conclusão.....	60
3.6	Agradecimentos.....	61
3.7	Referências.....	61

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, as métricas demonstram que a aquicultura avança em níveis recordes, inclusive, superando o crescimento das demais criações (FAO, 2022). Isso se justifica, principalmente, pelo aumento populacional e a busca por alimentos de maior qualidade e quantidade (Naylor et al., 2021). Desse modo, o setor produtivo tende a se intensificar cada vez mais para atender as demandas do mercado (Barroso et al., 2018; FAO, 2022). Entretanto, a produção intensiva exige tecnologia avançada que ainda está sendo desenvolvida para a aquicultura, como técnicas de programação nutricional, atenção ao plantel de reprodutores e produção de alevinos de alta qualidade (Bombardelli et al., 2021).

A intensificação trouxe como consequência a necessidade de proles de alta qualidade e em quantidade (Barroso et al., 2018). As altas densidades, baixa qualidade de água e desconhecimento das reais exigências nutricionais por parte dos reprodutores, são grandes desafios aos quais os animais são submetidos na produção intensiva (Bombardelli et al., 2021; Nascimento et al., 2023). Portanto, é necessário que os animais tenham capacidade de superar estes entraves e ainda mantenham sua performance (Naylor et al., 2021). Neste cenário, estudos comprovam que o fornecimento de uma nutrição adequada colabora com a saúde, crescimento, desempenho e reprodução dos animais, portanto, a programação nutricional para peixes é uma ferramenta atrativa para geração de uma prole vigorosa (Bombardelli et al., 2023).

Entre as áreas zootécnicas de interesse para a aquicultura, a nutrição de reprodutores é a que mais carece de estudos (Schulter; Vieira Filho, 2017). Contudo, a comunidade científica passou a entender que reprodutores são animais de alta performance que podem apresentar exigências mais elevadas (Wu, 2022). Dessa forma, o número de estudos buscando aprimorar a nutrição desses animais tem aumentado (Lima et al., 2020; Bombardelli et al., 2023).

Uma das estratégias destaque é o uso de suplementação alimentar, seja ela proteica, mineral, lipídica ou vitamínica (Tessaro et al., 2014; Goes et al., 2017). A suplementação vitamínica tende a melhorar a nutrição e saúde dos reprodutores (El-Fotoh et al., 2020). Assim, acredita-se que uma matriz bem nutrida irá depositar mais nutrientes durante a vitelogênese (Jobling, 2016; Bombardelli et al., 2023), produzindo um vitelo mais nutritivo para o embrião e larva (Singh et al., 2021, Nascimento et al., 2023).

As vitaminas desempenham um papel essencial no correto funcionamento metabólico, atuando em diferentes processos cruciais para o organismo (Romagosa et al., 2013). Elas são nutricionalmente exigidas em quantidades superiores às produzidas naturalmente, por isso, é

necessário que se faça a suplementação via fontes externas, como a alimentação (Lehninger et al., 2014).

O ácido fólico (vitamina B₉, folato ou AF) destaca-se entre as vitaminas hidrossolúveis por sua participação na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Esse também colabora na eritropoiese (Vannuchi; Monteiro, 2010), fortalecimento da imunidade (Falah, 2020), contribuição no fechamento do tubo neural de fetos (Maia et al., 2020) e redução de más formações embrionárias (Ma et al., 2015). Com isso, o ácido fólico é uma vitamina importante para a saúde, crescimento e desenvolvimento dos peixes (Shi et al., 2019; Falah et al., 2020; Badran; Ali, 2021).

Estudos conduzidos por Yue et al. (2017) e Sarmah e Marrs (2013) investigaram os efeitos do ácido fólico na embriologia de peixes, utilizando o *Danio rerio* como modelo biológico, e concluíram que o ácido fólico colaborou com o desenvolvimento embrionário dessa espécie. Além disso, o ácido fólico foi testado para outras espécies de vertebrados (Oosterbaan et al., 2012), e apresentou efeitos positivos, principalmente, na circulação sanguínea e na prevenção de cardiopatias (Maia et al., 2020). Apesar dos efeitos positivos do ácido fólico para a saúde dos animais, ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos do ácido fólico na nutrição dos reprodutores e matrizes e, conseqüentemente, no desenvolvimento embrionário.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa que se destaca por sua boa adaptação a diferentes ambientes, rusticidade, precocidade, resistência a baixas temperaturas e boa produção mesmo em períodos frios (Baldisserotto et al., 2020; Santos; Meurer, 2020). Essa espécie alcança a maturidade sexual no primeiro ano de vida e a reprodução artificial é facilitada (Adames et al., 2015), além de apresentar boa taxa de fecundidade e fertilidade (Baldisserotto et al., 2020; Bombardelli, et al., 2021), características favoráveis à pesquisa e produção.

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do ácido fólico no desenvolvimento inicial da prole proveniente de fêmeas de *Rhamdia quelen* alimentadas com ácido fólico.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Atual cenário da aquicultura

A aquicultura cresce de maneira acelerada, superando as demais criações de interesse zootécnico (FAO, 2020) e aplicando cada vez mais tecnologias para atender a demanda que aumenta devido ao crescimento populacional (Barroso et al., 2018). A cadeia produtiva animal sofre pressão para aumentar a quantidade e qualidade do alimento produzido (Barroso et al., 2018). Nesse caso, os peixes se destacam devido a características favoráveis à criação, como rápido crescimento e alta produtividade (FAO, 2022), além de apresentarem boa aceitação pelos consumidores por ser uma carne saudável, rica em ácidos graxos e ômega-3 e -6, nos casos de peixes de água fria (Naylor et al., 2021).

Os peixes de água doce são os mais produzidos na piscicultura mundial (FAO, 2020). No ano de 2020, a produção alcançou 54,4 milhões de toneladas, demonstrando um crescimento de 2,7% entre 2019 e 2020 (FAO, 2022). Afirma-se que esta atividade gera empregos e renda, e está sendo aperfeiçoada a cada ano através de novas tecnologias (Valadão et al., 2018; Roques et al., 2020; Naylor et al., 2021). A FAO (2022) prevê que até o ano de 2030, pouco mais de 90% do total produzido pela aquicultura mundial será destinado ao consumo humano.

O território brasileiro favorece o desenvolvimento da piscicultura, principalmente devido à riqueza de espécies potenciais encontradas no país (Peixe BR, 2023). O Brasil ocupa o 12º lugar no ranking mundial de países mais produtores de 2020 (FAO, 2022). No mesmo ano, a produção de peixes de cultivo foi de, aproximadamente, 803 mil toneladas, representando um incremento de 5,3% (Peixe BR, 2021). No ano de 2022, a piscicultura brasileira apresentou crescimento de 3%, e o país produziu 860 mil toneladas de peixes de cultivo. Além disso, o consumo também cresceu, chegando a 9,5 kg de peixe ao ano/brasileiro (Peixe BR, 2023).

A espécie mais produzida no país é a tilápia, que compõe 64% do total produtivo (Peixe BR, 2023). Entretanto, os peixes nativos seguem ocupando um importante espaço na piscicultura nacional, tendo uma produção de 267.060 toneladas no ano de 2022, representando 31,04% do total produzido (Peixe BR, 2023).

No início deste século, a aquicultura brasileira enfrentou problemas com falta de estrutura da cadeia produtiva, falta de mão de obra especializada, baixa qualidade nas rações e baixo investimento (Baldisserotto, 2009). Atualmente, este cenário mudou, pois a piscicultura agora apresenta avanços tecnológicos como programação nutricional, métodos de criação

intensiva, pesquisas direcionadas e aplicação de sensores e softwares que propulsionam a produção de peixes no país (Peixe BR, 2023).

Entretanto, a indústria aquícola global enfrenta o desafio da carência de alevinos de alta qualidade no mercado (Bombardelli et al., 2023). Na tentativa de desenvolver tecnologias acessíveis e de baixo custo, a pesquisa concentra-se em realizar estudos buscando soluções (Valadão et al., 2018). Nesse contexto, uma das soluções identificadas é investir na nutrição dos reprodutores (Bombardelli et al., 2021). É amplamente reconhecido que a qualidade da prole está intrinsecamente ligada à alimentação adequada dos progenitores (Jobling, 2016). Consequentemente, garantir que os reprodutores estejam bem alimentados e capazes de atingir todo o seu potencial reprodutivo desempenha um papel crucial na geração de descendentes robustos (Nascimento et al., 2023).

2.2 Espécie em estudo: Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Apesar do evidente destaque da tilapicultura no Brasil, a produção de espécies nativas também tem sua importância (FAO, 2022; Peixe BR, 2023). O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um bagre nativo da América do Sul, muito apreciado pelos produtores brasileiros (Baldisserotto et al., 2020). O território conta com 36 mil produtores, sendo o Rio Grande do Sul o destaque na produção nacional de jundiá, compondo mais de 56% do total produzido no país (Peixe BR, 2020).

Comumente conhecido como jundiá ou bagre prateado, *Rhamdia quelen* é uma espécie onívora com tendência carnívora que se caracteriza por ter boa adaptação aos sistemas de cultivo e a dietas artificiais (Baldisserotto et al., 2020). Esse também conta com a aceitabilidade pelos consumidores, rusticidade, boa conversão alimentar (Santos; Meurer, 2020), tolerância a baixas temperaturas e boa produção mesmo no inverno (Baldisserotto et al., 2020).

Seu período reprodutivo ocorre entre setembro e março, com o aumento da temperatura da água no ambiente natural e do fotoperíodo (Galdino et al., 2010; Baldisserotto et al., 2020) e são animais ovulíparos (Pereira et al., 2006). A maturidade sexual é atingida com um ano de vida (Adames et al., 2015). Quando maduros, as fêmeas apresentam abdômen abaulado, papila urogenital avermelhada e coloração de ovócitos uniforme e os machos liberam sêmen com facilidade com uma leve pressão abdominal (Bombardelli et al., 2006; Graeff et al., 2008).

As fêmeas apresentam desova assíncrona, tendo dois picos (um na primavera e outro no verão) com mais de uma desova por pico (Ghiraldelli et al., 2007; Gomiero et al., 2007). A

reprodução induzida é utilizada para o jundiá, seguindo protocolos anteriormente estudados, como, por exemplo, Bombardelli et al. (2006), pois a espécie não se reproduz de forma natural quando criada em cativeiro (Baldisserotto et al., 2020). Os ovos são esféricos, demersais, com espaço perivitelínico bem determinado e córion resistente (Pereira et al., 2006). Logo após a eclosão, no período larval, ainda utilizam os nutrientes disponíveis no vitelo e se alimentam de zooplâncton (Baldisserotto et al., 2020). Quando terminam de consumir o vitelo são considerados pós-larvas, onde já são exemplares dos jundiás adultos, porém em menor tamanho (Galdino et al., 2010). Na tabela 1, a seguir, apresentam-se dados que quantificam a presença desta espécie no âmbito científico.

Tabela 1. Número de publicações com peixes nativos e com *Rhamdia quelen* nas principais plataformas de pesquisa utilizadas.

Plataforma	Fish	Native fish	<i>Rhamdia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	% <i>R. quelen</i>
G. Acadêmico	4.110.000	2.840.000	18.300	14.200	0,35
Scielo	8.235	374	207	162	1,97
ScienceDirect	666.392	77.609	1.046	897	0,13
Pubmed	319.123	5.101	299	264	0,08
Total	5.103.750	2.923.084	19.852	15.523	0,30

Fonte: autora.

Atualmente, estudos utilizando a espécie buscaram elucidar sobre seu cultivo (Rocha et al., 2017), sua nutrição (Goulart et al., 2017; Adorian et al., 2018; Santos; Meurer, 2020), sua reprodução (Goes et al., 2017; Neumann et al., 2019; Lima et al., 2020) e sobre a nutrição de reprodutores (Hilbig et al., 2020; Bombardelli et al., 2021; Bombardelli et al., 2023; Nascimento et al., 2023).

Essas e outras pesquisas demonstram que a boa nutrição dos progenitores é refletida na prole (Izquierdo et al., 2001; Navarro, 2009; Bobe; Labbé, 2010; Romagosa et al., 2010; Jobling, 2016; Hilbig et al., 2020; Bombardelli et al., 2023). Por isso, torna-se interessante a realização de um estudo aprofundado sobre o uso de suplementos, como, por exemplo, vitaminas na dieta dos reprodutores (Pradhan; Olsson 2015; Figueroa et al., 2018; Romanova et al., 2019; Anagha et al., 2021) a fim de avaliar o efeito causado na prole.

2.3 Nutrição de peixes reprodutores

Os primeiros estudos com nutrição de peixes começaram a ganhar espaço em meados do século XX, quando o conhecimento sobre os processos fisiológicos e o interesse pela criação aumentaram (Jobling, 2016). Inicialmente, esses cientistas direcionaram seus esforços para a investigação dos níveis apropriados de fornecimento dos principais nutrientes, como proteínas e aminoácidos (Watanabe et al., 1984), reconhecendo sua relevância para o crescimento e desenvolvimento dos peixes (Jobling, 2016). Os estudos com reprodutores de peixes tiveram impulso nos anos 80 (Woynarovich; Horváth, 1983; Luquet; Watanabe, 1986; Bromage; Roberts, 1995; Watanabe et al., 2002), e focavam em determinar níveis de fornecimento dos principais nutrientes como carboidratos e lipídios (Furuita et al., 2001; Watanabe; Vassallo-Agius, 2003), mas também realizando testes com vitaminas (Nandi et al., 2001) e minerais (Lim et al., 2001).

Com o passar do tempo, os pesquisadores encontraram desafios em realizar novos estudos (Baldisserotto, 2009), principalmente devido ao alto custo de realização dos experimentos, falta de infraestrutura, diferenças entre as espécies e a dificuldade de realizar ensaios com as fases iniciais, como embriões e larvas (Izquierdo et al., 2001). Por esses e outros motivos, apesar da relevância indiscutível da nutrição adequada para assegurar uma produção de qualidade e economicamente viável (Roques et al., 2020), a nutrição de peixes reprodutores ficou atrasada em relação às demais categorias da piscicultura (Jobling, 2016; Bombardelli et al., 2023).

O progresso nesse campo tem aumentado, em especial, devido à evolução de práticas inovadoras, tais como a formulação de dietas específicas para cada espécie e fase de produção (Craig et al., 2017). Outros exemplos são a substituição de fontes lipídicas e proteicas (Hilbig et al., 2020), e a aplicação de aditivos e suplementos para otimizar o desempenho dos peixes (Goes et al., 2017; Shi et al., 2019). Diante disto, os avanços desempenham um papel fundamental no aprimoramento da aquicultura e seu desenvolvimento sustentável e econômico (Roques et al., 2020; Gisbert et al., 2021).

A nutrição de reprodutores e matrizes é uma área de grande importância, contudo, muito distante da compreensão necessária para atender corretamente a categoria (Jobling, 2016). Mediante uma alimentação adequada é possível atingir o máximo desenvolvimento, especialmente no que se refere ao crescimento e maturação das gônadas (Bombardelli et al., 2017), a fecundidade, a qualidade dos gametas (Bombardelli et al. 2023), dos embriões e larvas (Mommsen; Korsgaard, 2008). Portanto, é preciso que os avanços tecnológicos sigam

acontecendo para ser possível elucidar todos os parâmetros exigidos pelos reprodutores a fim de garantir uma prole vital.

A relação entre nutrição e reprodução em peixes é fisiologicamente complexa, dificultando a determinação da interdependência entre esses processos (Jobling, 2016). No entanto, é amplamente reconhecido que os peixes destinados à reprodução são animais de alta performance (Wu, 2022) e, por isso, requerem uma alimentação balanceada ao longo de suas vidas para atender suas exigências metabólicas elevadas (Bombardelli et al., 2017). Os resultados obtidos em estudos conduzidos com machos e fêmeas confirmam essa hipótese (Izquierdo et al., 2001; Mazorra et al., 2003; Bombardelli et al., 2017), destacando os efeitos positivos da alimentação adequada na reprodução desses animais (Bombardelli et al., 2021).

No que se refere aos peixes reprodutores, é necessário considerar a nutrição como um investimento na produção. A formulação da dieta para esses animais requer a utilização de ingredientes de alta qualidade, o que inevitavelmente resulta em custos mais elevados, em comparação com rações destinadas a peixes em fases de crescimento e terminação, cujas demandas nutricionais são menos exigentes e podem ser satisfeitas com ingredientes mais acessíveis (Izquierdo et al., 2001; Jobling, 2016). É importante notar que, os gastos relacionados à nutrição representam, em média, aproximadamente 70% do custo total de produção no contexto da criação de peixes em fase de crescimento (Brabo et al., 2021). Portanto, a escassez de pesquisas direcionadas a peixes reprodutores pode ser atribuída, em parte, aos custos significativos associados à manutenção do plantel, aliada à baixa escala de produção de rações específicas para essa fase do ciclo de vida dos peixes (Schulter; Vieira Filho, 2017).

Os peixes possuem ovos telolécitos e são lecitotróficos (Mommosen; Korsgaard, 2008), isso quer dizer que a nutrição dos embriões depende dos nutrientes depositados no vitelo pela fêmea durante a vitelogênese. Esse é o processo em que as reservas da fêmea serão mobilizadas para a formação do vitelo, que servirá de aporte nutricional para o embrião e larvas (Fernandez-Palacios et al., 2011). Assim, uma fêmea que recebe alimentação adequada tende a depositar um vitelo mais rico nutricionalmente (Bombardelli et al., 2017), evitando a ocorrência de anormalidades e produzindo uma prole mais vigorosa (Nascimento et al., 2023). Com base nisso, estudos estão sendo conduzidos com diversos suplementos na dieta, incluindo vitaminas (Fernandez et al., 2019; Beato et al., 2020), a fim de atender às elevadas demandas das matrizes (Navarro et al., 2014; Anagha et al., 2021).

As vitaminas são consideradas nutrientes essenciais, ou seja, o organismo não tem capacidade de produzi-las, então devem ser fornecidas de forma exógena (Borba et al., 2013). Elas atuam como catalisadoras e reguladoras metabólicas (Romagosa et al., 2013), contribuindo

para o crescimento e a saúde dos animais (Navarro et al., 2011). Também melhoram a qualidade dos embriões, a sobrevivência das larvas e a normalidade larval (Neu et al., 2012), aumentando a taxa de fertilidade (Mataveli et al., 2010) e outros aspectos relacionados à reprodução. Na natureza, os animais conseguem suprir suas necessidades no consumo de folhas, crustáceos, fito e zooplanktons, frutas e outros alimentos disponíveis (Furuya et al., 2010). Por outro lado, no cultivo, os peixes dependem das rações para atender às suas necessidades nutricionais totais, tornando a suplementação vitamínica uma alternativa viável para garantir a adequada nutrição dos animais (Akhtar; Ciji, 2021).

As vitaminas C, A e E são as mais estudadas na nutrição de peixes (Volkoff, 2018). No entanto, as vitaminas do complexo B ganham destaque tratando-se do funcionamento geral do organismo, isso porque elas funcionam como cofatores enzimáticos e são essenciais para a maioria dos processos bioquímicos (NRC, 2011). Dado que essas vitaminas não são produzidas de forma natural pelo organismo (Ciešlik; Ciešlik, 2018), o fornecimento externo, como na alimentação, é necessário para suprir as demandas nutricionais dos peixes (Borba et al., 2013).

Romanova et al. (2019) conduziram um estudo em que adicionaram tiamina (vitamina B1) à dieta de pós-larvas de bagre africano (*Clarias gariepinus*). Com isso, observaram um aumento significativo na sobrevivência e fertilidade, bem como uma redução nas anormalidades larvais e na taxa de mortalidade. Outros grupos de pesquisadores também exploraram o uso de piridoxina (vitamina B₆) na dieta de *Labeo rohita* (Akhtar et al., 2011) e *Chanos chanos* (Kumar et al., 2017). Em ambos os casos, a vitamina demonstrou aumentar a atividade da lisozima, reforçar a imunidade dos animais e atuar como antioxidante.

Dentre as várias vitaminas do complexo B, o ácido fólico recebe destaque devido aos seus benefícios em vários aspectos da saúde e produção animal (Sesay et al., 2016; Falah et al., 2020). Porém, na literatura, pouco se encontra sobre os efeitos do ácido fólico na reprodução de peixes (Anagha et al., 2021) e na prole.

2.4 Desenvolvimento embrionário e sua relação com a vitelogenese

O estágio inicial de desenvolvimento dos peixes é de grande interesse, tanto na comunidade científica quanto na produção em cativeiro, uma vez que a qualidade dos juvenis e adultos está diretamente relacionada à qualidade dos gametas fertilizados (Fernández-Palacios et al., 2011) e à qualidade do vitelo fornecido pela fêmea, que nutrirá o embrião e a larva (Mommosen; Korsgaard, 2008). À medida que as fêmeas alcançam a idade e peso necessários

para a reprodução, seus sistemas sensoriais detectam mudanças ambientais, como variações no fotoperíodo, temperatura e aumento das chuvas (Mommosen; Korsgaard, 2008).

Os sistemas sensoriais, por sua vez, estimulam a liberação de hormônios, como a gonadotrofina (GnRH) na hipófise, que desencadeiam a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) na corrente sanguínea, chegando, finalmente, aos ovários (Honji; Moreira, 2017). Nos ovários, ocorrem mitoses e meioses nas oógonias, sob a influência de enzimas e hormônios, incluindo a conversão da testosterona em 17 beta estradiol (17 β -estradiol ou 17 β), que estimula as células hepáticas a iniciar o processo da vitelogênese (Sullivan; Yilmaz, 2018).

No do fígado, o 17 β -estradiol interage com os receptores de estrogênio presentes no citoplasma dos hepatócitos (Fernández-Palacios et al., 2011), desencadeando alterações conformacionais que ativam proteínas co-reguladoras. Essas, por sua vez, estimulam a transcrição dos genes da vitelogenina, que é composta por polipeptídeos nos hepatócitos (Mommosen; Korsgaard, 2008). Após transcrição completa e modificações necessárias, a proteína é transportada via corrente sanguínea para os ovários (Sullivan; Yilmaz, 2018). Através dos receptores de vitelogenina, a vesícula vitelínica começa a formar-se, rica em lipoproteínas, e com o desenvolvimento do ovócito, sofre ações enzimáticas. Essas ações resultam no conteúdo de vitelo (Honji; Moreira, 2017), composto de aminoácidos, ácidos graxos, lipídios, vitaminas e minerais, essenciais para nutrir o embrião e larva (Mommosen; Korsgaard, 2008; Sullivan; Yilmaz, 2018).

Fernández-Palacios et al. (2011) indicam que a nutrição dos reprodutores afeta diretamente a nutrição dos embriões, visto que o conteúdo do vitelo depende dos nutrientes disponíveis no corpo da fêmea. Contudo, os componentes genéticos dos espermatozoides também são cruciais para o desenvolvimento embrionário. Estudos com a suplementação de ácido fólico na dieta de vertebrados machos demonstraram melhorias na espermatogênese (Alonge et al., 2019), motilidade espermática e estado antioxidante do espermatozoide (Ibrahim et al., 2011), além de outros parâmetros relacionados à qualidade espermática (Salarkia et al., 2017).

No caso dos peixes, o desenvolvimento do zigoto inicia-se pela separação do córion da membrana plasmática para formação da membrana de fertilização (Kimmel et al., 1995). Posteriormente, ocorre a separação do citoplasma, acumulando-se no lado oposto ao vitelo, chamado pólo animal do ovo, resultando no citoplasma ativo ou blastodisco (Galdino et al., 2010). No blastodisco ocorrem diversas clivagens meroblásticas (divisões mitóticas) resultando em 64 blastomêros (Gilbert, 2006).

De acordo com Galdino et al. (2010), o estágio seguinte é chamado de blástula, sendo dividido entre blástula inicial, média, final ou tardia. A blástula inicial é caracterizada pela formação da blastoderme (composta por 128 a 256 células), disposta em forma de meia-esfera em cima do vitelo (Kimmel et al., 1995). A blástula média se dá com a multiplicação dessas células, formando a camada sincicial do vitelo (Galdino et al., 2010). Na blástula final ou tardia, tem-se o achatamento da blastoderme, formando uma massa compacta, que posteriormente cobrirá o vitelo em um processo chamado de epibolia (Gilbert, 2006).

O próximo período se chama gástrula (Kimmel et al., 1995; Galdino et al., 2010), definido pelos autores como a epibolia de 12 a 50% e pela presença do anel germinativo que está ao redor da margem do blastoderma. Conforme a epibolia avança, a blastoderme cobre o vitelo até chegar ao estágio de neurula (Kimmel et al., 1995). Nesse estágio, a blastoderme já cobriu quase toda a célula vitelina, deixando apenas um espaço chamado tampão vitelino, que será fechado formando o blastóporo e, depois, o embrião (Gilbert, 2006). No período de segmentação, ocorre a formação da coluna vertebral através dos somitos. Paralelamente, aparecem as vesículas ópticas que serão, mais tarde, os olhos (Kimmel et al., 1995). A cauda e a extensão do vitelo também se formam nesta fase e, com 18 somitos, já ocorrem as primeiras contrações musculares e o embrião passa para a fase de faríngula (Galdino et al., 2010).

Na faríngula, o embrião apresenta movimentação intensa e o corpo alongado (Gonzalez-Doncel et al., 2005). Com o avanço do desenvolvimento, o embrião precisa de curvar dentro do ovo (ao redor do vitelo), a circulação sanguínea se inicia e os primeiros batimentos cardíacos são visíveis (Gilbert, 2006). A formação da nadadeira embrionária, do intestino, da boca e do opérculo ocorrem nesta fase e se estende até a eclosão (Galdino et al., 2010).

Com o desenvolvimento completo da larva no córion, o coração chega a 100 batimentos por minuto, as larvas passam a movimentar a cauda até romper a parede do ovo e saírem (Gonzalez-Doncel et al., 2005; Gilbert, 2006). O período larval ocorre do momento da eclosão até a completa absorção do vitelo. Os olhos tornam-se pigmentados no período larval inicial e o corpo recebe pigmentação no período larval médio (Kimmel et al., 1995). Com a evolução da mandíbula e dos lábios, as larvas desenvolvem a bexiga natatória, absorvem todo o vitelo e podem iniciar a alimentação exógena, tornando-se pós-larva (Galdino et al., 2010).

Graças ao córion transparente que cobre os ovos de peixes, torna-se possível um estudo não invasivo e detalhado, permitindo o acompanhamento das fases e divisões celulares (Gonzalez-Doncel et al., 2005). Entretanto, são necessários estudos adicionais que avaliem o desenvolvimento embrionário das demais espécies de peixe, para ser possível o aperfeiçoamento das técnicas a fim de gerar proles de maior qualidade (Nascimento et al.,

2023). Além disso, a literatura carece de estudos que relacionem a suplementação da nutrição de reprodutores e a qualidade dos embriões.

Apesar dos efeitos positivos das vitaminas na nutrição dos peixes, a pesquisa com a suplementação de vitaminas do complexo B à dieta destes animais é limitada. Entretanto, o ácido fólico tem recebido destaque (Liew, 2016), devido aos muitos benefícios relacionados ao desenvolvimento inicial. Como já demonstrado em outras espécies de vertebrados, esse atuou melhorando a circulação sanguínea, formação neural e desenvolvimento cardíaco (Oosterbaan et al., 2012; Elad et al., 2020; Maia et al., 2020).

2.5 Ácido fólico

O ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, sendo chamado de "fólico" devido à sua presença em vegetais folhosos (Liew, 2016). Nos organismos vivos, essa vitamina não é produzida em quantidade suficiente, tornando necessária sua fonte exógena (Nazki; Sameer; Ganaie, 2014). Sua nomenclatura completa é 2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico, também conhecido como ácido pteroilglutâmico (forma estável da vitamina) (Alaburda; Shundo, 2007). É encontrado no sangue na forma de 5-metil-tetrahidrofolato (Liew, 2016), sendo composto por pteridina (6-metilptero), ácido L-glutâmico e ácido p-aminobenzóico (Cieslik; Cieslik, 2018).

Em 1930, a pesquisadora Lucy Wills foi a primeira a identificar um fator presente em leveduras e extratos de fígado (Vannucchi; Monteiro, 2010), fundamental para a formação e desenvolvimento do sangue. Este seria, posteriormente, denominado ácido fólico (Maia et al., 2020). Na época, os pesquisadores ainda não tinham conhecimento sobre o ácido fólico, e a cada nova descoberta recebia diferentes denominações (Liew, 2016). Somente em 1945, por meio da síntese do ácido pteroilmonoglutâmico, foi possível identificá-lo (Vannucchi; Monteiro, 2010).

Após ser ingerido em sua forma natural, o ácido fólico é reduzido a dihidrofolato (DHF), e depois a tetrahidrofolato (THF) pela enzima dihidrofolato redutase, processo que ocorre no fígado (Cherukad et al., 2012; Lian et al., 2022). O THF é formado por monoglutamatos ligados a proteínas, resultado da redução do poliglutamato, sendo absorvido pelo intestino via transporte ativo (Suárez-Obando et al., 2010), fazendo com que sua absorção seja mais rápida quando comparado a outros folatos (Vannucchi; Monteiro, 2010; Cherukad et al., 2012). Os

mesmos autores destacam que a vitamina B₁₂ é essencial para a absorção e utilização adequada do ácido fólico pelo organismo (Lehninger, 2014).

Em seguida, no intestino, a enzima pteroilpoliglutamato hidrolase atua sobre as moléculas de folato, removendo os resíduos de glutamato e transformando-o em uma forma oxidada (Vannucchi; Monteiro, 2010). No duodeno, a dihidrofolato redutase realiza a metilação da forma oxidada do folato, que é, então, liberada na corrente sanguínea como 5-metil-tetrahydrofolato (5-metil-THF) (Lian et al., 2022). Essa forma ativa é distribuída pelos tecidos alvo, com a colaboração da albumina e de outras proteínas com alta afinidade pelo ácido fólico (Cherukad et al., 2012).

O ácido fólico é uma versão sintética e altamente estável, enquanto o 6S-5-metiltetrahydrofolato é a forma predominante de ácido fólico dietético (Lian et al., 2022). Esse está presente na circulação sanguínea, sendo utilizado como uma forma cristalina de sal de cálcio (MTHF-Ca) (Cherukad et al., 2012). O processo de reabsorção "de novo" de uma parte do ácido fólico se inicia no fígado, ocorrendo a redução e metilação do ácido fólico. A bile, então, secreta tetrahydrofolato que será reabsorvido no intestino e, posteriormente, liberado para os tecidos, mantendo o equilíbrio corporal (Vannucchi; Monteiro, 2010). A figura 1 apresenta um esquema simplificado do metabolismo do ácido fólico idealizado por Cherukad et al. (2012).

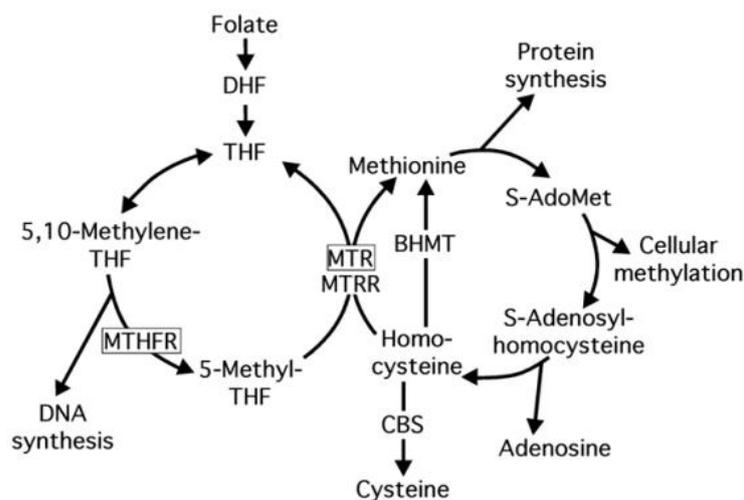


Figura 1. f Esquema do metabolismo do ácido fólico. DHF = dihidrofolato; THF = tetrahydrofolato; DNA = ácido desoxirribonucleico; MTHFR = 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase; MTR= metionina sintase; MTRR = metionina sintase redutase; S-Adomet = S-adenosil-L-metionina; BHMT = betaína-homocisteína metiltransferase; CBS = cistationina beta-sintase. Fonte: CHERUKAD et al. (2012).

Estudos realizados em animais na década de 50 foram os primeiros a identificar a importância do ácido fólico durante a hematopoiese (Sunde et al., 1950; Slungaard; Higgins, 1956). Com os resultados encontrados pelos autores, o ácido fólico passou a ser uma alternativa para o tratamento de anemia, pois a deficiência de ácido fólico aumentava a ocorrência da doença nos modelos biológicos utilizados. Ele também participa da rápida divisão celular (Lian et al., 2022), atuando na medula óssea e na mucosa gastrointestinal, além de funcionar como coenzima em reações com transferência de radicais metil (Vannucchi; Monteiro, 2010). Esse também está envolvido na síntese de purina e timidilato, sendo essencial no metabolismo de serina e regulação dos níveis de homocisteína no organismo (Kobus et al., 2009; Oosterbaan et al., 2012; Lehninger, 2014).

Além disso, o ácido fólico atua na síntese proteica de metionina, um aminoácido que, posteriormente, codificará o RNA e o DNA (Lian et al., 2022), tornando-o fundamental para o processo de reparo no DNA (Liew et al., 2016; Maia et al., 2020). Ele também é essencial para a regulação da expressão gênica (Yue et al., 2017), para o processo de eritropoiese, para o desenvolvimento normal do organismo (Elad et al., 2020) e para a prevenção de defeitos congênitos (Lian et al., 2022).

A deficiência de ácido fólico pode ocorrer devido à baixa ingestão da vitamina por meio da alimentação (Maia et al., 2020). A ausência ou limitação de ácido fólico pode comprometer a metilação de citosina (Vannucchi; Monteiro, 2010) e, conseqüentemente, causar alterações negativas na síntese de DNA (Liew et al., 2016), além de aumentar a ocorrência de anemia, doenças cardiovasculares (Lian et al., 2022) e deformações no tubo neural (Cherukad et al., 2012; Wen et al., 2012).

Estudos realizados em diferentes espécies (Tabela 2) demonstraram alguns dos efeitos do ácido fólico. Em aves, esse exerce efeitos sobre a epigenética, alterando o perfil de metilação de promotores específicos, aumentando a vascularização do embrião e a expressão genética de genes relacionados à imunidade (Elad et al., 2020; Oosterbaan et al., 2012). Além disso, Elad et al. (2020) afirmam que galinhas que receberam suplementação dietética de ácido fólico, geraram ovos que continham maior proporção deste nutriente no conteúdo das gemas avaliadas.

Em peixes, o ácido fólico atuou como promotor de crescimento, imunomodulador e aprimorador das características zootécnicas (Falah et al., 2020). Além disso, em embriões expostos ao ácido fólico, reduziu a ocorrência de má formação cardíaca (Yue et al., 2017), bem como das deformidades neurais e motoras (Cadena et al., 2020). O ácido fólico agiu como neutralizador à toxicidade por dióxido de titânio (Anagha et al., 2021) e por arsênio (Ma et al.,

2015), e reverteu os efeitos negativos causados pela exposição dos embriões ao etanol (Sarmah; Marrs, 2013).

Tabela 2. Estudos realizados a fim de avaliar os efeitos do ácido fólico na embriologia de diferentes espécies.

Espécie	Dose	Objetivo	Resultado	Referência
<i>Danio rerio</i>	0,05 μM^*	Desenvolvimento cardíaco e expressão gênica	Reduziu os defeitos cardíacos embrionários. Atuou na regulação de genes do receptor de AhR e nas vias de sinalização de AhR e Wnt/b-catenina	Yue et al., 2017
<i>Danio rerio</i>	50 μM^*	Proteção à embriões expostos ao etanol	Reduziu edemas e anomalias cardíacas causadas pelo etanol. Atuou na formação dos olhos e favoreceu o comprimento dos embriões.	Sarmah; Marrs (2013)
<i>Danio rerio</i>	100 μM^*	Proteção contra toxicidade embrionária por arsênico	Aumentou as taxas de eclosão e sobrevivência. Reduziu a ocorrência de malformações e melhorou o desenvolvimento cardíaco e neural. Reverteu os prejuízos causados pelo arsênico.	Ma et al., (2015)
<i>Danio rerio</i>	75 μM^*	Proteção à defeitos comportamentais e morfológicos pela exposição embrionária ao etanol	Reduziu os defeitos morfológicos no coração, olhos e bexiga natatória nos animais expostos. Melhorou os reflexos e atividade motora das larvas.	Cadena et al., 2020
<i>Danio rerio</i>	250 a 10000 μM^*	Toxicidade e segurança do ácido fólico e do MTHF-Ca no desenvolvimento embrionário	Apresentou toxicidade cardiovascular quando em excesso. Causou inibição da angiogênese e, em níveis adequados, reduziu a ocorrência de edemas cardíacos.	Lian et al., 2022

Tabela 2. Estudos realizados a fim de avaliar os efeitos do ácido fólico na embriologia de diferentes espécies (continuação).

<i>Labeo rohita</i>	4,0mg kg ^{-1**}	Ação do ácido fólico nas alterações hormonais causadas por nanopartículas de dióxido de titânio	Regulou os hormônios reprodutivos e níveis de VTG. Inibiu os efeitos negativos do dióxido de titânio nos níveis de VTG. Regulou a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e ovários e aumentou o índice gonadossomático.	Anagha et al., (2021)
<i>Gallus domesticus</i>	0,5 µg***	Ação da homocisteína e do ácido fólico no desenvolvimento embrionário	Aumentou a proliferação de células para o fechamento do tubo neural. Regulou a apoptose. Aumentou a expressão gênica da NCAM, melhorando a adesão entre células nervosas.	Kobus et al., 2009
<i>Gallus domesticus</i>	1.72 mM*	Efeito do ácido fólico na metilação do DNA cromossômico e o resultado epigenético no controle da expressão gênica em células B	Efeito imunomodulador em células B de frangos. Modificou o padrão de metilação das regiões proximais dos promotores TLR4, imunoglobulina Igβ e cadeia β do MHCII. Efeito positivo na metilação do DNA.	Elad et al., 2020
<i>Gallus gallus</i>	0.1 µg***	Efeito do ácido fólico e da homocisteína no desenvolvimento vascular do embrião	Aumentou o diâmetro, calibre e número dos vasos sanguíneos, melhorando a vascularização dos ovos. Inibiu alguns dos efeitos negativos da homocisteína.	Oosterbaan et al., 2012

Tabela 2. Estudos realizados a fim de avaliar os efeitos do ácido fólico na embriologia de diferentes espécies (continuação).

Humanos Gestantes	0,4 mg/dia**	Efeitos na embriogênese	Demonstrou-se essencial para o desenvolvimento neural do feto, para a proliferação celular, síntese de DNA/RNA. Colabora com a eritropoiese e previne deformações cardíacas.	Maia et al., 2020
----------------------	-----------------	-------------------------	--	-------------------

*Ácido fólico diluído na água de incubação; **Fornecimento na dieta; ***Injetável; AHR: receptor de hidrocarboneto aromático; MTHF-Ca=6S-5-metiltetrahidrofolato.; MHCII=complexo de histocompatibilidade II; NCAM=molécula de adesão de células neurais; VTG=vitelogenina. μ M=micromolar; mg= miligrama; kg=quilograma; μ g=micrograma; mM=milimolar.

Fonte: Autora.

Conforme apontado por Fernandes et al. (2015), os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes podem ser equiparados ao primeiro trimestre da gestação humana. Nesse sentido, em uma analogia com seres humanos, é amplamente reconhecida a recomendação dos médicos para que gestantes façam a suplementação de ácido fólico ao longo da gravidez (Bulloch et al., 2018). Esse cuidado é adotado visando a redução das chances de malformações cardíacas e do sistema nervoso central do feto (Maia et al., 2020), bem como para prevenir a ocorrência de anemia e pré-eclâmpsia (Lian et al., 2022). Dessa forma, é possível supor que essas descobertas serão replicadas no caso dos peixes, apesar das divergências entre espécies e organismos.

Como visto na tabela anterior, estudos em embriões de peixes demonstraram que o ácido fólico foi benéfico para o desenvolvimento inicial dos animais. Yue et al. (2017) utilizaram a espécie *Danio rerio*, conhecida como zebrafish, para avaliar os efeitos do ácido fólico sobre embriões. Esses foram expostos a diferentes níveis de adição de ácido fólico na água e, como resultado, observou-se uma melhora no desenvolvimento cardíaco e na expressão gênica dos embriões. Os mesmos resultados foram encontrados por outros pesquisadores, comprovando a eficiência do ácido fólico para a espécie, porém os autores afirmam que doses excessivas do ácido fólico podem ser tóxicas (Lian et al., 2022).

Outros grupos de pesquisadores avaliaram os efeitos do ácido fólico na prevenção de malformações cardíacas e no desenvolvimento de embriões de zebrafish expostos ao etanol e ao ácido fólico. Como resultado, o ácido fólico preveniu e atenuou as deformações cardíacas causadas pela exposição ao etanol (Sarmah; Marrs, 2013; Cadena et al., 2020). No entanto, os grupos sugerem que mais estudos sejam realizados para elucidar as vias metabólicas pelas quais o ácido fólico consegue evitar alterações epigenéticas negativas.

Estudos com o ácido fólico foram realizados em outras espécies a fim de avaliar parâmetros antioxidantes (Sesay et al., 2016; Falah et al., 2020), resposta imunológica (Asaikkutti et al., 2016; Badran; Ali, 2021), desempenho zootécnico (Khan; Zehra, 2020), fatores nutricionais (Miao et al., 2013) e proteção neural (Cherukad et al., 2012; Czeizel et al., 2013; Ma et al., 2015; Cadena et al., 2020).

Entretanto, é escassa a pesquisa sobre as interações do ácido fólico com a nutrição e reprodução. Embora o impacto positivo dessa vitamina na nutrição animal e seus efeitos benéficos na qualidade da prole de outras espécies sejam conhecidos, ainda é necessário que mais investigações sejam feitas, principalmente para avaliar os efeitos do ácido fólico no desenvolvimento da prole de peixes.

2.6 Ácido fólico na embriologia de peixes

Com base nos estudos apresentados anteriormente envolvendo a suplementação de vitaminas na dieta de peixes, e considerando os benefícios já observados do ácido fólico no desenvolvimento embrionário de vertebrados, é possível supor que a inclusão de ácido fólico na alimentação dos peixes reprodutores resulta no aumento da presença deste nutriente no vitelo. Isso permite que o embrião se beneficie das propriedades do ácido fólico. A Figura 1 ilustra essa hipótese.

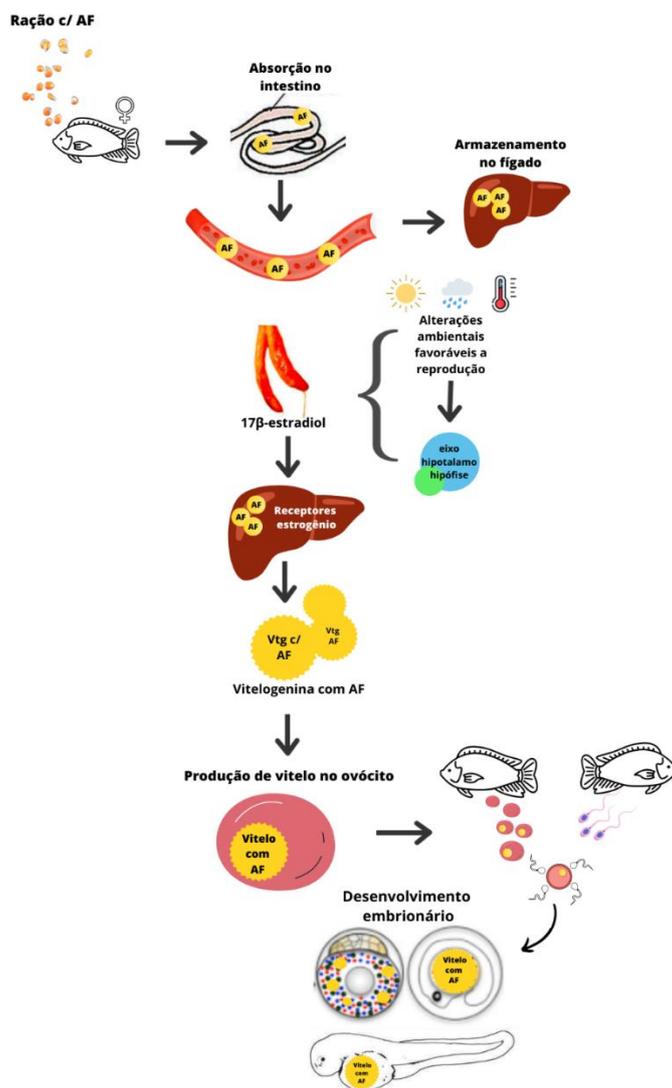


Figura 2. Representação esquemática do possível metabolismo do ácido fólico adicionado à dieta de peixes e a maneira como a vitamina seria transportada para a prole. AF=ácido fólico; VTG=vitelogenina. Fonte: autora.

Espera-se que a inclusão de ácido fólico na dieta de peixes fêmeas resulte na absorção intestinal e subsequente armazenamento hepático da vitamina (Vannucchi; Monteiro, 2010; Liew, 2016). Quando as fêmeas estiverem prontas para se reproduzir, estímulos ambientais desencadearão a liberação de hormônios reprodutores (Mommosen; Korsgaard, 2008), levando os hepatócitos a iniciarem a produção de vitelogenina (Sullivan; Yilmaz, 2018), processo em que o ácido fólico teve efeito regulatório (Anagha et al., 2021). Dessa forma, essa proteína se formará a partir dos nutrientes armazenados no fígado (Honji; Moreira, 2017), incluindo o ácido fólico que estará retido. Posteriormente, a vitelogenina será transportada para os ovócitos, onde constituirá o conteúdo do vitelo (Jobling, 2016), que por sua vez será uma fonte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento do embrião e larva (Fernández-Palacios et al., 2011).

Em virtude do abordado anteriormente, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do ácido fólico na prole de matrizes de *Rhamdia quelen*, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes concentrações da vitamina. Até o momento, a influência do ácido fólico dietético no desenvolvimento embrionário através do vitelo ainda não foi avaliada, apesar dos efeitos benéficos já observados em relação a outras espécies, como o zebrafish (Sarmah; Marrs, 2013; Ma et al., 2015; Yue et al., 2017; Cadena et al. 2020; Lian et al., 2022) e *Labeo rohita* (Anagha et al., 2021).

2.7 Referências

- ADAMES, M. S.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A. H.; BURATTO, C. N., PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119-128, 2015. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.014.
- ADORIAN, T. J.; MOMBACH, P. I.; PIANESSO, D.; LIMA, J.; SOARES, T.; LOEBENS, L., PICOLLI, L Da S. Functional linseed fibres and their impacts on silver catfish (*Rhamdia quelen*) nutrition. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 1647-1656, 2020. Doi: 10.1111/anu.13110.
- AKHTAR M. S.; CIJI A. Pyridoxine and its biological functions in fish: Current knowledge and its perspectives in aquaculture. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 29, n. 2, p. 260–278. 2021. Doi: 10.1080/23308249.2020.1813081.
- AKHTAR, S. M.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; ALEXANDER, C.; GUPTA, S. K.; CHOUDHARY, A. K.; RAJAN, M. G. Stress mitigating and immunomodulatory effect of dietary pyridoxine in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 7, p. 991-1002, 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02383.x.

- ALABURDA, J.; SHUNDO, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 95-102, 2007. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32816>>. Acesso em: 12 jun. 2023.
- ALONGE, S.; MELANDRI, M.; LEOCI, R.; LACALANDRA, G.; CAIRA, M.; AIUDI, G. The effect of dietary supplementation of vitamin e, selenium, zinc, folic acid, and n-3 polyunsaturated fatty acids on sperm motility and membrane properties in dogs. **Animals**, v.2, n.9, p.34. 2019. Doi: 10.3390/ani9020034.
- ANAGHA, T.; GUPTA, S.; SAHU, N. P.; SRIVASTAVA, P. P.; VARGHESE, T.; CHANU, T. I.; CIJI, A. Titanium dioxide nanoparticles alter reproductive and thyroid hormones of *Labeo rohita* females: Amelioration through vitamin E and folic acid. **Aquaculture**, v. 539, p. 736633, 2021. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736633.
- ASAIKKUTTI, A.; BHAVAN, P. S.; VIMALA, K. Effects of different levels of dietary folic acid on the growth performance, muscle composition, immune response and antioxidant capacity of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 464, p. 136-144, 2016. Doi: /10.1016/j.aquaculture.2016.06.014.
- BADRAN, M. F.; ALI, M. A. M. Effects of folic acid on growth performance and blood parameters of flathead grey mullet, *Mugil cephalus*. **Aquaculture**, v. 536, p. 736459. 2021. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736459.
- BALDISSEROTTO B.; BARCELLOS, L.G.; FRACALOSSO, D.; KREUTZ L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: Jundiá (*Rhamdia sp.*)**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2020.
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.
- BARROSO, R. M., MUÑOZ, A. E. P., TAHIM, E. F., WEBBER, D. C., ALBUQUERQUE FILHO, A. D. C., PEDROZA FILHO, M. X. et al. Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil, **Embrapa**, Brasília. 2018.
- BÉNÉ, C., BARANGE, M., SUBASINGHE, R., PINSTRUP-ANDERSEN, P., MERINO, G., HEMRE, G. I., WILLIAMS, M. Feeding 9 billion by 2050—Putting fish back on the menu. **Food Security**, v. 7, p. 261-274, 2015. Doi: 10.1007/s12571-015-0427-z.
- BOBE, J., LABB´E, C. Egg and sperm quality in fish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 165, 535–548. 2010. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.011.
- BOMBARDELLI, R. A.; SANTOS H. J. K.; CESTARI, M. M.; MARQUES, A. E. M. L.; CHAGAS, T. V.; MEURER, F. Improved sperm DNA integrity and altered fat metabolism and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) males fed rations with purified nucleotide. **Aquaculture**, v. 562, p. 738682, 2023. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738682.
- BOMBARDELLI, R. A.; GOES, E. S. R.; SOUSA, S. M. N.; SYPPERRECK, M. A.; GOES, M. D.; PEDREIRA, A. C. O.; MEURER, F. Growth and reproduction of female Nile tilapia

- fed diets containing different levels of protein and energy. **Aquaculture**, v. 479, p. 817-823. 2017. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.031.
- BOMBARDELLI, R. A.; OLIVEIRA, E. J.; SYPERRECK, M. A.; PEDREIRA, A. C. O.; FREITAS, J. M. A.; MARQUES, A. E. M. L. et. al. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. **Aquaculture**, 530, 735724. 2021. Doi:[https://doi/10.1016/j.aquaculture.2020.735724](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735724).
- BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Rev. Bras. Zootec.** 35, 1251–1257. 2006. Doi: 10.1590/s1516-35982006000500001.
- BORBA, M. R.; SÁ, M. V. C.; ABREU, J. S. Vitaminas e minerais, in: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), Nutriaqua: **Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse Para a Aquicultura Brasileira**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, p. 121-165. 2013.
- BORBA, M.R.D.; E SÁ, M.V.C.; DE ABREU, J.S. Vitaminas e Minerais. In: Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: **Aquabio**, p. 121-167. 2013.
- BRABO, M. F.; SILVA, A. R. L.; BARROS, K. D. N.; RODRIGUES, R. P.; CAMPELO, D. A. V.; Veras, G. C. Custo de produção de rações alternativas para peixes onívoros no estado do Pará, Amazônia, Brasil. **Agrarian**, v. 14, n. 51, p. 127-135, 2021. Doi: 10.30612/agrarian.v14i51.10670.
- BROMAGE, N. R.; ROBERTS. R. J. Broodstock management and egg and larval quality. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, UK. 1995.
- BULLOCH, R. E.; LOVELL, A. L.; JORDAN, V. M.; MCCOWAN, L. M.; THOMPSON, J. M.; WALL, C. R. Maternal folic acid supplementation for the prevention of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 32, n. 4, p. 346-357, 2018. Doi: 10.1111/ppe.12476.
- CADENA, P. G.; CADENA, M. R. S.; SARMAH, S.; MARRS, J. A. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 249-257, 2020. Doi: 10.1016/j.reprotox.2020.07.013.
- CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, M. N. M.; MORETTI, C. L., FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 397-404, 2006. Doi: 10.1590/S0102-05362006000400001.
- CHERUKAD, J.; WAINWRIGHT, V.; WATSON, E. D. Spatial and temporal expression of folate-related transporters and metabolic enzymes during mouse placental development. **Placenta**, v. 33, n. 5, p. 440-448, 2012. Doi: 0.1016/j.placenta.2012.02.005.

- CIEŚLIK, E.; CIEŚLIK, I. Occurrence and significance of folic acid. **Pteridines**, v. 29, n. 1, p. 187-195, 2018. Doi: 10.1515/pteridines-2018-0017.
- COMBS Jr., G.F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. 4ed. New York: Academic Press, 598p. 2012.
- CRAIG, S. R.; HELFRICH, L. A.; KUHN, D.; SCHWARZ, M.H. Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. **Virginia Cooperative Extension**. 2017.
- CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I.; VERECZKEY, A.; BÁNHIDY, F. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. **Nutrients**, v. 5, n. 11, p. 4760-4775, 2013. Doi: 10.3390/nu5114760.
- ELAD, S. O.; URIBE-DIAZ, D. L. D.; YITBAREK, S. A.; SHARIF, S.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Epigenetic effect of folic acid (FA) on the gene proximal promoter area and mRNA expression of chicken B cell as antigen presenting cells, **British Poultry Science**, 61:6, 725-733. 2020. Doi: 10.1080/00071668.2020.1799332.
- EL-FOTOH, A.; EL-SAYED, M.; EL-RAHMAN, A.; FARAG, M. E.; KHALIL, B. A.; AYYAT, M. S. Dietary combination of vitamin e, selenium, and zinc effect on the reproductive efficiency of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Zagazig. **Journal of Agricultural Research**, 47(2), 597-606. Doi: 10.21608/zjar.2020.94498.
- FALAH, F. J.; ISLAMI, H. R.; MEHRGAN, M. S. Dietary folic acid improved growth performance, immuno-physiological response and antioxidant status of fingerling *Siberian sturgeon*, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100391. 2020. Doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100391.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue. Rome. Doi: 10.4060/ca9229en.
- FERNANDES, Y; RAMPERSAD, M; GERLAI, R. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 6, p. pyu089, 2015. Doi: 10.1093/ijnp/pyu089.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; NORBERG, B.; IZQUIERDO, M.; HAMRE, K. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. **Larval fish nutrition**, p. 151-181, 2011. Doi: 10.1002/9780470959862.ch5.
- FIGUEROA, E.; FARIAS, J. G.; LEE-ESTEVEZ, M.; VALDEBENITO, I.; RISOPATRÓN, J.; MAGNOTTI, C.; OLIVEIRA, R. P. S. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 493, p. 1–8. 2018. Doi:10.1016/j.aquaculture.2018.04.

- FURUITA, H.; TANAKA, H.; YAMAMOTO, T.; SHIRAIISHI, T. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v.67, p.606–613, 2001. Doi: 10.1046/j.1444-2906.2001.00296.x.
- FURUYA, W.M. (Ed.). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM, 2010.
- GALDINO, A. M. R.; MAIOLINO, C. V.; FORGATI, M.; DONATTI, L.; MIKOS, J. D.; CARNEIRO, P. C. F.; RIOS, F. S. A. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v.18, n.2, p.131-144, 2010. Doi: 10.1017/S096719940999013X.
- GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSSO, D.M. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 349-356, 2007.
- GILBERT, S.F. Developmental Biology. 8 ed. Sinauer, 2006.
- GISBERT, E.; LUZ, R. K.; FERNÁNDEZ, I.; PRADHAN, P. K.; SALHI, M.; MOZANZADEH, M. T.; DARIAS, M. J. Development, nutrition, and rearing practices of relevant catfish species (Siluriformes) at early stages. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 1, p. 73-105, 2022. Doi: 10.1111/raq.12586.
- GOES, M. D.; GOES, E. S. R.; RIBEIRO, R. P. et al. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology** v. 3, n. 88, p. 254–263. 2017. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.029.
- GOMIERO, L.M.; SOUZA, U.P.; BRAGA, F.M.S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 127-133, 2007. Doi: 10.1590/S1676-06032007000300015.
- DONCEL, M. G.; OKIHIRO, M. S.; VILLALOBOS, S. A.; HINTON, D. E.; TARAZONA, J. V. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, n. 1, p. 39-52, 2005. Doi: 10.1111/j.1439-0426.2004.00615.x.
- GOULART, F. R.; SILVA, L. P.; LOUREIRO, B. B.; ADORIAN, T. J.; MOMBACH, P. I.; PETKOWICZ, C. L. O. Effects of dietary fibre concentrates on growth performance and digestive enzyme activities of jundiá (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 358-366, 2017. Doi: 10.1111/anu.12400.
- GRAEFF, A.; SEGALIN, C. A.; PRUNER, E. N.; AMARAL JR, H. Produção de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina** - Epagri. 2008.
- HILBIG, C. C.; NASCIMENTO, N. F. D.; CAMPOS, A. C. S.; MARTINS, L. F.; VENTURA, A. S.; NAKAGHI, L. S. O.; BOMBARDELLI, R. A. Liver histology and hematological

- parameters of female *Rhamdia quelen* fed different lipid sources. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 49, n. 1, p. 1-7. 2020. Doi: 10.37496/rbz4920180204.
- HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 41, n. 1, p. 86-93, 2017.
- IBRAHIM, W.; TOUSSON, E.; ALI, E. M. M.; MANSOUR, M. A. Folic acid alleviates oxidative stress and hyperhomocysteinemia involved in testicular dysfunction of hypothyroid rats. **General and Comparative Endocrinology**, v. 2. n. 174, p. 143–149. 2011. Doi: 10.1016/j.ygcen.2011.08.012.
- IZQUIERDO, M.S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H. F.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 25-42, 2001. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00581-6.
- JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture international**, v. 24, n. 3, p. 767-786, 2016.
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995. Doi: 10.1002/aja.1002030302.
- KOBUS, K.; NAZARI, E. A.; MÜLLER, Y. M. R. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochemistry and cell biology**, v. 132, p. 525-532, 2009. Doi: 10.1007/s00418-009-0630-0.
- KUMAR, N.; AMBASANKAR, K.; KRISHNANI, K. K.; GUPTA, S. K.; MINHAS, P. S. Dietary pyridoxine promotes growth and cellular metabolic plasticity of *Chanos chanos* fingerlings exposed to endosulfan induced stress. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 2074-2087, 2017. Doi: 10.1111/are.13042.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed**, 2014.
- LIAN, Z.; WU, Z.; GU, R.; WANG, Y.; WU, C., CHENG, Z.; et al. Evaluation of Cardiovascular Toxicity of Folic Acid and 6S-5-Methyltetrahydrofolate-Calcium in Early Embryonic Development. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 3946, 2022. Doi: 10.3390/cells11243946.
- LIEW, S. C. Folic acid and diseases – supplement it or not? **BioMed Research International**, v. 1, n. 62, p.90-100. 2016. Doi: 10.1155/2014/560183.
- LIM, C.; KLESZIUS, P.H.; WEBSTER, C.D. The role of dietary phosphorus, zinc, and selenium in fish health. **Nutrition and fish health**, n. 10, p. 201-212, 2001.
- LIMA, S. A.; PEDREIRA, A. C. O.; FREITAS, J. M. A.; DALMASO, A. C. S. et al. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. **Aquaculture**, v. 528, p. 735509. 2020. Doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735509.

- LUQUET, P.; WATANABE, T. Interaction “nutrition –reproduction” in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**. 2:121 –129. 1986.
- MA, Y.; ZHANG, C.; GAO, X. B.; LUO, H. Y.; CHEN, Y.; LI, H. H. et al. Folic acid protects against arsenic-mediated embryo toxicity by up-regulating the expression of Dvr1. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 16093, 2015. Doi: 10.1038/srep16093.
- MAIA, C. S.; JÚNIOR, J. R. A. Q.; MEDEIROS, J. P.; TENÓRI, F. D. C. Â. M.; LEMOS, A. J. J. M.; MACIEL, G. E. S.; PAZ, S.T.; SILVA AMORIM, R. V. Metabolismo do ácido fólico e suas ações na embriogênese. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 57002-57009, 2020. Doi: 10.34117/bjdv6n8-200.
- MATAVELI, M; MORAES, G.V.; JUNIOR, D.P.S.; RIBEIRO, R. P.; GASPARINO, E. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. Maringá, v.32, n.3, p.345-349, 2010. Doi: 10.4025/actascianimsci.v32i3.7836.
- MAZORRA, C.; BRUCE, M.; BELL, J. G.; DAVIE, A.; ALOREND, E. et al. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, p. 21-33, 2003. Doi: 10.1016/S0044-8486(03)00493-9.
- MIAO, S.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K. Dietary folic acid requirement of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. **Aquaculture**, v. 400, p. 73-76, 2013. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.005.
- MOMMOSEN, T.P., KORSGAARD, B. Vitellogenesis. In: ROCHA, M.J., ARUKWE, A., KAPOOR, B.G. **Fish reproduction**. Science Publishers. New Hampshire, pp. 113–170. 2008.
- NANDI, S.; CHATTOPADHYAY, D. N.; VERMA, J. P.; SARKAR, S. K.; MUKHOPADHYAY, P. K. Effect of dietary supplementation of fatty acids and vitamins on the breeding performance of the carp *Catla catla*. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 4, p. 365-375, 2001. Doi: 10.1051/rnd:2001137.
- NASCIMENTO, C. Z.; MEURER, F.; ROMAO, S. ROMAO, S., CAZAROLLI, L. H. et al. Feed for Nile tilapia broodstock and offspring supplemented with purified nucleotides boosts the juvenile’s health, growth, and the resistance face to transport and *Aeromonas hydrophila* challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 297, p. 115568, 2023.
- NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D. Importância do fotoperíodo no crescimento e na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 94-99, 2012.
- NAVARRO, R.D.; FILHO, O.P.R.; FERREIRA, W. M.; PEREIRA, F.K.S. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.20-25, 2009.

- NAYLOR, R. L., HARDY, R. W., BUSCHMANN, A. H., BUSH, S. R., CAO, L., KLINGER, D. H., TROELL, M. A 20-year retrospective review of global aquaculture. **Nature**, v. 591, n. 7851, p. 551-563, 2021. Doi: 10.1038/s41586-021-03308-6.
- NAZKI, F. H.; SAMEER, A. S; GANAIE, B. A. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 11-20, 2014. Doi: 10.1016/j.gene.2013.09.063.
- NEU, D. H.; FURUYA, W. M.; YAMASHIRO, D.; BITTENCOURT, F.; MORO, E. B.; FERNANDES, D. R. A. et al. Glycerol in the diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Rev. Agrar.** 4, 288-294. 2012.
- NEUMANN, G.; SANCHES, P.V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal reproduction science**, v. 201, p. 84-92, 2019. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.01.001.
- NRC - COMMITTEE ON NUTRIENT REQUERIMENTS OF FISH AND SHRIMP. Division On Earth and Life Studies. **Nutrient Requeriments of Fish and Shrimp**. Wahington: The National Academies Press, p. 376, 2011.
- OOSTERBAAN, A.M.; STEEGERS, E.A.P.; URSEM, N,T.C. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. **Microvascular research**, v. 83, n. 2, p. 98-104, 2012. Doi: 10.1016/j.mvr.2011.11.001.
- PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2021**. São Paulo: PEIXE BR, 2021.
- PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2023**. São Paulo: PEIXE BR, 2023.
- PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2022**. São Paulo: PEIXE BR, 2022.
- PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. et al. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 1057-1063, 2006. Doi: 10.1590/S1519-69842006000600013.
- PRADHAN, A.; OLSSON, P.E. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish. **General and comparative endocrinology**, v. 217, p. 81-91, 2015. Doi: 10.1016/j.ygcen.2015.02.002.
- ROCHA, A.; BIAZZETTI FILHO, M.; STECH, M. et al. Lettuce production in aquaponic and biofloc systems with silver catfish *Rhamdia quelen*. **Bol Inst Pesca**, v. 43, p. 64, 2017. Doi: 10.20950/1678-2305.2017.64.73.
- ROMAGOSA, E.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W.R. Nutrição e alimentação de reprodutores. In: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds), **Nutrição e alimentação de**

espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Editora Copiart, Florianópolis, Santa Catarina, p.167-179. 2013.

- ROMANOVA, E. M.; MUKHITOVA, M. E.; ROMANOV, V. V.; LYUBOMIROVA, V. N.; SPIRINA, E. V. Factors for increasing the survival rate of catfish fertilized eggs and larvae. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019. p. 012197. **Doi:** 10.1088/1755-1315/341/1/012197.
- ROQUES, S.; DEBORDE, C.; RICHARD, N. et al. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 261-282, 2020. **Doi:** 10.1111/raq.12316.
- SALARKIA, E.; SEPEHRI, G.; TORABZADEH, P.; ABSHENAS, J.; SABERI, A. Effects of administration of co-trimoxazole and folic acid on sperm quality and histological changes of testes in male rats. **International Journal of Reproductive Biomedicine**. v. 15, n. 10, p. 625-634. 2017.
- SANTOS, H. K.; MEURER, F. Nutrition and feeding aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*) *Rhamdia quelen* nutrition and feeding. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 299-309, 2020. **Doi:** 10.1111/raq.12318.
- SARMAH, S.; MARRS, J. A. Complex cardiac defects after ethanol exposure during discrete cardiogenic events in zebrafish: prevention with folic acid. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 10, p. 1184-1201, 2013. **Doi:** 10.1002/dvdy.24015.
- SCHULTER, E. P.; FILHO; J. E. R. V. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Inst. **Pesqui. Econômica Apl.** – IPEA. 42. 2017.
- SESAY, D. F.; TSION, H. M.; ZHOU, Q.; REN, M.; XIE, J.; et al. Effects of dietary folic acid on the growth, digestive enzyme activity, immune response and antioxidant enzyme activity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerling. **Aquaculture**, v. 452, p. 142–150. 2016. **Doi:** 10.1016/j.aquaculture.2015.10.026.
- SHI, H.; LEONHARD, W. N., SIJBRANDI, N. J., VAN STEENBERGEN, M. J., FENS, M. H., VAN DE DIKKENBERG, J. B., ... KOK, R. J. Folate-dactolisib conjugates for targeting tubular cells in polycystic kidneys. **Journal of Controlled Release**, v. 293, p. 113-125, 2019. **Doi:** 10.1016/j.jconrel.2018.11.019.
- SINGH, S. K.; BAIDYA, S.; DAS, P.; BISWAS, P. Functional role of dietary supplements on reproductive physiology of fishes. **Recent updates in molecular Endocrinology and Reproductive Physiology of Fish: An Imperative step in Aquaculture**, p.243-258, 2021.
- SLUNGAARD, ROLV K.; HIGGINS, GEORGE M. Experimental megaloblastic anemia in young guinea pigs. **Blood**, v. 11, n. 2, p. 123-142, 1956. **Doi:** 10.1182/blood.V11.2.123.123.
- SUÁREZ-OBANDO, F.; ORDÓÑEZ-VÁSQUEZ, A.; ZARANTE, I. Defectos del tubo neural y ácido fólico: patogenia, metabolismo y desarrollo embriológico: Revisión de la literatura. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 61, n. 1, p. 49-60, 2010.

- SULLIVAN, C. V.; YILMAZ, O. Vitellogenesis and yolk proteins, fish. **Encyclopedia of reproduction**, v. 6, p. 266-277, 2018. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20567-0.
- SUNDE, M. L.; CRAVENS, W. W.; ELVEHJEM, C. A.; HALPIN, J. G. The effect of folic acid on embryonic development of the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 29, n. 5, p. 696-702, 1950. Doi: 10.3382/ps.0290696.
- TESSARO, L.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G. et al. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1425–1433. 2014. Doi: 10.1111/are.12087.
- VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI S.U.; PILARSKI F. South American fish for continental aquaculture. **Rev Aquacult** 2018; v.10, n.2, p.351-369. Doi:10.1111/raq.12164.
- VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: ácido fólico. **Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**, v. 10, n. 3, p. 7-7, 2010.
- VOLKOFF, H. Nutrition and reproduction in fish. **Encyclopedia of reproduction**, v. 9, p. 743-748, 2018.
- WATANABE, T., ITOH, A., MURAKAMI, A., TSUKASHIMA, Y., KITAJIMA, C., FUJITA, S. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red seabream broodstocks and eggs produced. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. 50:503–515. 1984.
- WATANABE, T.; VASSALLO-AGIUS, R. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, p. 35-61, 2003.
- WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K. et al. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, n.3, p.465–498, 2002.
- WU, G. Nutrition and metabolism: Foundations for animal growth, development, reproduction, and health. **Recent advances in animal nutrition and metabolism**, p. 1-24, 2022.
- YUE, C.; JI, C.; ZHANG, H.; ZHANG, L. W.; TONG, J.; JIANG, Y.; CHEN, T. Protective effects of folic acid on PM_{2.5}-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 10, p. 2316-2322, 2017. Doi: 10.1002/tox.22448.
- ZEHRA, S.; KHAN, M. A. Dietary folic acid requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, protein productive value and liver folic acid concentrations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 262, p. 114397, 2020. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114397.

3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Rhamdia quelen* PROVENIENTE DE FÊMEAS ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM ÁCIDO FÓLICO

RESUMO: A suplementação nutricional de matrizes pode proporcionar uma melhora na qualidade dos alevinos visto que, um vitelo mais nutritivo promove o melhor desenvolvimento de embriões e larvas. Estudos confirmam que o ácido fólico influencia a formação do DNA, órgãos, tecidos vitais, eritropoiese, síntese proteica e evita anomalias embrionárias. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos do ácido fólico no desenvolvimento ontogênico de embriões provenientes de fêmeas de *Rhamdia quelen* alimentadas com rações suplementadas com níveis crescentes de ácido fólico. Foram alojados 540 alevinos de jundiá ($3,71 \pm 0,01$ g) em 18 gaiolas de 4x2x1m com malha de 15mm, em dois viveiros escavados revestidos em alvenaria e fundo de terra. As rações foram suplementadas com seis níveis de ácido fólico: 0,00; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00 e 3,75 mg, as quais, eram isoproteicas (31% PD) e isoenergéticas (3.100 kcal/kg de ED). Na primavera, as 270 fêmeas ($155,70 \pm 1,97$ g) foram alojadas nas gaiolas e alimentadas duas vezes ao dia conforme os tratamentos. Ao atingirem a maturidade sexual, 5 fêmeas de cada gaiola foram submetidas à reprodução artificial com extrato de hipófise de carpa para coleta e fertilização dos ovócitos. Um pool de 5ml dos ovócitos das fêmeas de cada tratamento foi fertilizado com 100.000 espermatozoides móveis/ovócito. Os ovos foram ativados em recipientes de 2000ml com adição de 200ml de água e liberados em incubadoras cônicas de 60 litros. Amostras de ovos foram coletadas em horários específicos durante 36 horas pós-fertilização com uso de pipeta de 10ml e armazenadas em fracos de 10ml com formalina 4% tamponada com carbonato de cálcio. Os dados passaram por Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias de Duncan para comparações. A prole das fêmeas que foram alimentadas com 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentou uma aceleração nas fases de neurula e farínghula e maior taxa de normalidade. O ácido fólico colaborou positivamente com o desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen*, sugerindo a recomendação da suplementação da dose de 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} para matrizes.

Palavras-chave: bagre, 5-metiltetrahidrofolato, folato, ontogenia, vitamina

EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *Rhamdia quelen* FROM FEMALES FED DIETS SUPPLEMENTED WITH FOLIC ACID

ABSTRACT: Nutritional supplementation of broodstock can lead to an improvement in quality of fry, since a more nutritious yolk promotes better embryo and larval development. Studies confirm that folic acid influences DNA formation, organ development, vital tissue growth, erythropoiesis, protein synthesis, and prevents embryonic anomalies. This study aimed to assess the effects of folic acid on the ontogenic development of embryos from *Rhamdia quelen* females fed diets supplemented with increasing levels of folic acid. A total of 540 jundiá fry (3.71 ± 0.01 g) were housed in 18 cages measuring 4x2x1m with a 15mm mesh size, placed in two masonry-lined and earthen-bottomed dug ponds. The diets were supplemented with six levels of folic acid: 0.00; 0.75; 1.50; 2.25; 3.00; and 3.75 mg, which were isoproteic (31% CP) and isoenergetic (3,100 kcal/kg DE). In the spring, 270 females (155.70 ± 1.97 g) were placed in the cages and fed twice daily according to the treatments. Upon reaching sexual maturity, 5 females from each cage were subjected to artificial reproduction using carp pituitary extract for oocyte collection and fertilization. A pool of 5ml of oocytes from females in each treatment was fertilized with 100,000 motile sperm/oocyte. The eggs were activated in 2,000ml containers with the addition of 200ml of water and released into 60-liter conical incubators. Egg samples were collected at specific times during the 36 hours post-fertilization using a 10ml pipette and stored in 10ml vials containing 4% formalin buffered with calcium carbonate. The data underwent Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan's test for comparisons. The offspring of females fed with 3.00 mg of folic acid kg⁻¹ exhibited an acceleration in the neurula and pharyngula phases and a higher rate of normality. Folic acid positively contributed to the embryonic development of *Rhamdia quelen*, suggesting the recommendation of supplementing with a dose of 3.00 mg of folic acid kg⁻¹ for broodstock.

Keywords: catfish, 5-methyltetrahydrofolate, folate, ontogeny, vitamin

3.1 Introdução

O avanço da aquicultura mundial ultrapassa as demais criações e segue de maneira crescente (FAO, 2022). Porém, a intensificação da produção aquícola tem levado à necessidade de gerar proles de alta qualidade e em quantidade, que se tornarão animais viáveis, capazes de crescer de maneira otimizada e de enfrentar os desafios do sistema de produção (Barroso et al., 2018). A programação nutricional para peixes surge como uma ferramenta atrativa para assegurar a produção de uma prole vigorosa (Bombardelli et al., 2023).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa que se destaca por sua boa adaptação a diferentes ambientes, rusticidade, precocidade e boa produção, mesmo em períodos frios (Baldisserotto et al., 2020; Santos; Meurer, 2020). Essa espécie alcança a maturidade sexual no primeiro ano de vida e a reprodução artificial é facilitada (Adames et al., 2015), além de apresentar boa taxa de fecundidade e fertilidade (Baldisserotto et al., 2020; Bombardelli, et al., 2021), características favoráveis a pesquisa e produção.

A nutrição de reprodutores é uma das áreas que mais carece de estudos aprofundados (Schulter; Vieira Filho, 2017). Nesse contexto, reprodutores e matrizes são animais de alto desempenho, com necessidades nutricionais mais específicas e elevadas (Wu, 2022). Por conta disso, esses demandam uma abordagem nutricional diferenciada em relação às outras categorias para garantir um desempenho reprodutivo adequado (Bombardelli et al., 2017).

Para atender as carências nutricionais e visando aprimorar as dietas fornecidas, o uso de vitaminas tem sido amplamente utilizado (Alonge et al., 2019; Anagha et al., 2021). As vitaminas tendem a melhorar a nutrição, a saúde e, conseqüentemente, o desempenho dos reprodutores (Romanova et al., 2019). Elas têm um papel fundamental no funcionamento metabólico adequado, participando de processos cruciais para o organismo (Romagosa et al., 2013), mas são produzidas em quantidades insuficientes pelo organismo, sendo necessário o fornecimento por fontes externas, como a alimentação (Lehninger et al., 2014; Liew et al., 2016).

O ácido fólico (vitamina B₉, folato ou AF) destaca-se entre as vitaminas hidrossolúveis por sua participação na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), também colaborando na eritropoiese (Vannuchi; Monteiro, 2010). Esse atua no fortalecimento da imunidade (Falah, 2020), contribui no fechamento do tubo neural de fetos (Maia et al., 2020), e reduz as más formações embrionárias (Ma et al., 2015). Com isso, o ácido fólico é uma vitamina promissora para a saúde, crescimento e desenvolvimento dos peixes (Shi et al., 2019; Cadena et al., 2020; Badran; Ali, 2021).

Estudos investigaram os efeitos do ácido fólico na embriologia de peixes (Yue et al., 2017; Cadena et al., 2020), utilizando o *Danio rerio* como modelo biológico. e concluíram que a exposição ao ácido fólico colaborou com o desenvolvimento embrionário dessa espécie. Além disso, o ácido fólico foi testado para outras espécies de vertebrados (Oosterbaan et al., 2012), apresentando efeitos positivos, principalmente, na circulação sanguínea e na prevenção de cardiopatias (Maia et al., 2020). Apesar dos efeitos positivos do ácido fólico para a saúde dos animais, ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos do ácido fólico na nutrição dos reprodutores e matrizes, e, conseqüentemente, no desenvolvimento embrionário.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar os impactos do ácido fólico no desenvolvimento ontogênico de embriões provenientes de fêmeas de *Rhamdia quelen* alimentadas com ácido fólico.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Local e período de experimentação

O experimento foi realizado entre os meses de abril de 2021 a janeiro de 2022, no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental – INPAA, onde é localizada a estrutura do Laboratório de Tecnologia em Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC). Esse é vinculado à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Toledo, Paraná, Brasil (24°46'48.31"S; 53°43'25.77"W). Todos os procedimentos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - CEUA/Unioeste (07/2022).

O experimento foi dividido em dois momentos, e totalizou 300 dias. O primeiro ocorreu de abril/21 a janeiro/22. Nele os jundiás (*Rhamdia quelen*) foram mantidos em gaiolas instaladas em viveiros escavados, e receberam alimentação com rações com níveis crescentes de ácido fólico. O segundo momento teve início em janeiro de 2022, quando as matrizes foram submetidas a reprodução artificial, e os ovos foram incubados para coleta.

3.2.2 Rações e manejo alimentar

As rações foram formuladas usando o programa Super Crac 6.4[®], considerando a composição nutricional dos alimentos disponíveis e os valores de digestibilidade do *R. quelen* (Oliveira Filho e Fracalossi, 2006; Meurer et al., 2012; Santos e Meurer, 2020). O ácido fólico foi fornecido pela Salus[®] - Nutrição Animal. Durante o preparo das rações experimentais, o ácido fólico foi corrigido pela pureza de 97% e pelo acréscimo de 10% para compensar perdas de eficiência durante a extrusão e a secagem em 100 – 110°C (Coelho, 2002). As rações foram isoproteicas com 31% de proteína digestível (PD) e isoenergéticas com 3.100 kcal/kg de energia digestível (ED).

Os ingredientes foram moídos em moinho martelo (Vieira[®]) com peneira de 0,5 mm (Meurer et al., 2005), pesados e misturados por 20 minutos em misturador helicoidal. O ácido fólico foi adicionado aos demais ingredientes e misturado manualmente, passando por uma peneira de 5,0mm, sendo o processo repetindo cinco vezes. As rações foram processadas para a extrusora (E-62, Ferraz[®]) para formar pellets de 3 e 5 mm (Meurer et al., 2005; Bombardelli et al., 2021). Após a extrusão, os pellets eram levados através de um transportador pneumático

para um tambor rotativo para secagem da ração, depois ensacados, identificados (conforme tratamento e granulometria) e armazenados para uso. Entre cada tratamento, todas as máquinas e materiais foram lavados antes de ser colocada a próxima mistura.

Os animais receberam ração de 3mm *ad libitum* 3x ao dia (8h, 12h e 17h) até o momento da classificação por gênero. Depois, as fêmeas receberam ração de 5mm *ad libitum* 2x ao dia (09h e 16h) até a reprodução (Bombardelli et al., 2021). A tabela 1 apresenta a formulação da dieta e os teores nutricionais das seis rações utilizadas.

Tabela 1. Composição dos alimentos (g kg^{-1}) e teores de nutrientes das rações experimentais para os diferentes níveis de inclusão de ácido fólico, utilizados na alimentação de fêmeas de jundiá.

Ingredientes	Níveis de ácido fólico (mg kg^{-1})					
	0,0	0,75	1,5	2,25	3,0	3,75
Milho moído (g kg^{-1})	270,00	270,00	270,00	270,00	270,00	270,00
Farelo de soja (g kg^{-1})	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00
Farinha de vísceras (g kg^{-1})	235,60	235,60	235,60	235,60	235,60	235,60
Farelo de trigo (g kg^{-1})	119,30	119,30	119,30	119,30	119,30	119,30
Farinha de salmão (g kg^{-1})	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
Óleo de soja (g kg^{-1})	37,00	37,00	37,00	37,00	37,00	37,00
Sup. Vit/Min ¹ (g kg^{-1})	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal (g kg^{-1})	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
BHT (g kg^{-1})	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido Fólico ² (mg kg^{-1})	0,00	0,83	1,66	2,50	3,33	4,16
Composição química calculada						
Ácido Araquidônico (g kg^{-1})	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Ácido Linoleico (g kg^{-1})	40,40	40,40	40,40	40,40	40,40	40,40
Ácido Linolênico (g kg^{-1})	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Amido (g kg^{-1})	289,00	289,00	289,00	289,00	289,00	289,00
Cálcio (g kg^{-1})	18,70	18,70	18,70	18,70	18,70	18,70
Fósforo total (g kg^{-1})	12,10	12,10	12,10	12,10	12,10	12,10
Proteína Bruta (g kg^{-1})	347,50	347,50	347,50	347,50	347,50	347,50
Proteína Digestível (g kg^{-1})	310,00	310,00	310,00	310,00	310,00	310,00
Energia Bruta (MJ kg^{-1})	17,29	17,29	17,29	17,29	17,29	17,29
Energia Digestível (MJ kg^{-1})	12,98	12,98	12,98	12,98	12,98	12,98
Matéria Mineral (g kg^{-1})	78,50	78,50	78,50	78,50	78,50	78,50
Fibra Bruta (g kg^{-1})	21,80	21,80	21,80	21,80	21,80	21,80

¹Suplemento vitamínico e mineral (mínimo kg^{-1}): Vitamina A: 2.000.000UI kg^{-1} , vitamina D3: 640.000UI kg^{-1} , vitamina E: 2.400UI kg^{-1} , vitamina K3: 688mg kg^{-1} , vitamina B1: 400mg kg^{-1} , vitamina B2: 1.000mg kg^{-1} , vitamina B6: 1.200mg kg^{-1} , vitamina B9: 0 (zero); vitamina B12: 4.000mcg kg^{-1} , niacina: 9.000mg kg^{-1} , ácido pantotênico: 3.000mg kg^{-1} , biotina: 35mg kg^{-1} , manganês: 14g kg^{-1} , zinco: 11g kg^{-1} , ferro: 10g kg^{-1} , cobre: 2.000mg kg^{-1} , iodo:

200mg kg⁻¹, cobalto: 40mg kg⁻¹, selênio: 40mg kg⁻¹, hidroxitolueno butilado (B.H.T.): 300mg kg⁻¹. ²Acréscimo de 10% pela perda durante a extrusão e secagem em 100-110°C. Fonte: autora.

3.2.3 Delineamento experimental

Foram utilizados 540 alevinos de jundiá (3,71±0,01g), alojados em 18 gaiolas (n=30 peixes/gaiola) com dimensões de 4x2x1m, com malha de 15mm, instaladas em dois viveiros escavados revestidos em alvenaria (200m²) e com fundo de terra. Os peixes foram alimentados com dietas contendo níveis crescentes de inclusão de ácido fólico: 0,00 mg kg⁻¹ (T1), 0,75 mg kg⁻¹ (T2), 1,50 mg kg⁻¹ (T3), 2,25 mg kg⁻¹ (T4), 3,00 mg kg⁻¹ (T5) e 3,75 mg kg⁻¹ (T6).

No mês de outubro, os peixes foram classificados entre machos e fêmeas. As 270 fêmeas (155,70±1,97 g) classificadas foram alojadas entre as 18 gaiolas, totalizando n=15 fêmeas/gaiola, onde permaneceram sendo alimentadas 2x ao dia com os respectivos tratamentos, até alcançarem a maturidade sexual e estarem aptas a reproduzir.

Os seis tratamentos foram distribuídos entre as gaiolas para formar três repetições. O delineamento entre os seis tratamentos foi inteiramente casualizado, e os animais foram mantidos em temperatura e fotoperíodo naturais, com abastecimento apenas para compensar as perdas de água por evaporação e infiltração.

3.2.4 Qualidade da água

As fêmeas foram mantidas em condições naturais de fotoperíodo e temperatura (mínima: 19,69 ± 0,21°C e máxima: 22,80 ± 0,22°C; Incoterm[®] ± 0,1°C). No período reprodutivo, a temperatura da água foi de: mínima 24,46 ± 0,17°C e máxima 26,43 ± 0,19°C. O oxigênio (5,19 ± 0,2 mg. L⁻¹; Oxímetro YSI[®] 550A), pH (7,14 ± 0,14; pHmeter Tecnal[®] Tec5), amônia total (0,08 ± 0,02 mg. L⁻¹; Fotocolorímetro AlfaKit[®] AT100 PBII) e nitrito total (0,07 ± 0,02 mg. L⁻¹; Fotocolorímetro AlfaKit[®] AT100 PBII). A temperatura foi aferida diariamente, e os demais parâmetros foram mensurados a cada 15 dias, sempre às 06:00 horas (Bombardelli et al., 2021). Todos os parâmetros de qualidade de água analisados estavam dentro do ideal descrito para a espécie de acordo com Baldisserotto et al. (2020).

3.2.5 Manejo reprodutivo

Em janeiro de 2022, as fêmeas apresentavam abdômen abaulado e papilas urogenitais avermelhadas (Bombardelli et al., 2006), indicando que estavam aptas a se reproduzir (Hilbig et al., 2020). Cinco fêmeas ($440,59 \pm 9,18\text{g}$) de cada gaiola foram selecionadas ao acaso, pesadas, marcadas e alojadas de acordo com o tratamento em caixas d'água de 500 litros com sistema de recirculação de água, aquecimento ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), filtro mecânico e biológico, esterilização ultravioleta e oxigenação. Para a reprodução artificial, as fêmeas foram submetidas ao processo de indução hormonal através da aplicação de extrato de hipófise de carpa (CPE) via intramuscular (Woyнарovich e Horváth, 1983), sendo a primeira dose de $0,5\text{mg}$ de CPE /kg e a segunda dose de 5mg de CPE/kg, aplicada 12 horas após a primeira. O processo de indução hormonal foi de acordo com o descrito por Bombardelli et al. (2006).

Após 10 horas (água a 24°C) contadas a partir da aplicação da segunda dose hormonal (Sanches et al., 2011), realizou-se o processo de extrusão dos ovócitos. Nesse, as fêmeas foram contidas, a papila urogenital foi seca com papel toalha para evitar a abertura da micrópila, então, receberam uma massagem abdominal sentido cefalocaudal para liberação dos ovócitos em um recipiente de 200 mL totalmente seco (Witeck et al., 2011).

Foram selecionados 79 machos ($173,41 \pm 0,3\text{g}$) não tratados (alimentados com ração comercial) de um estoque já existente para indução hormonal e posterior fertilização dos ovos. Esses animais receberam uma dose única de $3,0\text{mg}$ de CPE. kg^{-1} na região dorsal (Bombardelli et al., 2006), de forma sincronizada com as fêmeas (Pedreira et al., 2022). O sêmen foi coletado de forma individual em tubos graduados ($\pm 0,2\text{mL}$), e a primeira gota foi descartada para evitar a contaminação por fezes, urina e possível ativação espermática (Bombardelli et al., 2006; Goes et al., 2017; Pedreira et al., 2022).

Os parâmetros de motilidade e concentração espermática foram avaliados de forma subjetiva (Rurangwa et al., 2004). Foram utilizadas amostras de sêmen de três machos para compor um pool para fertilização das fêmeas de cada gaiola. Para compor o pool, foram selecionados os sêmens que possuíam as maiores motilidades ($71,42 \pm 4,91\%$) e concentrações espermáticas ($2,05 \pm 0,17 \times 10^9$). Após a desova e coleta dos gametas, os peixes voltaram para suas respectivas gaiolas e viveiros.

Um pool de 5ml de ovócitos, das 5 fêmeas de cada tratamento, foi fertilizado com uma dose inseminante de 100.000 espermatozoides móveis por ovócitos (Bombardelli et al., 2006). Depois, aos poucos, foi adicionada água do sistema de recirculação das incubadoras para a hidratação dos ovos e ativação dos gametas.

3.2.6 Incubação dos ovos e amostragem

Os ovos foram ativados em recipientes de 2000ml, com adição de 200ml de água. Os recipientes foram movimentados vagarosamente em sentido horário durante um minuto, para correta hidratação e potencialização da fertilização. Realizaram-se duas trocas de água durante o período. Logo, foram colocados em incubadoras cônicas com capacidade de 60 litros, instaladas em um sistema de recirculação de água com esterilização ultravioleta. Foi mantida oxigenação constante, com temperatura de incubação de $25,56 \pm 0,36^{\circ}\text{C}$ (Incoterm®), estando dentro do recomendado por Baldisserotto et al. (2020).

Cada incubadora foi considerada uma unidade experimental. As amostras dos ovos foram coletadas durante 36 horas pós fertilização (HPF), divididas da seguinte forma: no momento em que os ovos passavam do recipiente para a incubadora, coletava-se o instante 0; depois, eram feitas coletas a cada 10 minutos, até a hora 5 pós fertilização; em seguida, as coletas eram feitas a cada 15 minutos, até a 9 HPF, e a cada 30 minutos, até 24 HPF, sendo a última coleta com 36 HPF. As repetições foram realizadas após 12 horas da última coleta, esse intervalo foi utilizado para higienização do sistema e indução hormonal das fêmeas seguintes.

As amostras de ovos e larvas foram cuidadosamente coletadas com uma pipeta graduada de 10 mL, colocados em uma peneira e passados para frascos de 10 mL com formalina 4% tamponada com carbonato de cálcio ($\text{pH} = 7,0$). Todos os frascos estavam devidamente separados por tratamento e repetição, identificados com o número da unidade experimental e da coleta.

3.2.7 Desenvolvimento embrionário e larval

Para análise do desenvolvimento embrionário e larval, foi utilizado um microscópio Olympus CX23® em aumento de 40x, com câmera digital acoplada Olympus SC30®, e as fotos foram tiradas pelo software cellSens®. Foram avaliados 20 ovos por análise, totalizando, aproximadamente, 28.080 ovos avaliados entre as 18 incubadoras. A determinação dos estágios de desenvolvimento foi realizada de acordo com Galdino et al. (2010). As anormalidades embrionárias que não foram identificadas de acordo com a literatura, foram registradas para posterior análise.

Os ovos foram retirados do frasco com uma pipeta de *pasteur*, colocados em uma lâmina de vidro para microscopia, contados e avaliados. A avaliação era feita de acordo com o estágio de desenvolvimento de cada ovo presente na lâmina. O desenvolvimento foi dividido em fases, são elas: zigoto, blástula, epibolia, neurula, segmentação, faringula e eclosão. As larvas não foram subdivididas, mas foram igualmente avaliadas do momento da eclosão até as 36 HPF.

3.2.8 Anormalidades embrionárias e larvais

Durante as análises do desenvolvimento embrionário, foram identificadas anomalias não previamente descritas na literatura, além daquelas já descritas por outros pesquisadores. Os embriões que apresentavam tais anomalias foram categorizados entre: anormalidades indeterminadas, blastoderme deformada, desvio da notocorda, má formação caudal, saco vitelínico deformado e edema cardíaco.

Como ‘anormalidades indeterminadas’, incluem-se os que apresentaram mais de uma das anomalias descritas a seguir, ou cuja deformação não pôde ser determinada. A ‘blastoderme deformada’ refere-se à heterogeneidade na distribuição e formato das células do tecido, perdendo a uniformidade celular e apresentando conformações atípicas no arranjo. ‘Desvio de notocorda’ caracteriza-se pelo formato de arco na notocorda do embrião/larva, quando o correto seria um formato retilíneo. Tal desvio faz com que o espécime apresente curvatura acentuada em seu eixo longitudinal. A ‘má formação caudal’, por sua vez, define-se como qualquer desvio de forma da cauda, como curvaturas e dobramentos do tecido. Como ‘saco vitelínico deformado’ classificou-se os embriões/larvas cujos sacos vitelínicos apresentam formato elíptico, achatado ou com deformação côncava. Como ‘edema cardíaco’, entende-se a presença de espaço excessivo na cavidade cardíaca.

Todas as anormalidades encontradas foram fotografadas e contabilizadas para posterior análise descritiva.

3.2.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) *main effects* e ao teste de médias de Duncan para

comparações múltiplas. Foi utilizado o software Statistica 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) para as análises, e os valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

3.3 Resultados

A alimentação das matrizes de jundiá com níveis crescentes de ácido fólico apresentou resultados positivos sobre o desenvolvimento da prole. No geral, a inclusão de 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} na alimentação das fêmeas melhorou o desenvolvimento embrionário e larval, e o tempo afetou o desenvolvimento de todos os ovos de forma inversamente proporcional.

As fêmeas alimentadas com 3,00 mg kg^{-1} produziram a maior ($p < 0,05$) quantidade de embriões e larvas normais, e a maior porcentagem de neurulas e faringulas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os embriões e larvas das fêmeas que receberam as demais alimentações. Os resultados referentes aos seis níveis de inclusão e às diferentes fases de desenvolvimento estão apresentados na Tabela 3.

O tempo afetou o desenvolvimento dos embriões de forma negativa até às 3:10 HPF (Figura 3). Decorrido este tempo, a normalidade se manteve estável.

Tabela 3. Parâmetros do desenvolvimento embrionário avaliados na prole de matrizes *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

	Níveis de inclusão de ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-value	
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	Trat	Trat X tempo
Normalidade	39,16±3,2 ^c	45,55±7,35 ^b	42,68±3,81 ^b	42,24±4,17 ^{bc}	50,34±1,49 ^a	42,27±3,34 ^{bc}	0,000	0,000
Zigoto	64,62±1,72	59,97±5,17	62,97±7,12	65,04±4,30	59,97±5,82	64,72±4,51	0,963	0,000
Blástula	50,09±4,44	41,99±9,72	48,14±1,61	54,27±4,94	53,84±3,61	56,61±1,87	0,065	0,000
Neurula	19,31±4,62 ^b	16,63±1,74 ^b	19,48±1,71 ^b	17,36±2,16 ^b	26,82±2,07 ^a	20,68±3,47 ^b	0,028	0,000
Faringula	30,42±8,30 ^{bc}	24,80±1,87 ^c	30,04±4,85 ^c	33,98±1,73 ^{ab}	37,76±4,21 ^a	37,49±2,86 ^a	0,000	0,000
Larva	32,65±5,02	29,81±3,23	31,17±4,20	50,84±6,45	33,42±8,04	39,74±6,71	0,496	0,000

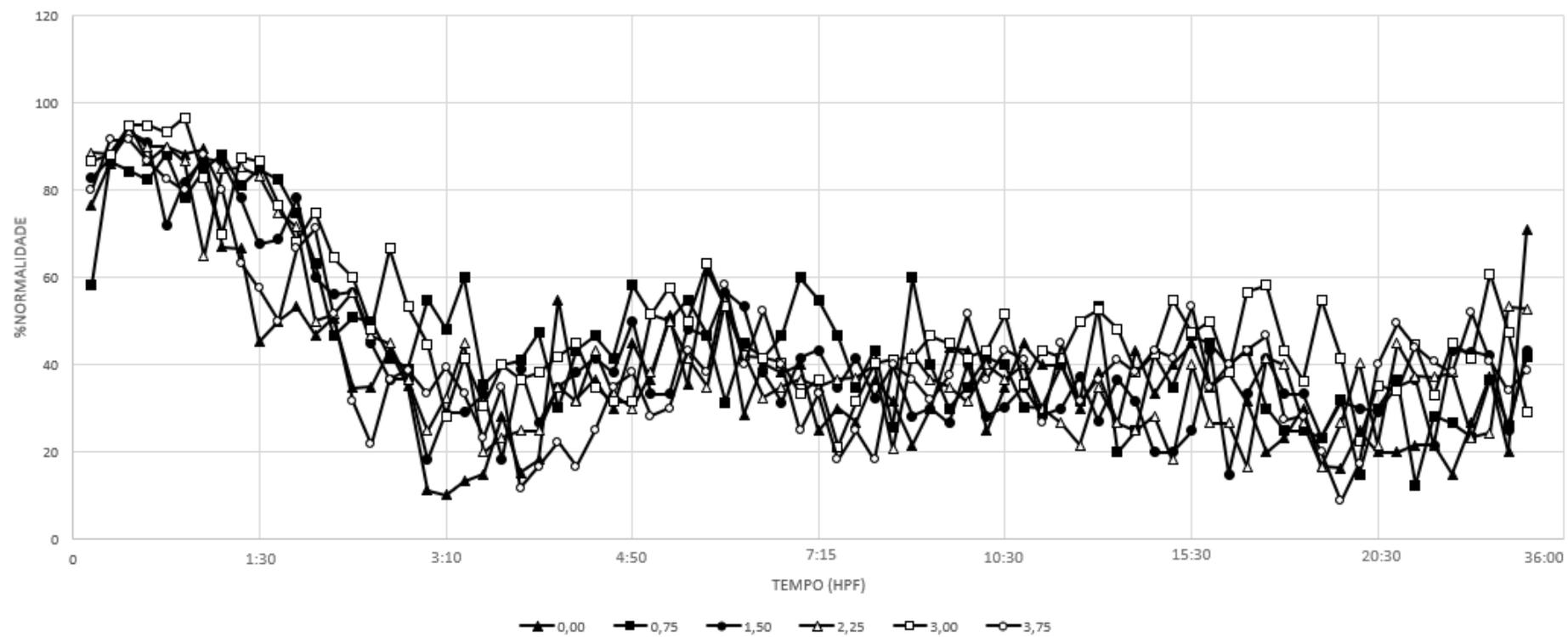


Figura 3. Normalidade do desenvolvimento embrionário avaliada na prole de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

A figura 4 ilustra a variação do percentual de zigotos ao longo da fase (0 minutos a 1:40 HPF). Não houve diferença significativa entre as proles das fêmeas suplementadas, mas houve efeito inversamente proporcional do tempo nos embriões.

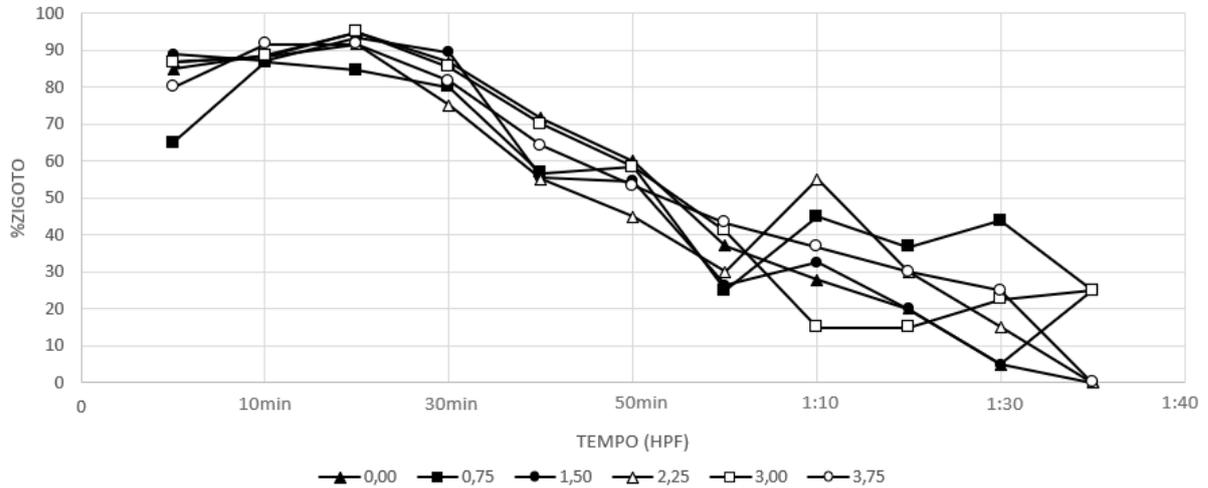


Figura 4. Porcentagem de zigotos durante as primeiras horas do desenvolvimento embrionário da prole proveniente de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

Com exceção dos embriões das fêmeas que receberam 3,00 mg kg⁻¹, todos os embriões provenientes das demais fêmeas apresentaram uma aceleração na fase de zigoto.

A fase de blástula teve duração total de 3 horas e 10 minutos (1:10 até 4:20 HPF). Os embriões das fêmeas alimentadas com 3,00 mg kg⁻¹ (Figura 5) foram os que tiveram o desenvolvimento mais acelerado, começando às 1:20 HPF e terminando 3:20 HPF.

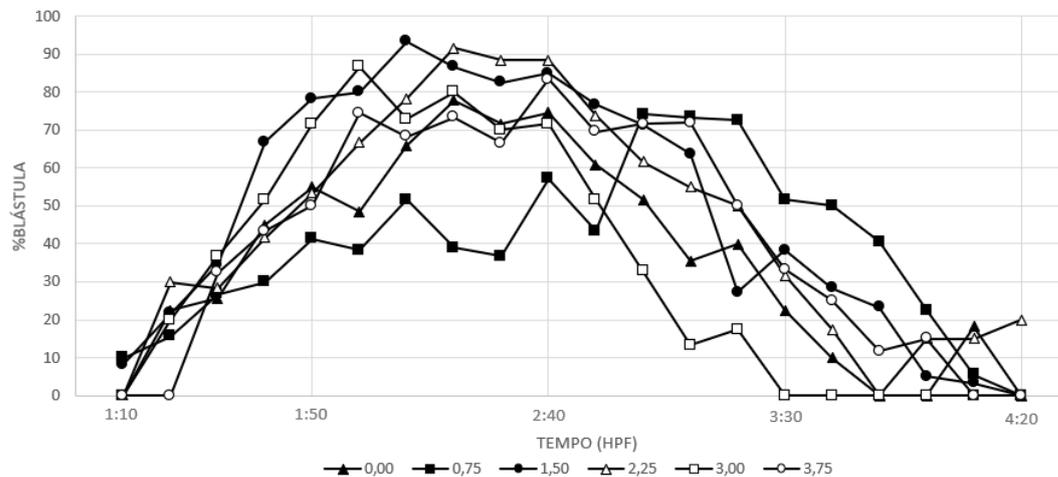


Figura 5. Porcentagem de blástulas durante o desenvolvimento embrionário avaliado na prole proveniente de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

Os embriões advindos das fêmeas alimentadas com 3,00 e 3,75 mg ácido fólico kg^{-1} foram os que tiveram o estágio de neurula mais acelerado, durando das 6:15 HPF até 11:30 HPF.

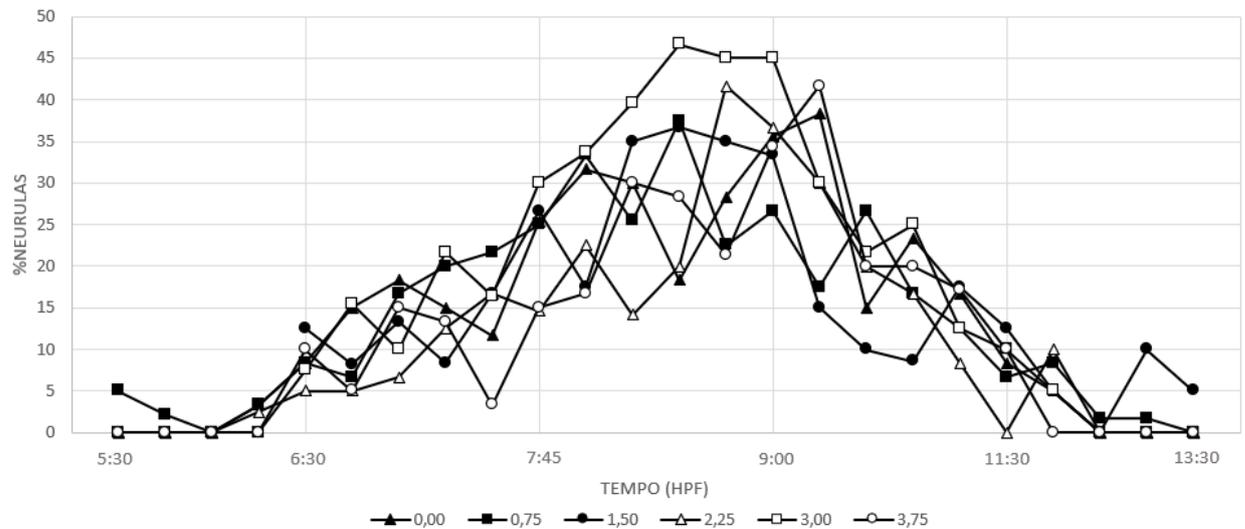


Figura 6. Porcentagem de neurulas durante o desenvolvimento embrionário avaliado na prole provinda de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

Na fase de faringula (Figura 7), os embriões das fêmeas alimentadas com 2,25, 3,00 e 3,75 mg kg^{-1} tiveram diferença significativa em relação aos demais embriões, e foram as que produziram ovos com o desenvolvimento mais acelerado. A fase teve duração de pouco mais de 10 horas.

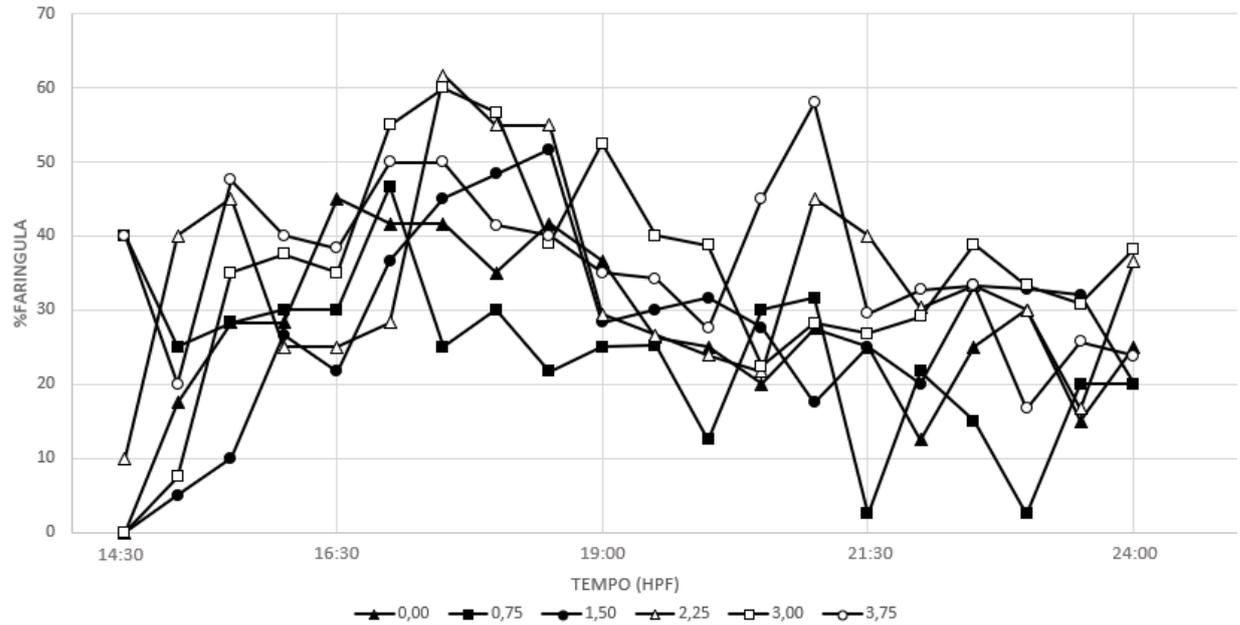


Figura 7. Porcentagem de faringulas durante o desenvolvimento embrionário avaliado na prole de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

Em relação ao desenvolvimento larval, não houve diferença significativa entre os indivíduos provenientes das fêmeas alimentadas com os diferentes níveis (Figura 8).

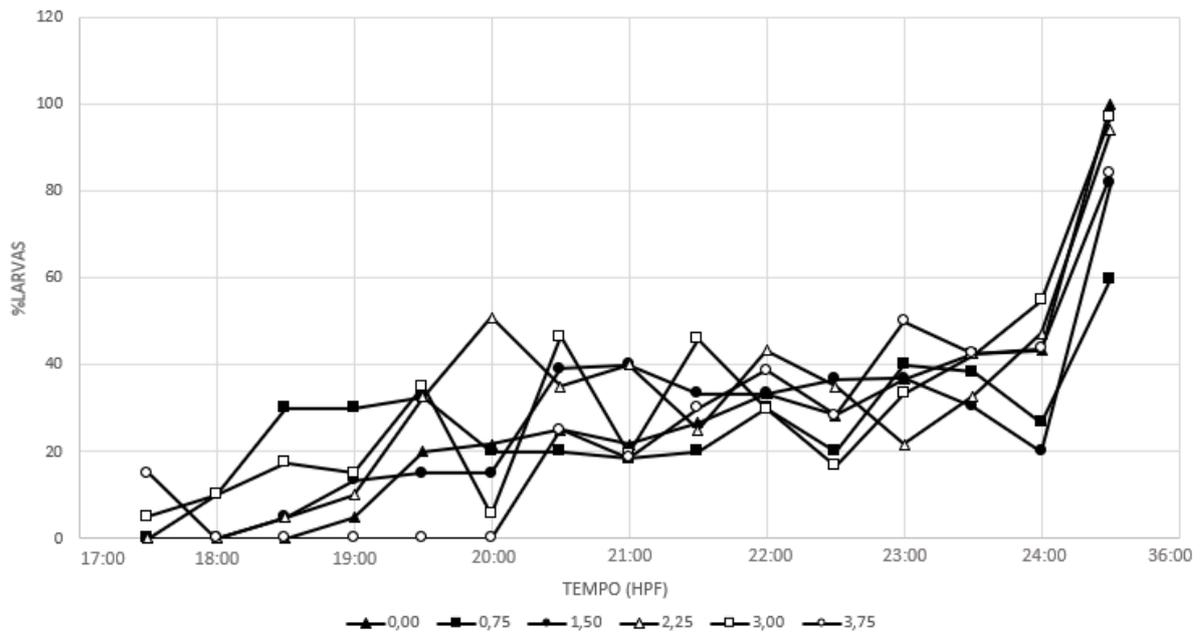


Figura 8. Porcentagem de larvas provenientes de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

A figura 9 apresenta de forma geral os resultados encontrados.

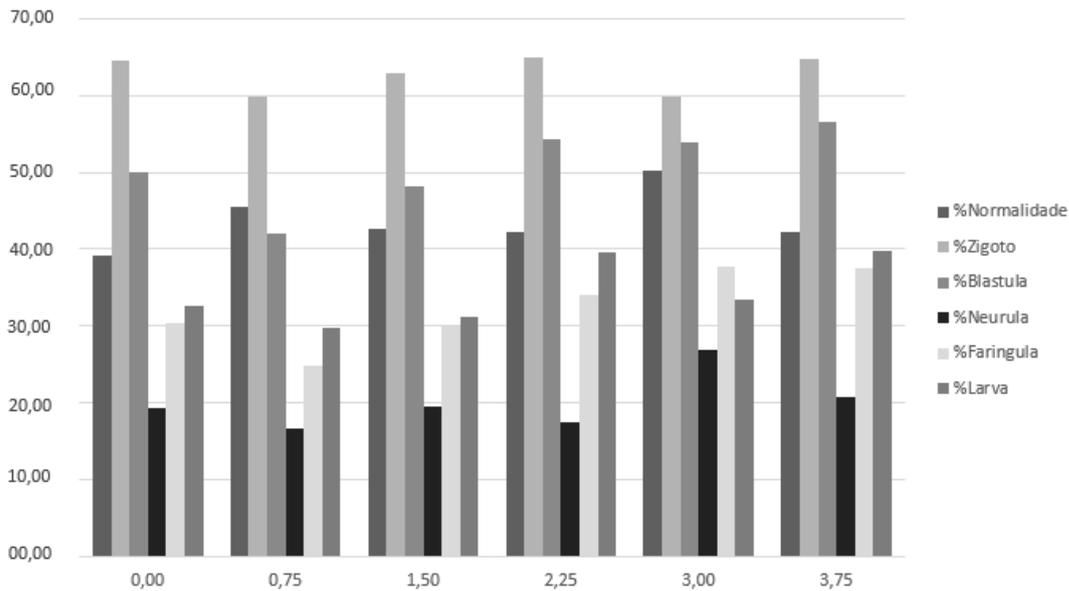


Figura 9. Resultados em porcentagem das diferentes variáveis avaliadas na prole proveniente de matrizes de *R. quelen* alimentadas com seis níveis de inclusão de ácido fólico.

Os resultados referentes as categorias de anormalidade estão apresentadas na tabela 4. A prole das fêmeas que foram alimentadas com 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} foi a que apresentou a menor porcentagem de indivíduos com anormalidades indeterminadas ($1,34 \pm 0,29\%$). As fêmeas que receberam suplementação de 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} produziram $2,00 \pm 0,51\%$ dos embriões com alguma deformidade no blastoderme, enquanto as demais apresentavam esta anormalidade entre 3 e 6% dos indivíduos.

Tabela 4. Categorias de anormalidades encontradas na prole de *R. quelen* proveniente de matrizes alimentadas com diferentes níveis de inclusão de ácido fólico.

	Níveis de inclusão de ácido fólico (mg kg ⁻¹)					
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75
Indeterminada (%)	2,61±0,65	1,94±0,48	2,03±0,49	1,82±0,67	1,86±0,22	1,34±0,29
Blastoderme deformada (%)	3,32±0,57	3,08±1,11	4,26±0,15	6,00±0,80	2,00±0,51	3,97±0,56
Desvio notocorda (%)	3,18±1,10	1,34±0,38	2,55±0,56	3,05±0,98	2,85±0,45	2,43±0,26
Má formação caudal (%)	0,20±0,08	0,73±0,42	0,38±0,22	0,34±0,12	0,26±0,13	0,11±0,06
Saco vitelínico deformado (%)	8,46±1,16	4,92±1,01	9,97±1,89	6,86±0,88	7,81±2,10	7,25±1,23
Edemas cardíacos (%)	0,13±0,10	0,17±0,09	0,16±0,06	0,21±0,04	0,09±0,04	0,31±0,02

As larvas de fêmeas que receberam suplementação de 0,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ foram as que apresentaram a menor porcentagem de indivíduos com desvio da notocorda, sendo 1,34±0,38%, enquanto as demais proles tinham em torno de 3% de seus indivíduos com essa anormalidade. Em relação a má formação caudal, todas as proles apresentaram taxa abaixo de 1% de indivíduos com essa anomalia, e a prole das fêmeas que foram suplementadas com 3,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentou a menor porcentagem (0,11±0,06%).

Os embriões provenientes das fêmeas que receberam rações suplementadas com 0,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentaram a menor porcentagem (4,92±1,01%) de sacos vitelínicos com deformações. A porcentagem de edemas cardíacos foi menor que 1%, apesar dessa anormalidade estar presente em, pelo menos, um embrião de cada prole avaliada, sendo 0,09±0,04% a menor porcentagem de indivíduos com este problema, valor este oriundo da prole de fêmeas suplementadas com 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹.

As figuras 10 e 11, a seguir, representam algumas das anormalidades encontradas entre as proles avaliadas.

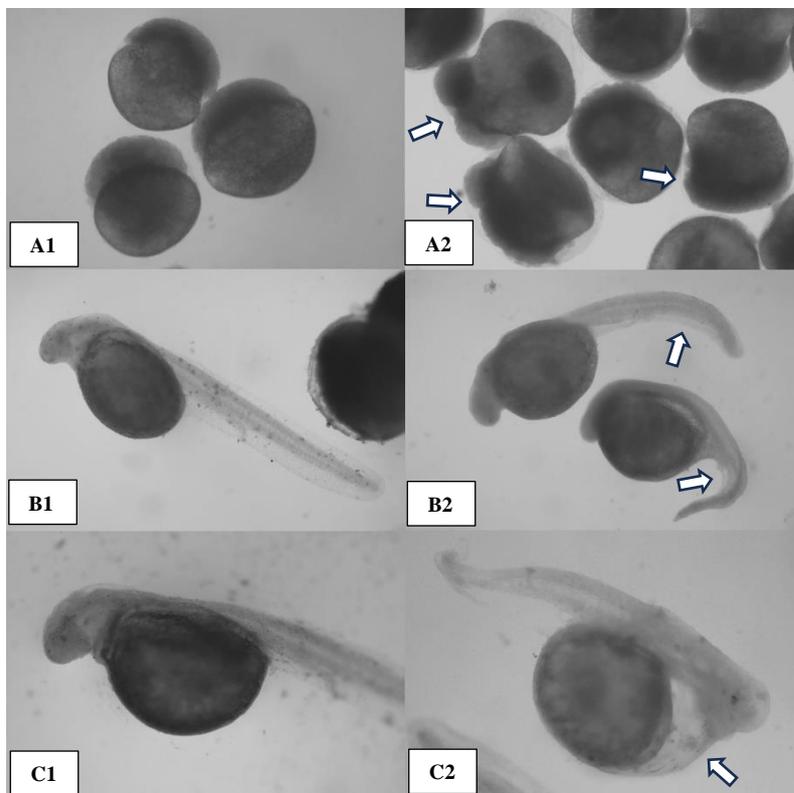


Figura 10. Anomalias anatômicas encontradas na prole de *R. quelen* proveniente de matrizes alimentadas com níveis de inclusão de ácido fólico. A1) Embrião na fase de blástula com características normais. A2) Embriões com a blastoderme anormal (flecha branca). B1) Larva

com características normais. B2) Larvas com desvio na notocorda (flecha branca). C1) Larva com a cavidade cardíaca anatomicamente normal. C2) Larva com considerável edema cardíaco (flecha branca). Aumento de 40x.

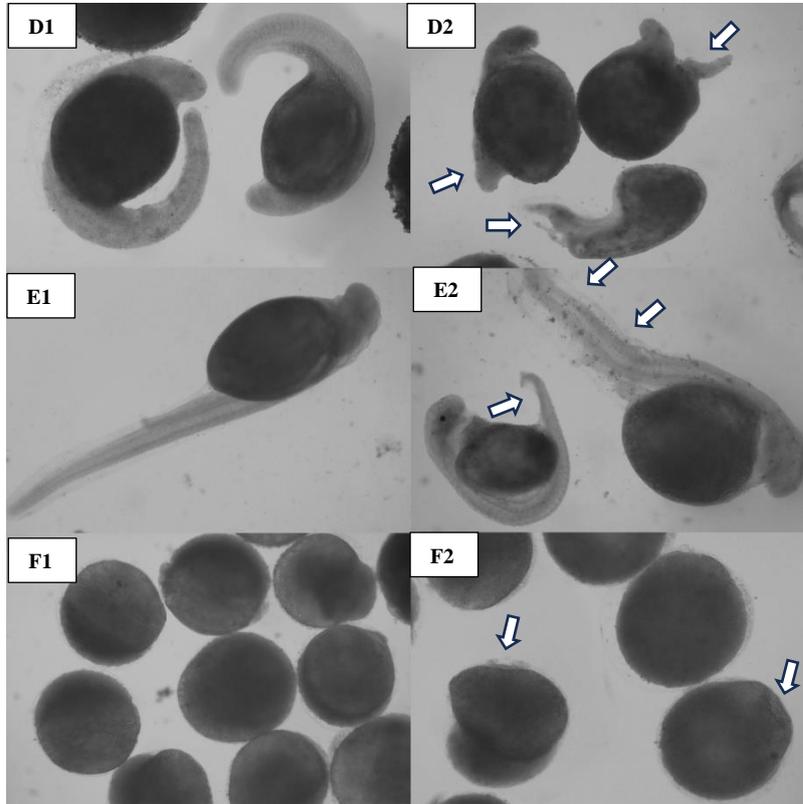


Figura 11. Anomalias anatômicas encontradas na prole de *R. quelen* proveniente de matrizes alimentadas com níveis de inclusão de ácido fólico. D1) Exemplares normais na fase de faringula. D2) Embriões com anomalia indeterminada (flecha branca). E1) Larva com anatomia normal. E2) Larvas com má formação caudal (flecha branca). F1) Embriões na fase de blástula com desenvolvimento normal. F2) Embriões com o saco vitelino achatado e côncavo (flecha branca). Aumento de 40x.

3.4 Discussão

De forma geral, o presente estudo demonstrou que a alimentação das fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*), suplementada com ácido fólico a $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$, resultou em uma maior taxa de normalidade nos descendentes observados, apresentando, ainda, aceleração no desenvolvimento de neurulas e faringulas na fase embrionária.

A literatura sobre o desenvolvimento embrionário associado ao ácido fólico e a nutrição de peixes é inexistente. Porém, diversos estudos comprovaram os efeitos positivos desta vitamina no desenvolvimento de vertebrados, principalmente, atuando na eritropoiese (Sarmah; Marrs, 2013; Yue et al., 2017; Maia et al., 2020). Dessa forma, ainda que seja difícil comparar o organismo dos humanos e aves com o dos peixes, esta analogia é necessária.

Assim, é possível supor que a vitamina evitou defeitos morfológicos no coração por meio dos reparos no DNA (Elad et al., 2020), aumentou a deposição proteica para a formação muscular (Sarmah; Marrs, 2013) da prole, melhorou a interação entre as células nervosas para a formação do sistema nervoso central (Kobus et al., 2009) e dos olhos (Cadena et al., 2020). Além disso, atuou na angiogênese (Lian et al., 2022), melhorando a produção dos vasos sanguíneos (Oosterbaan et al., 2012) e das hemácias (Maia et al., 2020).

Durante a fase de neurula, houve uma aceleração da formação do blastóporo nos embriões provenientes de fêmeas suplementadas, colaborando, desta forma, com o desenvolvimento do sistema nervoso central. Tal achado encontra consonância com o demonstrado em outros organismos, onde, conforme identificado por Kobus et al. (2009) em *Gallus domesticus*, a deficiência do ácido fólico causa prejuízos à fase de neurulação. Maia et al. (2020) afirmam que a suplementação de ácido fólico é essencial para a proliferação celular de humanos. Deste modo, é possível assumir que o ácido fólico tenha acelerado a divisão celular no blastoderme, consequentemente influenciando a cobertura da célula vitelina e a formação do blastóporo. A vitamina também pode ter aumentado a multiplicação de células nervosas e a sinapse entre os neurônios (Maia et al., 2020), de modo a acelerar o fechamento do tubo neural e a formação das bolsas ópticas (Cadena et al., 2020).

No jundiá, a taxa de normalidade de embriões e larvas foi aumentada pela ação do ácido fólico. Tal efeito pode ter relação com a capacidade antioxidante do ácido fólico (Ma et al., 2015; Elad et al., 2020), que atua nas gônadas e nos ovócitos (Anagha et al., 2021) e, desta forma, pode ter melhorado a normalidade dos descendentes ao neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs). O efeito da vitamina sobre a normalidade já havia sido descrito em *Danio rerio*, na qual a exposição dos embriões ao ácido fólico reduziu a ocorrência de malformações, melhorando o desenvolvimento cardíaco e neural (Ma et al., 2015).

O ácido fólico acelerou o estágio de faringula nos descendentes das fêmeas suplementadas, atuando na formação muscular e no desenvolvimento cardíaco. Esse efeito pode ser explicado pela ação do ácido fólico na regulação do apoptose (Kobus et al., 2009), processo fundamental para a modelagem dos órgãos e formação das cavidades dos órgãos ocos, como o coração. Ainda, é descrita uma correlação positiva entre a vitamina e a melhora na formação

das hemácias, dos vasos sanguíneos e da circulação sanguínea de aves (Oosterbaan et al., 2012). Além disso, o ácido fólico atua colaborando com o desenvolvimento cardíaco e evitando a formação de edemas em embriões de *Danio rerio* (Yue et al., 2017), além da correta formação do coração dessa espécie (Ma et al., 2015). Essa vitamina também está associada à produção de proteínas (Lian et al., 2022) essenciais para a formação dos músculos e da nadadeira embrionária.

O tempo teve um impacto negativo no desenvolvimento embrionário, independentemente do nível de suplementação de ácido fólico na alimentação das fêmeas e da fase de desenvolvimento. Assim, com o decorrer do tempo, a quantidade e qualidade dos descendentes diminuía.

Na literatura, encontram-se trabalhos abordando a ocorrência de edemas cardíacos (Incardona et al., 2004), desvios de coluna vertebral (Rivero-Wendt et al., 2023), anormalidades no desenvolvimento dos olhos (Osman et al., 2007) e na anatomia do saco vitelínico (Zi et al., 2018) em peixes expostos a toxinas ou agentes poluentes. Entretanto, não constam estudos que apresentem as demais anomalias encontradas neste trabalho.

Incardona et al. (2004) identificaram que a presença de edema cardíaco pode acarretar problemas na circulação sanguínea e o desvio da notocorda, assim como a má formação caudal, ocasionando uma redução no crescimento e dificuldade para natação em peixes (Zi et al., 2018). Neste sentido, considerando os benefícios que o ácido fólico traz para o desenvolvimento cardíaco (Yue et al., 2017), neural (Cadena et al., 2020; Maia et al., 2020), muscular (Sarmah e Marrs, 2013) e da vascularização (Oosterbaan et al., 2012), é possível supor que a suplementação de ácido fólico na dieta das fêmeas pode ter colaborado com a baixa ocorrência das anormalidades. Ainda, é necessário que mais estudos sejam feitos para aclarar os mecanismos que resultam nestas deformidades, suas consequências para a saúde, desenvolvimento e sobrevivência da prole.

3.5 Conclusão

Pode-se concluir que a inclusão de 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} nas rações fornecidas às fêmeas de *Rhamdia quelen* influenciou o desenvolvimento embrionário e larval da prole resultante. O ácido fólico colaborou com a aceleração do desenvolvimento embrionário e melhorou a qualidade da prole, através da redução da ocorrência das anormalidades

categorizadas, estando estes resultados em concordância com os demais resultados obtidos com outras espécies.

A suplementação promoveu a aceleração no desenvolvimento, particularmente nas fases de neurula e faringula, além de contribuir para um aumento na proporção de descendentes com características normais. As anormalidades apresentadas nesta pesquisa podem contribuir com estudos futuros que abordem de forma mais profunda a dinâmica da ocorrência de anomalias durante o desenvolvimento embrionário e suas consequências.

3.6 Agradecimentos

Gratidão à SALUS[®] - Nutrição Animal, pela doação do ácido fólico, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio financeiro por meio do edital 12/2022-POSGFE, e a CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

3.7 Referências

- ADAMES, M. S.; DE TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A. H.; BURATTO, C. N., PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119-128, 2015.
- ANAGHA, T.; GUPTA, S.; SAHU, N. P.; SRIVASTAVA, P. P.; VARGHESE, T.; CHANU, T. I.; CIJI, A. Titanium dioxide nanoparticles alter reproductive and thyroid hormones of *Labeo rohita* females: Amelioration through vitamin E and folic acid. **Aquaculture**, v. 539, p. 736633, 2021. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736633.
- BADRAN, M. F.; ALI, M. A. M. Effects of folic acid on growth performance and blood parameters of flathead grey mullet, *Mugil cephalus*. **Aquaculture**, v. 536, p. 736459. 2021. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736459.
- BALDISSEROTTO B.; BARCELLOS, L.G.; FRACALOSSO, D.; KREUTZ L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: Jundiá (*Rhamdia sp.*)**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2020.
- BARROSO, R. M., MUÑOZ, A. E. P., TAHIM, E. F., WEBBER, D. C., ALBUQUERQUE FILHO, A. D. C., PEDROZA FILHO, M. X. et al. Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil, **Embrapa**, Brasília. 2018.

- BOMBARDELLI, R. A.; GOES, E. S. R.; SOUSA, S. M. N.; SYPPERRECK, M. A.; GOES, M. D.; PEDREIRA, A. C. O.; MEURER, F. Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing different levels of protein and energy. **Aquaculture**, v. 479, p. 817-823. 2017. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.031.
- BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Rev. Bras. Zootec.** 35, 1251–1257. 2006. Doi: 10.1590/s1516-35982006000500001.
- BOMBARDELLI, R. A.; OLIVEIRA, E. J.; SYPPERRECK, M. A.; PEDREIRA, A. C. O.; FREITAS, J. M. A.; MARQUES, A. E. M. L. et. al. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. **Aquaculture**, 530, 735724. 2021. Doi: [https://doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735724](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735724).
- BOMBARDELLI, R. A., SANCHES, E. A., TESSARO, L., BUZZI, A. H., MARTINS, C. V., MEURER, F. Digestible energy requirement for females of *Rhamdia quelen* on reproductive activity fed with ration based on vegetal ingredients. **Latin american journal of aquatic research**, v. 43, n. 3, p. 566-574, 2015. Doi: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-18.
- BOMBARDELLI, R. A.; SANTOS, H. J. K.; CESTARI, M. M.; MARQUES, A. E. M. L.; CHAGAS, T. V.; MEURER, F. Improved sperm DNA integrity and altered fat metabolism and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) males fed rations with purified nucleotide. **Aquaculture**, v. 562, p. 738682, 2023. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738682.
- CADENA, P. G.; CADENA, M. R. S.; SARMAH, S.; MARRS, J. A. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 249-257, 2020. Doi: 10.1016/j.reprotox.2020.07.013.
- COELHO, M. Vitamin stability in premixes and feeds. A practical approach in ruminant diets. In: **Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**. p. 127-145, 2002.
- ELAD, S. O.; URIBE-DIAZ, D. L. D.; YITBAREK, S. A.; SHARIF, S.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Epigenetic effect of folic acid (FA) on the gene proximal promoter area and mRNA expression of chicken B cell as antigen presenting cells, **British Poultry Science**, 61:6, 725-733. 2020. Doi: 10.1080/00071668.2020.1799332.
- FALAH, F. J.; ISLAMI, H. R.; MEHRGAN, M. S. Dietary folic acid improved growth performance, immuno-physiological response and antioxidant status of fingerling *Siberian sturgeon*, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100391. 2020. Doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100391.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue. Rome. Doi: 10.4060/ca9229en.

- GALDINO, A. M. R.; MAIOLINO, C. V.; FORGATI, M.; DONATTI, L.; MIKOS, J. D.; CARNEIRO, P. C. F.; RIOS, F. S. A. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v.18, n.2, p.131-144, 2010. Doi: 10.1017/S096719940999013X.
- GOES, M. D.; GOES, E. S. R.; RIBEIRO, R. P. et al. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology** v. 3, n. 88, p. 254–263. 2017. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.029.
- INCARDONA, J.P.; COLLIER, T.K.; SCHOLZ, N.L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 191-205, 2004
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995. Doi: 10.1002/aja.1002030302.
- KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; DA ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 2, p. 129-132, 2012. Doi: 10.1016/j.physbeh.2012.01.013.
- KOBUS, K.; NAZARI, E. A.; MÜLLER, Y. M. R. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochemistry and cell biology**, v. 132, p. 525-532, 2009. Doi: 10.1007/s00418-009-0630-0.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- LIAN, Z.; WU, Z.; GU, R.; WANG, Y.; WU, C., CHENG, Z.; et al. Evaluation of Cardiovascular Toxicity of Folic Acid and 6S-5-Methyltetrahydrofolate-Calcium in Early Embryonic Development. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 3946, 2022. Doi: 10.3390/cells11243946.
- LIEW, S. C. Folic acid and diseases – supplement it or not? **BioMed Research International**, v. 1, n. 62, p.90-100. 2016. Doi: 10.1155/2014/560183.
- MA, Y.; ZHANG, C.; GAO, X. B.; LUO, H. Y.; CHEN, Y.; LI, H. H. et al. Folic acid protects against arsenic-mediated embryo toxicity by up-regulating the expression of Dvr1. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 16093, 2015. Doi: 10.1038/srep16093.
- MAIA, C. S.; JÚNIOR, J. R. A. Q.; MEDEIROS, J. P.; TENÓRI, F. D. C. Â. M.; LEMOS, A. J. J. M.; et al. Metabolismo do ácido fólico e suas ações na embriogênese. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 57002-57009, 2020. Doi: 10.34117/bjdv6n8-200.
- MEURER, F., BOMBARDELLI, R. A., HAYASHI, C., FORNARI, D. C. Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 81-85, 2005. Disponível em <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126411013>> Acesso em: 22 mai. 2023.

- MEURER, F., BOMBARDELLI, R. A., PAIXÃO, P. S. D., SILVA, L. C. R. D., SANTOS, L. D. D. Feeding frequency on growth and male percentage during sexual reversion phase of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 1133-1142, 2012.
- OLIVEIRA FILHO, P. R. C., FRACALLOSSI, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1581–1587. 2016. Doi: 10.1590/S1516 35982006000600002.
- OOSTERBAAN, A.M.; STEEGERS, E.A.P.; URSEM, N.T.C. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. **Microvascular research**, v. 83, n. 2, p. 98-104, 2012. Doi: 10.1016/j.mvr.2011.11.001.
- OSMAN, A. G., WUERTZ, S., MEKKAWY, I. A., EXNER, H. J., KIRSCHBAUM, F. Lead induced malformations in embryos of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Environmental Toxicology: An International Journal**, 22(4), 375-389. 2007.
- PEDREIRA, A. C. O., MALACARNE, A. M., DALMASO, A. C. S., CARVALHO, K. I. F. S., CHAGAS, T. V., et al. L-carnitine solution used on *Rhamdia quelen* thawed sperm activation boosts sperm movement, maintains larval quality, and permits to optimize the sperm use. **Animal Reproduction Science**, v. 245, p. 107054. 2022 Doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107054.
- RIVERO-WENDT, C. L. G., FERNANDES, L. G., DOS SANTOS, A. N., BRITO, I. L., DOS SANTOS JAQUES, J. A., DOS SANTOS DOS ANJOS, E., FERNANDES, C. E. Effects of Chloramine T on zebrafish embryos malformations associated with cardiotoxicity and neurotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 11, p. 372-381, 2023.
- ROMAGOSA, E.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W.R. Nutrição e alimentação de reprodutores. In: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds), **Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Editora Copiart, Florianópolis, Santa Catarina, p.167-179. 2013.
- ROMANOVA, E. M.; MUKHITOVA, M. E.; ROMANOV, V. V.; LYUBOMIROVA, V. N.; SPIRINA, E. V. Factors for increasing the survival rate of catfish fertilized eggs and larvae. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019. p. 012197. Doi: 10.1088/1755-1315/341/1/012197.
- RURANGWA, E., KIME, D. E., OLLEVIER, F., NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1–28. 2004. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.
- SALVADOR, R., DÍAZ, N., PLAUL, S. E., DA ROSA, C. E., LIEHR, T. Comparative cytogenetics and genomics of South American catfishes of the genus *Rhamdia*: heterochromatin differentiation and insights into the origin of B chromosomes. **Genes**, 10(6), 431. 2019.
- SANCHES, E. A., MARCOS, R. M., BAGGIO, D. M., TESSARO, L., BALEN, R. E., BOMBARDELLI, R. A. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit

- method. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1163-1167, 2011. Doi: 10.1590/S1516-35982011000600001.
- SANTOS, H. K.; MEURER, F. Nutrition and feeding aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*) *Rhamdia quelen* nutrition and feeding. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 299-309, 2020. Doi: 10.1111/raq.12318.
- SARMAH, S.; MARRS, J. A. Complex cardiac defects after ethanol exposure during discrete cardiogenic events in zebrafish: prevention with folic acid. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 10, p. 1184-1201, 2013. Doi: 10.1002/dvdy.24015.
- SCHULTER, E. P.; FILHO; J. E. R. V. Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Inst. **Pesqui. Econômica Apl.** – IPEA. 42. 2017.
- SHI, H.; LEONHARD, W. N., SIJBRANDI, N. J., VAN STEENBERGEN, M. J., FENS, M. H., VAN DE DIKKENBERG, J. B., ... KOK, R. J. Folate-dactolisib conjugates for targeting tubular cells in polycystic kidneys. **Journal of Controlled Release**, v. 293, p. 113-125, 2019. Doi: 10.1016/j.jconrel.2018.11.019.
- VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: ácido fólico. **Brasil International Life Sciences Institute do Brasil**, v. 10, n. 3, p. 7-7, 2010.
- VIEIRA, V. L. A.; GALHARDO, L. Spawning induction and larval rearing of the South American catfish *Rhamdia quelen*. In **Controlled Reproduction of Warm-water Fishes** (pp. 193-208). CRC Press. 2018.
- WITECK, L., BOMBARDELLI, R. A., SANCHES, E. A., OLIVEIRA, J. D. S., BAGGIO D. M., SOUZA, B. E. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on Jundiá catfish in cadmium contaminated water. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481. 2011. Doi: 10.1590/S1516-35982011000300003.
- WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais; manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983.
- WU, G. Nutrition and metabolism: Foundations for animal growth, development, reproduction, and health. **Recent advances in animal nutrition and metabolism**, p. 1-24, 2022.
- YUE, C.; JI, C.; ZHANG, H.; ZHANG, L. W.; TONG, J.; JIANG, Y.; CHEN, T. Protective effects of folic acid on PM_{2.5}-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 10, p. 2316-2322, 2017. Doi: 10.1002/tox.22448.
- ZI, J., PAN, X., MACISAAC, H. J., YANG, J., XU, R., CHEN, S., CHANG, X. Cyanobacteria blooms induce embryonic heart failure in an endangered fish species. **Aquatic toxicology**, v. 194, p. 78-85, 2018.