

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA DIETA DE FÊMEAS DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) EM ATIVIDADE REPRODUTIVA

JÂNDERSON ROCHA GARCEZ

Toledo

2023

JÂNDERSON ROCHA GARCEZ

**SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA DIETA DE FÊMEAS DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) EM ATIVIDADE REPRODUTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Toledo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Garcez, Jânderson Rocha

Suplementação de ácido fólico na dieta de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva / Jânderson Rocha Garcez; orientador Robie Allan Bombardelli. -- Toledo, 2023.
106 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2023.

1. Aquicultura. 2. Nutrição de reprodutores. 3. Qualidade da prole. I. Bombardelli, Robie Allan, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÂNDERSON ROCHA GARCEZ

**Suplementação de ácido fólico na dieta de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em
atividade reprodutiva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Profa. Dr^a. Thaís Souto Bignoutto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profa. Dr^a. Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Aprovada em: 06 de dezembro de 2023.
Local de defesa: Apresentado de forma remota.

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Evandrícia e ao meu filho
Jordan pelo amor, companhia, carinho,
incentivo, compreensão e paciência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, saúde, salvação e pelas vitórias concedidas.

Aos meus pais Meire Margareth e Jasson pelos ensinamentos cristãos, exemplo, orações e as visitas a Toledo.

Às minhas irmãs e cunhados Mary Anne e Luis, Lilyanne e Vinícios, Julyanne e Vitor e ao meu irmão Willian, pelo carinho, união e torcida.

À minha esposa Evandrícia e filho Jordan pelo amor, confiança, compreensão e apoio nas ausências para manejos, coletas e análises.

Aos tios (as), primos (as) e familiares Bastos Rocha e Carvalho Garcez.

Aos irmãos em Cristo dos Gideões Internacionais e das igrejas Batistas em Tabatinga, Benjamin Constant, Codajás e Manaus que sempre nos sustentaram em orações.

Ao PGM da igreja em Toledo pelos ensinamentos bíblicos e orações.

Ao professor Dr. Robie Allan Bombardelli, pela orientação, ensinamentos, paciência, e pela confiança em realizar a pesquisa.

Ao Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos – Latraac pela infraestrutura laboratorial e insumos.

À família Latraac (Ailton, Amanda, Cecília, Elielder, Fernanda, Leonardo, Micaila, Monica, Nathany, Nicolas, Ricardo, Rogério, Rosana, Sara e Taís) que não mediram esforços para ajudar no experimento.

Ao Leonardo, Micaila e Sara pelo companheirismo do experimento e pelas ajudas nas análises.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - IFAM *Campus* Tabatinga pela liberação ao doutorado e pela confiança em retornar com título.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* Toledo por toda estrutura física do Instituto de Pesquisa e Aquicultura Ambiental (InPAA) para o desenvolvimento experimental.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - PPGPREP que possibilitou a minha formação e capacitação intelectual através de seus docentes e discentes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa de apoio ao doutorando fora do estado do Amazonas.

À Salus nutrição animal pela doação do ácido fólico.

E a todos aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

Suplementação de ácido fólico na dieta de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva

RESUMO

A piscicultura mundial está em crescimento, porém a demanda e o fornecimento de alevinos de qualidade tem sido um fator limitante. Estudos com nutrição de reprodutores são promissores porque o atendimento das necessidades nutricionais tem interferência direta sobre a vitelogênese e consequentemente na qualidade dos gametas e proles. Nesta abordagem, a suplementação de ácido fólico é interessante devido atuar diretamente na saúde, crescimento, reprodução e na qualidade das proles. Com base neste contexto, o trabalho atual foi organizado em dois capítulos. O capítulo I apresenta uma revisão sobre o conhecimento atual da suplementação de ácido fólico nos organismos aquáticos, sintetizando os resultados de pesquisas sobre este tema, com perspectiva para a nutrição de reprodutores de peixes. No capítulo II, foi avaliado o crescimento, saúde e os principais parâmetros reprodutivos de fêmeas de jundiá que foram alimentadas com dieta suplementada com ácido fólico. Como modelo biológico, foi utilizado *R. quelen* devido o rápido crescimento, rusticidade e fácil reprodução. O delineamento experimental deste estudo foi inteiramente casualizado, com seis níveis de suplementação de ácido fólico (0,00, 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 e 3,75 mg kg⁻¹) na dieta, com quatro réplicas e os peixes foram alimentados durante de 300 dias. Na reprodução, o ácido fólico proporcionou maiores fêmeas desovantes, aumento na taxa de eclosão e diminuição de proles com malformações. Além disso, atividades antioxidantes no ovário, oócitos e embrião foram importantes para regulação vitelogênica, maturação gonadal e qualidade da prole. Na saúde das fêmeas, houveram aumento no número de eritrócitos e trombócitos na hematologia, também aumento das proteínas totais, albumina e globulinas no soro sanguíneo. Por outro lado, diminuíram as alaninas aminotransferase e aspartato aminotransferase, esse conjunto de respostas promoveram proteção hepática e melhorias do estado fisiológico geral. Conclui-se que a suplementação de rações com 2,25 e 3,0 mg kg⁻¹ de ácido fólico é vantajosa porque melhora o equilíbrio redox, proteção hepática, desenvolvimento gonadal, regula o perfil de ácidos graxos e aumenta a eritropoese nas fêmeas de jundiá. Assim, uma suplementação de ácido fólico pode contribuir para a produção de proles vigorosas e resistentes, atendendo às demandas de mercado e contribuindo para o desenvolvimento da piscicultura industrial.

Palavras-chave: aquicultura, embriões, folato, prole, reprodução

Folic acid supplementation in the diet of silver catfish (*Rhamdia quelen*) female in reproductive activity

ABSTRACT

Global fish farming is growing, but the demand and supply of quality fry has been a limiting factor. Studies on reproductive nutrition are promising because meeting nutritional needs has a direct impact on vitellogenesis and consequently on the quality of gametes and offspring. In this approach, folic acid supplementation is interesting because it acts directly on the health, growth, reproduction and quality of offspring. Based on this context, the current work was organized into two chapters. Chapter I presents a review of the current knowledge of folic acid supplementation in aquatic organisms, summarizing the results of research on this topic, with a perspective for the nutrition of fish breeders. In chapter II, the growth, health and main reproductive parameters of jundiá females that were fed a diet supplemented with folic acid were evaluated. As a biological model, *R. quelen* was used due to its rapid growth, rusticity and easy reproduction. The experimental design of this study was completely randomized, with six levels of folic acid supplementation (0.00, 0.75, 1.50, 2.25, 3.00 and 3.75 mg kg⁻¹) in the diet, with four replicates and the fish were fed for 300 days. In reproduction, folic acid provided greater spawning females, an increase in the hatching rate and a reduction in offspring with malformations. Furthermore, antioxidant activities in the ovary, oocytes and embryo were important for vitellogenic regulation, gonadal maturation and offspring quality. In female health, there was an increase in the number of erythrocytes and thrombocytes in hematology, as well as an increase in total proteins, albumin and globulins in blood serum. On the other hand, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase decreased, this set of responses promoted liver protection and improvements in the general physiological state. It is concluded that supplementation of feed with 2.25 and 3.0 mg kg⁻¹ of folic acid is advantageous because it improves redox balance, liver protection, gonadal development, regulates the fatty acid profile and increases erythropoiesis in females. jundiá. Thus, folic acid supplementation can contribute to the production of vigorous and resistant offspring, meeting market demands and contributing to the development of industrial fish farming.

Keywords: aquaculture, embryos, folate, offspring, reproduction

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico.	21
Figura 2. Esquema do ciclo metabólico do ácido fólico	23

CAPÍTULO II

Figura 1. Eritrócitos de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva....	78
Figura 2. Quantificação de folatos totais no soro e nos ovócitos de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	81
Figura 3. Aspectos macroscópicos do fígado (a) e ovário (b) de fêmeas de jundiá (<i>R. quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Sistematização dos principais resultados de saúde, crescimento e reprodução encontrado em pesquisas com a suplementação de ácido fólico para peixes.....	30
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição dos alimentos e conteúdo de nutrientes das rações experimentais suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico, utilizadas na alimentação de reprodutores de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	66
Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	76
Tabela 3. Parâmetros morfológicos e morfométricos de larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) provenientes de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	76
Tabela 4. Parâmetros de crescimento e índices corporais de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	77
Tabela 5. Parâmetros hematológicos de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	78
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos no soro de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	79
Tabela 7. Indicadores do equilíbrio redox no fígado, ovário, ovócitos, embriões e larvas de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>), alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	80
Tabela 8. Perfil de ácidos graxos no fígado de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com dietas suplementadas com níveis variados de ácido fólico.....	82
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no ovário de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com dietas suplementadas com níveis variados de ácido fólico.....	83
Tabela 10. Parâmetros histológicos do tecido hepático e ovariano de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	84
Tabela 11. Composição centesimal de músculo, fígado, ovário e vísceras de fêmeas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.....	86

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Ácido fólico como impulsionador da saúde em organismos aquáticos e seu potencial para a nutrição de reprodutores de peixes.....	12
1. Introdução.....	13
2. Uma visão geral sobre vitaminas na nutrição de reprodutores e seus impactos na piscicultura.....	16
3. Uma visão geral sobre o ácido fólico ou vitamina B9.....	20
4. O ácido fólico na nutrição de peixes.....	24
5. O ácido fólico melhora a saúde dos peixes.....	27
6. Ácido fólico na nutrição de reprodutores e embriologia.....	35
7. Suplementação dietética de ácido fólico para outros organismos aquáticos.....	37
8. Estabilidade e perdas do ácido fólico nas rações para organismos aquáticos.....	37
9. Perspectiva.....	38
10. Conclusão.....	39
11. Agradecimentos.....	39
12. Referências.....	40

CAPÍTULO II

Dietas suplementadas com ácido fólico reduzem danos oxidativos e melhoram o crescimento, saúde e desempenho reprodutivo de fêmeas <i>Rhamdia quelen</i>.....	60
1. Introdução.....	62
2. Material e métodos.....	64
2.1 Estrutura, estocagem e delineamento experimental.....	64
2.2 Dieta experimental e alimentação.....	65
2.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água.....	66
2.4 Manejo reprodutivo.....	67
2.5 Fecundidade das fêmeas e ensaios de fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos.....	68
2.6 Crescimento, índices corporais, coleta de sangue e tecidos.....	70
2.7 Hemograma e parâmetros bioquímica no soro.....	71
2.8 Análises bioquímicas no fígado, ovários, ovócitos, embriões e larvas.....	72
2.9 Quantificação de ácido fólico no sangue e oócitos.....	73
2.10 Perfil de ácidos graxos do fígado e ovário.....	73
2.11 Histologia do fígado e ovário.....	74
2.12 Composição centesimal dos tecidos corporais.....	75
2.13 Análise estatística.....	75

3. Resultados.....	75
4. Discussão.....	86
5. Conclusão.....	93
6. Agradecimentos.....	93
7. Referências.....	93

CAPÍTULO I

Ácido fólico como impulsionador da saúde em organismos aquáticos e seu potencial para a nutrição de reprodutores de peixes

Folic acid as a health booster in aquatic organisms and its potential for nutrition of broodfish

Resumo

A dificuldade da cadeia produtiva em fornecer alevinos de qualidade têm sido um fator limitante na piscicultura. A nutrição de reprodutores pode ser uma estratégia vantajosa, pois interfere diretamente na vitelogênese, espermatogênese e consequentemente na qualidade dos gametas e proles. Nesta abordagem, a suplementação de ácido fólico é interessante, pois tem atuação direta na saúde, crescimento e na reprodução dos animais. Esta revisão apresenta o conhecimento atual sobre a suplementação de ácido fólico em peixes, sintetizando os resultados de pesquisas sobre este tema. A suplementação de ácido fólico na dieta de peixes aumenta o crescimento, resultando maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e maior sobrevivência. O ácido fólico pode ainda melhorar a imunidade, devido atuação sobre a formação das células sanguíneas, aumento da atividade de lisozima, dos níveis de imunoglobulina e melhora nas respostas inflamatórias, além da sua capacidade antioxidante. Na reprodução, o ácido fólico contribui para a diminuição dos defeitos congênitos em embriões, regula os hormônios reprodutivos e atua como antioxidante ovariano e hepático. Já a deficiência de ácido fólico pode causar anemia e, é prejudicial às funções hepáticas, retarda o crescimento, causa letargia e deixa nadadeiras frágeis. A maioria das informações existentes são para peixes jovens e em fase de crescimento e, as informações sobre reprodutores são escassas. Portanto, estudos focados em reprodutores são promissores, pois podem contribuir para a produção de proles vigorosas e resistentes, atendendo às demandas de mercado e contribuindo para o desenvolvimento da piscicultura industrial.

Palavras-chave: embriões, equilíbrio redox, folato, gametogênese, nutrição, reprodução.

Abstract

The production chain often has difficulties in providing quality fingerlings, which is a limiting factor in fish farming. Broodfish nutrition can be an advantageous strategy since it directly interferes with vitellogenesis, spermatogenesis and, consequently, the quality of gametes and offspring. In this sense, supplementation with folic acid is interesting because it has a direct effect on the health, growth and reproduction of animals. This review presents the current knowledge about folic acid supplementation in fish, and synthesizes the results of research on this topic. Folic acid supplementation in the diet of fish increases growth, and results in greater weight gain, better feed conversion and greater survival. Folic acid can also improve immunity due to its action on the formation of blood cells, increased lysozyme activity and immunoglobulin levels, and improved inflammatory responses, in addition to its antioxidant capacity. In reproduction, folic acid contributes to the decrease in birth defects in embryos, regulates reproductive hormones and acts as an ovarian and hepatic antioxidant. Folic acid deficiency, on the other hand, can cause anemia and is harmful to liver functions, slows growth, causes lethargy and causes fragility in fins. Most of the existing information is for young and growing fish, and information on broodfish is scarce. Therefore, studies focused on broodfish are of interest since they can contribute to the production of vigorous and resistant offspring, help to meet market demands and contribute to the development of industrial fish farming.

Keywords: embryos, folate, gametogenesis, nutrition, redox balance, reproduction.

1. Introdução

A aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce em todo o mundo (FAO, 2022). Ela é impulsionada pela demanda de alimentos, viabilidade econômica, geração de renda, emprego e segurança alimentar (Naylor et al., 2021). A piscicultura é a principal modalidade da aquicultura e atingiu a produção de 54,4 milhões de toneladas em 2020, o que representou um crescimento de 2,7% entre 2019 e 2020 (FAO, 2022). O seu rápido desenvolvimento na última década foi baseada em tecnologias e técnicas de produção intensiva voltadas principalmente ao crescimento e terminação para atender a demanda de mercado (Barroso et al., 2019; Valladão et al. 2018). Porém a disponibilidade de proles de qualidade para a criação se tornou um fator limitante para o desenvolvimento desta cadeia produtiva em diversos países (Schulter e Vieira Filho, 2018; Barroso et al., 2019; FAO, 2020, Bombardelli et al. 2021a).

Para atender à esta crescente demanda, o setor da piscicultura tem buscado desenvolver estratégias para garantir a oferta de proles em quantidade e com qualidade (Bombardelli et al. 2021b). Neste sentido, a alimentação e a nutrição dos reprodutores de peixes vêm ganhando atenção do setor produtivo e científico, sendo considerada uma importante estratégia para melhorar o desempenho reprodutivo e a qualidade das proles (Bhujel et al., 2007; Bombardelli et al., 2017). Os reprodutores de peixes podem ser considerados animais de alta performance, pois frequentemente estão expostos às condições de elevado esforço metabólico e, suas exigências nutricionais normalmente estão além das dietas oferecidas ou absorvidas naturalmente (Wu, 2022). Assim, dietas específicas que atendam às exigências nutricionais de machos e fêmeas em atividade reprodutiva certamente impactarão no sucesso reprodutivo, na saúde e na qualidade da prole produzida (Izquierdo et al., 2001; El-Sayed et al., 2005; Gatlin III e Li, 2007; Migaud et al., 2013, Nascimento et al., 2023).

Em geral, durante a maturação das gônadas, os reprodutores não exigem dietas com elevada densidade nutricional em termos de proteína e energia (Tessaro et al., 2012; Tessaro et al., 2014; Bombardelli et al., 2017), contudo necessitam de um ajuste preciso no balanço de micronutrientes como nucleotídeos (Lima et al., 2020; Bombardelli et al., 2023), ácidos graxos e L-carnitina (Goes et al., 2024), minerais (El-Fotoh et al., 2020; Carvalho et al., 2018) e vitaminas (Fernández et al., 2019; Beato et al., 2020) para promover o adequado desenvolvimento das gônadas, melhorar a fertilidade, e ainda transferir fatores nutricionais aos gametas (Cejas et al., 2004) e às proles (Nascimento et al., 2023). Desta forma, o atendimento das exigências nutricionais durante o período reprodutivo é fundamental para garantir o sucesso

da vitelogênese (Mommensen e Korsgaard, 2008; Fernandez-Palacios et al., 2011) e da espermatogênese (Bombardelli et al., 2023).

Apesar da nutrição de peixes ser um tema muito estudado e conhecido, as informações sobre os efeitos da nutrição sobre a reprodução dos peixes ainda são escassas (Bobe e Labbé, 2010; Sing et al., 2021) e, sem dúvidas, esta é uma das especialidades piscícolas menos compreendida (Romagosa et al., 2013). As dificuldades impostas pelas condições experimentais possivelmente desencorajam a realização de experimentos com reprodutores, uma vez que exigem delineamentos de maior complexidade e resultados com interações complexas (Ling et al., 2006) e, exigem maiores custos para manutenção do plantel e fornecimento de ração experimental por longos períodos (Izquierdo et al., 2001). Assim, as consequências da falta de informações sobre a nutrição dos reprodutores de peixes resultam na produção de proles de baixa qualidade (Liu et al., 2014; Luo et al., 2015), com malformações (Jezierska et al., 2000), susceptíveis às enfermidades (Bricknell e Dalmo, 2005) e quando inseridas no mercado podem trazer problemas econômicos significativos para a cadeia produtiva (Izquierdo et al., 2001).

Dentre vários nutrientes de importância na reprodução, as vitaminas se destacam pelo seu papel importante para uma série de processos fisiológicos, desenvolvimento gonadal, fertilidade, embriogênese, aumento da eclosão, crescimento e está ligada ao bom funcionamento e manutenção das funções corporais (Hernandez e Hardy, 2020; El-Sayed e Izquierdo, 2021). As vitaminas são de natureza orgânica, suas exigências são em quantidades relativamente pequenas (McDowell, 2000; Webster e Lim, 2002; Lehninger et al., 2006) e funcionam como catalisadores ou reguladores metabólicos, fundamentais para a saúde, crescimento e reprodução dos peixes (Romagosa et al., 2013). Apesar do conhecimento sobre a importância das vitaminas para o crescimento dos peixes ser comum, informações sobre as suas exigências para reprodutores são menos abundantes. As informações disponíveis na literatura mostram uma relação positiva entre a suplementação das vitaminas e o sucesso reprodutivo de diferentes espécies de peixes (Pradhan e Olsson, 2015; Serezli et al., 2010; Navarro et al., 2010; Martínez-Páramo et al., 2012; Fernández et al., 2019; Beato et al., 2020).

Os benefícios da suplementação do ácido fólico (vitamina B9) em peixes foram documentados principalmente com foco na saúde e no crescimento (Duncan e Lovell, 1994; Barros et al., 2009; Falah et al., 2020; Khan e Khan, 2020; Amri et al., 2020; Shi et al., 2020; Zehra e Khan 2020; Badran e Ali, 2021; Roudsari et al., 2021; Hang et al., 2022). Esses benefícios normalmente foram associados ao aumento na atividade da lisozima (Lin et al., 2011;

Falah et al., 2020), ao aumento da imunidade (Firouz et al., 2013; Sesay et al., 2016; Delsoz et al., 2017; Falah et al., 2020), à melhora na proteção hepática (Hang et al., 2022), à melhor resposta ao estresse oxidativo e as respostas inflamatórias (Falah et al., 2020, Khan e Khan, 2020; Shi et al., 2020; Zehra e Khan, 2020), maior ganho de peso (Khan e Khan, 2020; Badran e Ali 2021), melhor conversão alimentar (Barros et al., 2009; Khan e Khan, 2020) e aumento da sobrevivência (Badran e Ali, 2021). Já a deficiência de ácido fólico, causa anemia (Duncan et al., 1993), é prejudicial às funções hepáticas (Wu et al., 2016), retardo do crescimento e a hematopoiese (Lim e Klesius, 2001) e promove fragilidades nas nadadeiras (Sesay et al., 2016).

Na reprodução de peixes, o ácido fólico diminui os defeitos congênitos e cardíacos (Yue et al., 2017), além de atuar na formação dos olhos e aumento do comprimento dos embriões (Sarmah e Marrs, 2013). Ainda, a exposição de embriões em ácido fólico diminui as malformações embrionárias, melhora o desenvolvimento neural dos embriões e aumenta as taxas de eclosão dos ovos e a sobrevivência das larvas (Ma et al., 2015, Cadena et al., 2020). Nos reprodutores, o ácido fólico pode atuar na regulação dos níveis séricos de gonadotrofinas, hormônios esteroides e vitelogenina (Anagha et al., 2021).

Com base em estudos com outros vertebrados, foram comprovados os benefícios do ácido fólico em todos os aspectos da reprodução. Em humanos, o ácido fólico atua na formação do feto e tubo neural (Bortolus et al., 2021), está envolvido na síntese de proteínas, lipídios e DNA (Dunlap et al., 2011), além do aumento da fertilidade (Chavarro et al., 2015; Ma et al., 2022) e na melhora da qualidade seminal e espermatogênese (Schisterman et al., 2020). Em roedores, o ácido fólico também está associado com o aumento da concentração espermática (Ibrahim et al., 2011; Zhang et al., 2021). Em cães aumentou a motilidade e integridade funcional da membrana do espermatozoide (Alonge et al., 2019). Em coelhos aumentou a motilidade, reduziu o perfil lipídico e melhorou os parâmetros eritrocitários (Ghadhban e Alwan, 2020; Amaduruonye et al., 2021). Em suínos, diminui o teor de homocisteína no fluxo uterino, fortaleceu os tecidos endometriais e embrionários durante a gestação e auxilia no crescimento e metabolismo hepático de leitões nascidos prematuros (Guay et al., 2002; Vallée et al., 2002; Yao et al., 2013). Em aves, auxilia na autofagia testicular, aumenta o peso corporal, melhora a conversão alimentar e a produção de ovos em matrizes (Hebert et al., 2005; Ezzat et al., 2011; Ye et al., 2022).

Apesar da grande diversidade de benefícios conhecidos, as informações sobre as exigências ou a suplementação de ácido fólico para reprodutores em peixes ainda são escassas ou inexistentes. Assim, o adequado uso do ácido fólico em dietas para reprodutores de peixes

pode ser uma estratégia promissora na busca por soluções que venham atuar diretamente sobre a melhora do sucesso reprodutivo e a melhora da qualidade e do vigor das proles. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi revisar as informações sobre os principais benefícios da suplementação dietética do ácido fólico (vitamina B9) para a piscicultura, fornecendo uma melhor compreensão das necessidades desta vitamina, com foco na nutrição dos reprodutores de peixes.

2. Uma visão geral sobre vitaminas na nutrição de reprodutores e seus impactos na piscicultura

Com o desenvolvimento da criação intensiva na década de 80 (Nash, 2010; Jobling, 2016), foram conhecidas as exigências nutricionais para carpa, truta, salmão e *catfish* (Hardy et al., 2022). Com isso, houve necessidade de produzir e ofertar peixes nas formas jovens para abastecimento dos produtores (FAO, 2020) e, portanto, nesse mesmo período, iniciaram os primeiros estudos com dieta de reprodutores (Springate et al., 1985; Watanabe et al., 1985). Esses estudos demonstraram que a preparação de dietas artificiais adequadas durante a pré-desova teve efeito positivo na qualidade de ovos e larvas (Watanabe et al., 1984). Posteriormente, outros estudos ampliaram o conhecimento sobre componentes macro e micronutrientes para formulações das rações (Bromage, 1995; Furuita et al., 2001, Hardy e Kaushik, 2021). Além disso, foi verificado que as diferentes espécies possuíam exigências diferenciadas entre fases da criação e reprodução (Gatlin III, 2010) e, portanto, os estudos identificaram que a falta de dietas adequadas para reprodutores se tornaria um fator limitante na performance reprodutiva (Woynárovich e Horváth, 1983; Watanabe et al., 2002; Watanabe et al., 2003).

Com o rápido crescimento da aquicultura em todo o mundo (FAO, 2022), houve um aumento na procura por juvenis para atender às demandas do mercado (Barroso et al., 2019). Porém, a oferta dos alevinos comercializados de forma geral não tem suprido à demanda do mercado, especialmente devido à baixa qualidade e vigor dos animais (Liu et al., 2014; Luo et al., 2015). Assim, a nutrição de reprodutores surge como uma das estratégias para garantir o fornecimento de proles com qualidade e em quantidade (Ng e Romano, 2013; Bombardelli et al., 2021b). Assim, estudos iniciais foram voltados à determinação das exigências de proteína (Gunasekera et al., 1996; El-Sayed et al., 2003) e energia (Tessaro et al. 2012; Tessaro et al., 2014) ou das relações proteína e energia (El-Sayed e Kawanna, 2008). Mais recentemente, as pesquisas nesta área têm sido focadas no uso de suplementos e aditivos nutricionais voltados à

melhora no desempenho reprodutivo e melhora no vigor da prole (Lima et al., 2020; Singh et al., 2021; Romanova et al., 2022; Bombardelli et al., 2023; Nascimento et al., 2023, Goes et al., 2024).

De forma geral, o controle e o domínio da reprodução dos peixes são essenciais para o sucesso da produção piscícola (Migaud et al., 2013). Neste contexto, a nutrição dos reprodutores têm recebido atenção do setor produtivo e do setor acadêmico, evidenciando que dietas balanceadas e o suprimento adequado dos nutrientes auxiliam no crescimento e no desempenho reprodutivo de machos (Mewes et al., 2016, Bombardelli et al., 2023) e das fêmeas (Izquierdo et al., 2001; Johnston et al., 2007; Bombardelli et al., 2015; Lima et al., 2020), refletindo sobre a maturação das gônadas (Singh et al., 2021), a fecundidade e a qualidade dos gametas (Bobe e Labbé, 2010; Jobling, 2016). Além disso, o emprego adequado da nutrição dos reprodutores pode ser uma ferramenta poderosa para melhorar o desenvolvimento embrionário e a eclosão dos ovos (Izquierdo et al., 2001), além de transferir fatores nutricionais para as proles, refletindo positivamente sobre o vigor e a sobrevivência das larvas e juvenis (Nascimento et al., 2023).

A relação entre a nutrição dos reprodutores e a qualidade das proles se estabelece inicialmente quando as reservas do reprodutor são mobilizadas e transportadas para os gametas (Bhujel et al., 2001; El-Sayed et al., 2003). Este processo promove a transferência não somente de nutrientes para o crescimento da prole via vitelo, mas também a transferência de fatores da imunidade materna para a prole (Zhang et al., 2013; Ji et al., 2021), os quais melhoram o vigor (Nascimento et al., 2023) e a sobrevivência das proles (Mazorra et al., 2003).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas pesquisas sobre exigências de proteínas (Reidel et al., 2010; Coldebella et al. 2011; Oliveira et al., 2014), energia (Bombardelli et al., 2009; Tessaro et al., 2012), da relação energia e proteína (Bombardelli et al., 2017), ácidos graxos (Hilbig et al., 2019) e do uso de diferentes fontes de óleos vegetais (El-Sayed et al., 2005; Ng e Wang, 2011; Zakeri et al., 2011). Apesar deste cenário, poucas são as informações disponíveis sobre as exigências de nutrientes digestíveis para os reprodutores de peixes (Riche, 2009; Cho e Bureau, 2001; Tessaro et al., 2014).

Outras pesquisas também foram realizadas com a finalidade de suplementar as rações para reprodutores com minerais como selênio, zinco (El-Fotoh et al., 2020) e fósforo (Carvalho et al., 2018). Também foram estudados os efeitos da suplementação dietética da vitamina A (Vassallo-Agius et al. 2001; Furuita et al., 2001; Clagett-Dame e DeLuca, 2002; Tan e He, 2007; Alsop et al., 2008, Pradhan e Olsson 2015), vitamina B1 (Romanova et al, 2019),

vitamina B7 (Yossa et al, 2013), vitamina B12 (Diemer et al., 2013), vitamina C (Martins et al., 2014; Mataveli et al., 2010; Canyurt e Akhan, 2008), vitamina E (Serezli et al., 2010; Navarro et al, 2010; Mehrad et al., 2010), as interações entre vitaminas C e E (Emata et al., 2000; Lee e Dabrowski et al., 2004; Furuita et al., 2009; Martínez-Páramo et al., 2012; Figueroa et al., 2018) e vitamina K (Fernández et al., 2019; Beato et al., 2020). Pesquisas recentes também avaliaram os efeitos de rações formuladas com probióticos (Dias et al., 2020), nucleotídeos (Lima et al., 2020; Bombardelli et al., 2023) e minerais em nanopartículas (Jahaabad et al., 2020; Ziaei-Nejad et al., 2020) sobre a reprodução e qualidade das proles de peixes.

A suplementação vitamínica aos reprodutores é essencial para o bom desempenho reprodutivo, particularmente, para as taxas de fecundidade, qualidade dos gametas e sobrevivência da prole (Romagosa et al., 2013). As vitaminas desempenham papéis importantes no metabolismo celular (Moraes e Almeida, 2020) e são importantes para manutenção de diversos processos bioquímicos e fisiológicos que auxiliam na saúde, crescimento e reprodução dos peixes (Furuya, 2010; Borba et al., 2013; Romagosa et al., 2013). A necessidade de suplementação vitamínica na dieta é maior nos sistemas de criação intensiva e os reprodutores apresentam exigências diferente dos animais em crescimento (Pezzato et al., 2004; Borba et al., 2013).

Como os animais utilizados na reprodução são condicionados à manejos que impõe elevado esforço metabólico, os nutrientes disponíveis na dieta e no ambiente normalmente não suprem suas exigências (Wu, 2022), necessitando a prática da suplementação externa (Borba et al., 2013). Porém, muita atenção deve ser dada para o atendimento das exigências nutricionais dos reprodutores, pois a suplementação vitamínica em excesso pode causar toxidez (Navarro et al., 2007; Bastos et al., 2013; Lian et al., 2022), alterando também o funcionamento do sistema endócrino envolvidos na reprodução (Blanco, 2019).

De modo geral, as vitaminas mais estudadas na reprodução dos peixes são as vitaminas A, C e E (Navarro et al., 2009; Volkoff e London, 2018). A suplementação de vitamina A auxilia no desenvolvimento gonadal, aumento da fecundidade, fertilidade e atua no desenvolvimento da estrutura óssea (Vassallo-Agius et al. 2001; Furuita et al., 2001; Tan e He, 2007; Alsop et al., 2008, Pradhan e Olsson 2015). A vitamina C pode atuar como antioxidante, contribuindo para defesa imunológica e melhora na qualidade seminal, além do regular o ritmo da vitelogênese e a da embriogênese. A vitamina C também aumenta a normalidade larval e sobrevivência da prole (Canyurt e Akhan, 2008; Mataveli et al., 2010). A vitamina E tem benefícios semelhantes aos das vitaminas A e C, com papel no desenvolvimento das gônadas e

aumento da fecundidade e eclosão dos ovos (Alvarez-Lajonchère, 2006; Serezli et al., 2010; El-Sayed e Izquierdo, 2021). Além disso, é evidente a ocorrência de efeitos sinérgico no metabolismo das vitaminas C e E, importantes como agente antioxidante nos gametas (Emata et al., 2000; Lee e Dabrowski et al., 2004; Furuita et al., 2009; Martínez-Páramo et al., 2012; Figueroa et al., 2018; Félix et al., 2020).

Apesar da importância para garantir o sucesso da reprodução dos peixes, as informações sobre as vitaminas do complexo B ainda são escassas ou até mesmo inexistentes (Volkoff e London, 2018). Estudos com a vitamina B₁ (tiamina) e vitamina B₆ (piridoxina) demonstraram a importância destas vitaminas para a sobrevivência do embrião, para o desenvolvimento larval e para a síntese de hormônios esteroides (Romanova et al., 2019; Akhtar e Ciji, 2020). A suplementação de vitamina B₁₂ (cobalamina) também melhorou a motilidade espermática (Diemer et al., 2013) e o ácido fólico apresentou efeitos positivos sobre a eclosão de ovos e para o desenvolvimento embrionário e larval (Ma et al., 2015, Yue et al., 2017; Cadena et al., 2020). Assim, para que as vitaminas expressem o seu máximo potencial sobre o metabolismo, é imprescindível voltar a atenção para a saúde e o bom funcionamento do trato digestório dos peixes, pois as vitaminas são absorvidas pelo intestino e armazenadas no fígado (Volkoff e London, 2018). Logo, estes são órgãos de extrema relevância para sustentar os processos metabólicos e impulsionar as respostas relacionadas com a interação entre nutrição e reprodução (Wu, 2022).

Apesar da importância da nutrição dos reprodutores para impulsionar a qualidade das proles e, mesmo sendo esta informação conhecida desde a década de 1980, em diversos locais do mundo a alimentação dos reprodutores de peixes com rações formuladas para peixes em crescimento ainda é uma prática comum. Isto pode estar associado ao plantel de reprodutores demandar reduzidos volumes de rações em comparação com aqueles destinados para o crescimento e abate, inviabilizando a produção de rações específicas em escala industrial. Nesta cadeia produtiva, a expectativa das indústrias de rações para organismos aquáticos é uma produção superior a 73 milhões de toneladas de ração no ano 2025 (Tacon, 2019), sendo em sua absoluta maioria voltadas para ao mercado de peixes em crescimento e a terminação (Rebelatto Jr. et al., 2015; Baldisserotto e Gomes, 2020). Assim, como as exigências nutricionais dos peixes em crescimento são diferentes daquelas para os reprodutores, o uso inadequado destas rações pode limitar o desempenho reprodutivo (Ng e Romano, 2013) e a qualidade e o vigor das proles (Nascimento et al., 2023). Por este motivo, a cadeia produtiva da

piscicultura tem buscado rações que atendam às exigências dos reprodutores, porém estas ainda são escassas no mercado (Bhujel, 2000).

Apesar destas rações apresentarem um custo de produção mais elevado em comparação às rações para crescimento (Ribeiro et al., 2017), o seu uso se torna um investimento, pois os benefícios da nutrição adequada dos reprodutores sobre a qualidade e o vigor das proles compensam os gastos com as rações. O investimento com o uso de rações específicas para reprodutores tende a gerar um retorno maior à medida que as cadeias produtivas se especializam, utilizando reprodutores de maior valor genético e consequentemente maior valor econômico. Nestes casos, é imprescindível garantir o máximo desempenho reprodutivo e a maior longevidade possível dos reprodutores (Bombardelli et al., 2021a; Bombardelli et al., 2023; Goes et al., 2024). Mesmo sendo escassas as informações sobre as demandas de investimentos e os custos para promover a manutenção de plantéis de reprodutores (Guerreiro et al., 2014) e produção de proles (Guerreiro et al., 2016), a nutrição de reprodutores também garante maior qualidade do sêmen destinado para criopreservação (Pustowka et al., 2000), promovendo maior rendimento das doses inseminantes e contribuindo para viabilizar a indústria voltada a bancos de sêmen criopreservado (Bombardelli et al., 2021a; Pedreira et al., 2022).

De modo geral, é certo que estudos com nutrição de reprodutores são importantes e seus benefícios garantem a qualidade da prole, especialmente em cadeias produtivas industrializadas que empregam práticas intensivas de produção para garantir produção de peixes em larga escala. Finalmente, o sucesso reprodutivo em peixes vai além da oferta de rações balanceadas que atendam às exigências nutricionais de macho e fêmeas em atividade reprodutiva (Zaniboni Filho e Nuñez, 2004). Novas abordagens de manejo alimentar e nutricional também devem ser desenvolvidas, a exemplo das taxas de arraçoamento, emprego de restrição alimentar e até mesmo oferta de rações especializadas para períodos que antecedem a reprodução (Volkoff e London, 2018).

3. Uma visão geral sobre o ácido fólico (vitamina B9)

O ácido fólico é uma vitamina composta por pteridina (6-metilptero), ácido p-aminobenzóico e ácido glutâmico (Figura 1) (Cieślik e Cieślik, 2018). Sua nomenclatura na União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é (2S)-2-((4-(((2-amino-4-oxo-1,4-dihidropteridin-6-il)metil)amino)benzoil)amino)pentanodióico (Alaburda e Shundo, 2007). Também é conhecido por ácido pteroilglutâmico ou vitamina B9 (Zempleni et al., 2007). Possui

peso molecular de 441,40 g/mol, é heterocíclico e tem como fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$ (Liew, 2016). Este componente e seus derivados pertencem ao grupo dos folatos e diferem no grau de oxidação do anel de pteridina e no número de resíduos de ácido glutâmico (Czeczot, 2008; Vannucchi e Monteiro 2010; Liew, 2016). A forma monoglutamato totalmente oxidada desta vitamina é a forma utilizada comercialmente em suplementos e alimentos fortificados (Machlin, 1991; Zempleni et al., 2007).

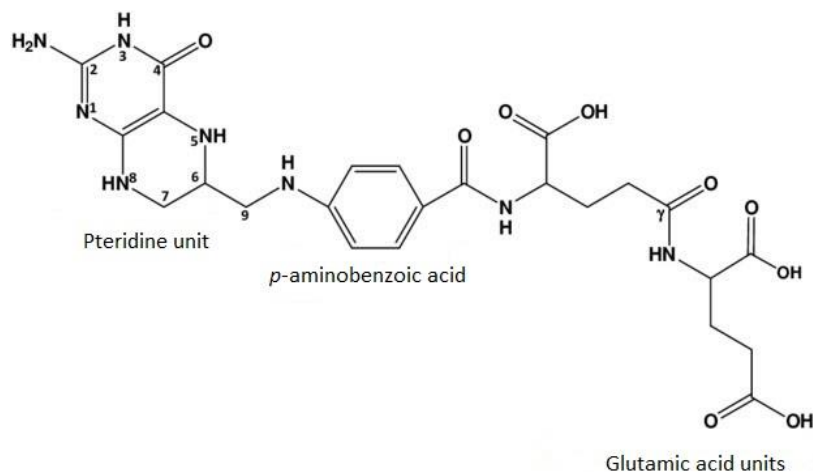


Figura 1. Estrutura química do ácido fólico. Adaptado de Oiano Neto (2010).

O ácido fólico é classificado como hidrossolúvel e de fonte exclusivamente exógena (Vannucchi e Monteiro, 2010). A forma pura desta vitamina tem como aspecto um pó cristalino amarelo ou laranja-amarelado (Liew, 2016), também é inodoro e insípido (Arcot e Shrestha, 2005). É levemente solúvel em água de pH neutro, porém bastante solúvel em solução aquosa ácida e alcalina (Alaburda e Shundo, 2007). Por outro lado, é insolúvel em solventes orgânicos, tais como etanol, acetona e éter (Arcot e Shrestha, 2005). O ácido fólico não apresenta um ponto de fusão definido (Araújo et al., 2012), embora inicie uma degradação quando submetidos ao aquecimento a 100°C por 10 minutos (Penteado, 2003) e decompõem-se à 250 °C (Alaburda e Shundo, 2007). Isso resulta em perda irreversível da atividade vitamínica (McKillop et al., 2002; Araújo et al., 2012).

A importância do ácido fólico foi descoberta na década de 30 (Czeizel et al., 2013), quando foi verificado que a anemia gestacional em humanos podia ser tratada com extrato de levedura (Nasser et al., 2005). Nele foi identificado o folato, que mais tarde foi extraído das folhas do espinafre (Martinez et al., 2009). Na década de 40, sua forma sintética conhecida como ácido fólico foi produzida (Hoffbrand e Weir, 2001). Os primeiros estudos verificaram que o ácido fólico aliviou a anemia megaloblástica em macacos (May et al., 1950; May et al.,

1952) e em porquinhos da Índia (Slungaard e Higgins, 1956). Com isso, pesquisas posteriores apresentaram inúmeros benefícios à saúde humana (Hoffbrand e Weir, 2001). O ácido fólico começou a ser utilizado no tratamento da deficiência nutricional (Wright et al., 2007) e na prevenção de defeitos congênitos durante a gravidez humana (Dary, 2009). Com isso, a suplementação de ácido fólico foi adotada como ação preventiva em saúde pública humana em diversas partes do mundo (Lumley et al., 2001). No início deste século, o enriquecimento de ácido fólico na farinha de trigo tornou-se obrigatória em mais de 40 países (Moran, 2007). Além de sua forma sintética, as principais fontes naturais de folato estão nas folhas e vegetais (Krishnaswamy e Nair, 2001).

O termo ácido fólico é caracterizado pela forma totalmente oxidada e não é encontrada naturalmente nos alimentos (Zempleni et al., 2007). Enquanto os folatos, que é a forma natural, representam o grupo de compostos com a mesma atividade vitamínica (Alaburda e Shundo, 2007). Esses compostos são caracterizados por possuírem atividades biológicas semelhantes, sendo o ácido fólico o mais estável e o composto mais facilmente absorvido deste grupo (Eichholzer, et al., 2006). Outra diferença é que o ácido fólico está na forma monoglutamato e o folato é encontrado na dieta na forma de poliglutamato (Uehara e Rosa, 2010). Assim, a enzima pteroilpoliglutamato hidrolase age sobre esses poliglutamatos fazendo com que os mesmos percam resíduos de glutamato, convertendo-o em uma forma oxidada e liberando suas proteínas para serem absorvidas pelas proteases digestivas (Vannucchi e Monteiro, 2010).

Quando o ácido fólico é ingerido, a enzima diidrofolato redutase (DHFR) o reduz para uma forma bioativa natural denominada de tetraidrofolato (THF). Durante sua via metabólica, ocorrem várias adições e reduções de metilações (Cherukad et al., 2012). Assim, o THF é transformado em 5-metiltetraidrofolato (5-MeTHF) monoglutamato, a qual é a forma circulante do folato (Blom, 2006). Então, o folato circula na forma de monoglutamato na corrente sanguínea, contudo, no interior das células, a forma predominante do mesmo é poliglutamato para que não ocorra perda do folato para o meio extracelular (Nazki et al., 2014). O metabolismo do ácido fólico também está ligado às vitaminas B6 e B12 (Coussirat et al., 2012). A ausência de uma delas dificulta a execução de diversas reações enzimáticas (Cherukad et al., 2012). Isso impede o funcionamento da metionina sintase (MTR), cistationina B sintetase (CBS) e 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), aumentando as concentrações plasmáticas de homocisteína (Yoshii et al., 2019). O excesso de homocisteína está relacionado com alterações na estrutura de proteínas, peroxidação lipídica, inflamação e danos ao DNA (Coussirat et al., 2012) (Figura 2).

Todo esse processo metabólico do ácido fólico inicia-se quando o alimento ingerido chega ao intestino dos peixes, sendo absorvido por difusão utilizando um transportador dependente de Na⁺ (Rotta, 2003). Após absorvido, o ácido fólico entra na corrente sanguínea e parte é armazenada no fígado (Suárez-Obando et al., 2010; Vannucchi e Monteiro, 2010, Maia et al., 2020). Quando o ácido fólico está circulando na corrente sanguínea, há envolvimento nas reações de transferência dos grupos metila e formil, como a síntese de metionina e serina (Ewan, 1996; Das, 2003; NRC, 2011). A função do ácido fólico é fornecer transporte intermediário de unidades monocarbônicas para compostos que participam da divisão celular (produção de ácidos nucleicos), síntese de proteínas, aminoácidos, transformações (conversão mútua de serina e glicina), catabolismo de histidina em ácido glutâmico e transformação de homocisteína para metionina (Jacob et al., 1998; Wald, 2004; Karakula et al., 2009). Além disso, o ácido fólico tem o papel de coenzima nessas reações (Marchioro et al., 2010; Pertiwi et al., 2020).

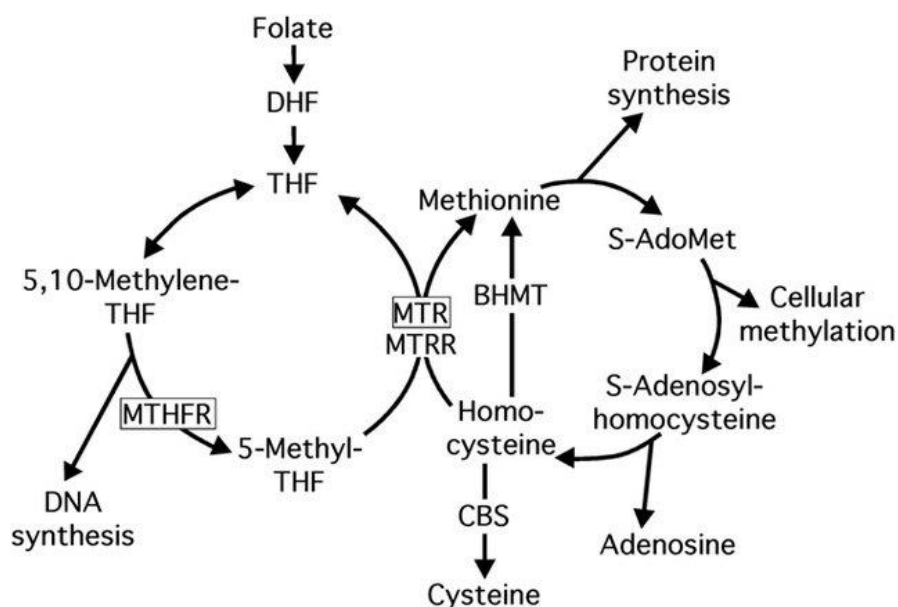


Figura 2. Esquema do ciclo metabólico do ácido fólico. (Fonte: Cherukad et al., 2012)

O ácido fólico está envolvido no ciclo da cobalamina (Vitamina B12) (Cherukad et al., 2012), isso transforma a homocisteína em metionina que é importante para síntese proteica e é responsável pelo fortalecimento dos músculos, proteção dos tecidos, modificação do DNA e por manter o funcionamento saudável das células (Graciano et al., 2010). O ácido fólico também está envolvido no metabolismo de aminoácidos e nas reações de síntese de ácido nucleicos (Marchioro et al., 2010; Blanco et al., 2016). Tem papel importante no desenvolvimento embrionário inicial (Tamura e Picciano, 2006; Millacura et al., 2017) e formação das células do sangue (McDowell, 2000). Além disso, o ácido fólico elimina os

radicais livres oxidantes, sendo considerado um agente antioxidante (Joshi et al., 2001). Com isso, apresenta inúmeros benefícios para imunidade, saúde, crescimento e reprodução animal (Chavarro e Schlaff, 2018; Schisterman et al., 2020).

A suplementação de ácido fólico antes e durante a gravidez humana mostrou-se necessária para o desenvolvimento e fechamento do tubo neural (Millacura et al., 2017), estrutura precursora do sistema nervoso central (Czeizel e Dudás, 1992; Wald et al., 2001). A suplementação também previne anencefalia, espinha bífida, defeitos orofaciais, dentre outras (Wisniewska e Wysocki, 2008; Blanco et al., 2016; Millacura et al., 2017). Com isso, a suplementação diminui consideravelmente problemas na formação embrionária e fetal (Czeizel e Dudás, 1992; Maia et al., 2020).

Por outro lado, a deficiência de ácido fólico ou a vitamina B₉ tem se mostrado o principal fator de risco para defeitos do tubo neural identificado até hoje, além de outras anormalidades morfológicas e funcionais (Wilson e O'Connor, 2021). A deficiência de ácido fólico também pode resultar em anemia megaloblástica (McDowell, 2000) e redução da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), com células apresentando uma fase em repouso prolongada como um bloqueio precoce na mitose (Henry, 2000). Esta deficiência também está relacionada aos níveis baixos de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos (Garcia-Navarro e Pachaly, 2005). Na ausência desta vitamina na via da metionina, ocorre desregulação nas metilações da proteína, nucleotídeos do DNA e RNA, açúcares, dentre outros (Elango, 2020; Lauinger e Kaiser, 2021). Sendo assim, sua insuficiência pode comprometer a proliferação e diferenciação celular durante a embriogênese, afetando as células da crista neural, que apresentam alta taxa de proliferação, e desencadeando defeitos congênitos (Blanco et al., 2016; Millacura et al., 2017). Quando o corpo apresenta uma quantidade baixa de folato, pode ocorrer acúmulo do aminoácido homocisteína, que é prejudicial ao sistema circulatório (Nazki et al., 2014). Nesse contexto, mesmo pequenas deficiências de ácido fólico podem ter um significativo impacto no metabolismo, funcionamento do corpo e reprodução dos animais (Santos e Pereira, 2007; Rahimi et al., 2019; Wilson e O'Connor, 2022).

4. O ácido fólico na nutrição de peixes

O ácido fólico é um nutriente essencial para peixes como também para outros vertebrados (Halver, 1989; Duncan et al. 1993; Cowey e Woodward 1993; Shiao e Huang 2001a, Halver e Hardy, 2002; Barros et al. 2009; Sesay et al. 2016; Falah et al., 2020; Khan e Khan, 2020; Shi et al., 2020; Zehra e Khan, 2020; Badran e Ali, 2021). O primeiro estudo dessa

vitamina em peixes verificou que a truta (*Oncorhynchus mykiss*) necessitava de até 1,0 mg kg⁻¹ de ácido fólico para adquirir máximo ganho de peso (McLaren et al., 1947). Em seguida, verificou-se que a exigência desta vitamina para outros salmonídeos (*Oncorhynchus* spp.) demandava a suplementação de 1,5 mg kg⁻¹ (Halver, 1957). A deficiência de ácido fólico em salmão (*Oncorhynchus kisutch*) está associada às alterações hematológicas (Smith, 1968; Smith e Halver, 1969). Em geral, nos salmonídeos, a deficiência desta vitamina leva à anemia megaloblástica e anorexia. Além disso, foi verificado redução no número de eritrócitos, brânquias pálidas, anisocitose e poiquilocitose (Halver, 1976). Este quadro clínico parece ser reversível, pois a saúde dos peixes foi restabelecida quando a suplementação dietética com ácido fólico foi reestabelecida por oito semanas (Smith e Halver, 1969).

O National Research Council - NRC (1981) recomendou que dietas para peixes de água fria fossem suplementadas com 5,0 mg de ácido fólico kg⁻¹. Essa recomendação foi baseada no critério de armazenamento de folato hepático em espécies de salmão do Pacífico (Halver, 1989) e também pela garantia da vitamina ser altamente solúvel em água (Halver, 1985). Nesse período, o ácido fólico começou a ser adicionado em rações para peixes como um pó seco em uma pré-mistura multivitamínica (NRC, 1981). A partir disso, estudos com suplementação de ácido fólico foram aplicados para outras espécies (NRC, 1993).

Assim, foram observados crescimento deficiente e alteração da cor da pele em enguias japonesas (*Anguilla japonica*) alimentadas com dieta deficiente de ácido fólico por 10 semanas (Arai et al., 1972). Alevinos de cauda amarela (*Seriola quinqueradiata*) com deficiência em ácido fólico apresentaram defeitos nas nadadeiras, coloração escura da pele e anemia (Hosokawa, 1999). Os sinais de deficiência em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) apresentaram crescimento reduzido, anemia e aumento sensibilidade à infecção bacteriana (Duncan e Lovell, 1994). A deficiência de folato podem resultar em sinais semelhantes ao das vitaminas B12 e C (NRC, 2011).

Por outro lado, não foram observados sinais de deficiência desta vitamina em *Cyprinus carpio* alimentados com dieta isenta de ácido fólico (Aoe et al., 1967), levantando uma hipótese sobre a possível síntese de folato pela flora microbiana intestinal (Kashiwada et al., 1971). Essa hipótese também é sustentada por Duncan et al. (1993) para bagres (*I. punctatus*) e Shiau e Huang (2001a) em tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Barros et al. (2009) avaliaram o efeito do ácido fólico nas respostas hematológicas, crescimento e resistência ao estresse provocado por baixas temperaturas (12°C) em *O. niloticus*. De acordo com estes autores, tanto a eritropoiese como leucopoiese foram prejudicadas pelo estressor aplicado, mas

não pela ausência de ácido fólico na dieta, verificando que os microrganismos intestinais podem contribuir com uma quantidade considerável de ácido fólico para o hospedeiro.

A necessidade de ácido fólico foi mais elucidada em trutas (*O. mykiss*), com uma recomendação de 0,3-0,6 mg kg⁻¹ para aumentar o crescimento de juvenis (Cowey e Woodward, 1993). A suplementação entre 2,0 e 2,5 mg kg⁻¹ melhorou o sistema imunológico e crescimento das trutas (Shafaeipour et al., 2011; Esmaeili e Khara, 2014) e, a suplementação de 6,0 mg kg⁻¹ teve efeitos positivos no crescimento e imunidade, porém influenciou negativamente nos parâmetros hematológicos (Firouz et al., 2013).

Outras espécies também estudadas foram as tilápias (*Oreochromis* sp.) e bagre do canal (*I. punctatus*). A necessidade de ácido fólico para alevinos de tilápias de até 5,0 g é recomendada em 0,82 mg kg⁻¹, o que garante o maior ganho de peso (Shiau e Huang, 2001a). Para tilápias em crescimento, com peso corporal de até 315,0 g, a suplementação de 0,4 a 1,0 mg kg⁻¹ proporcionou maior ganho de peso, melhor conversão alimentar, aumento da imunidade e manutenção das respostas fisiológicas (Barros et al., 2009; Wu et al., 2016). Em *I. punctatus*, a suplementação dietética com níveis elevados (200 mg kg⁻¹ de vitamina C e 4 mg kg⁻¹ de ácido fólico) proporcionou máxima sobrevivência e produção de anticorpos em peixes desafiados com a bactéria *Edwardsiella ictaluri* (Duncan e Lovell, 1994).

A carpa *Ctenopharyngodon idella* necessita da suplementação de pelo menos 1,60 a 2,08 mg de ácido fólico kg⁻¹. Os efeitos positivos da suplementação desta vitamina foram aumento do peso final, ganho de peso, maior imunidade, aumento do valor nutritivo de aminoácidos e ácido graxo no músculo (Shi et al., 2015, Shi et al., 2020). Em outros ciprinídeos, a vitamina aumentou o ganho de peso e melhorou imunidade de dourada (*Megalobrama amblycephala*) (Sesay et al., 2016) e de carpa asiática (*Catla catla*) (Khan e Khan, 2020) com a suplementação dietética de 0,68 a 0,82 mg kg⁻¹ e 0,4 mg kg⁻¹ respectivamente.

Baseado em critérios como melhor desempenho e aumento nas respostas imunológicas inatas, a exigência em ácido fólico na dieta foi relatada para outras espécies de peixes, como: 2,0 mg kg⁻¹ para salmão-do-Pacífico (*Oncorhynchus* spp.) (NRC, 2011), 0,8 mg kg⁻¹ para garoupa (*Epinephelus malabaricus*) (Lin et al., 2011), 2,0 mg kg⁻¹ para catfish (*Mystus nemurus*) (Hien e Doolgindachbaporn, 2011), 2 a 4 mg kg⁻¹ para esturjão (*Acipenser nudiiventris*) (Delsoz et al., 2017), 1,82 a 4,41 mg kg⁻¹ para esturjão siberiano (*Acipenser baerii*) (Falah et al., 2020), 2,0 mg kg⁻¹ para dourada portuguesa (*Sparus aurata*) (Amri et al., 2020), 0,74 a 1,15 mg kg⁻¹ para cabeça de cobra (*Channa punctatus*) (Zehra e Khan, 2020), 30 a 50 mg kg⁻¹ para tainha (*Mugil cephalus*) (Badran e Ali, 2021) e 1,42 a 1,46 mg.kg⁻¹ para black bass

(*Micropterus salmoides*) (Hang et al., 2022). Atualmente, os níveis de garantia de ácido fólico encontrado na maioria das rações comerciais para peixes onívoros variam entre 0,3 e 1,5 mg kg⁻¹. Esses resultados foram sistematizados e melhor detalhados na Tabela 1.

5. O ácido fólico melhora a saúde dos peixes

Uma suplementação dietética de ácido fólico proporciona inúmeras reações bioquímicas que melhora a saúde em geral dos peixes (Gazzali et al., 2016; Hansen et al., 2015). Tem papel importante para replicação, desenvolvimento e homeostase de células normais (Sesay et al., 2017; Shi et al., 2015). O ácido fólico também pode contribuir para produção dos eritrócitos e que ajuda a aumentar os níveis de hemoglobina. Estudos recentes revelam que suplementação desta vitamina aumenta a síntese mitocondrial de glicina a partir de serina, que é necessário para catalisar a primeira etapa da produção de hemoglobina (Hunter e Ferreira, 2009; Fernández-Murray et al., 2016; Falah et al., 2020). Além disso, tem participação na biossíntese de purina e pirimidina, que envolve a formação e maturação dos eritrócitos (Barros et al., 2009). O aumento dos eritrócitos e hemoglobina são importantes porque auxiliam no transporte de oxigênio pelo organismo (Ranzani-Paiva et al., 2013). Outro benefício é o aumento dos leucócitos em geral, isso significa que os peixes alimentados com dietas suplementadas com ácido fólico estão em condições mais saudáveis e que os ajudarão em promover a capacidade imunológica e antioxidante contra agentes patógenos (Chi et al., 2011; Lin et al., 2011, Falah et al., 2020). Nesse sentido, a suplementação dietética de ácido fólico melhora os parâmetros hematológicos nos peixes conforme relatado em *I. punctatus* (Duncan et al., 1993; Duncan e Lovell, 1994), *Oreochromis* sp. (Barros et al., 2009; Wu et al., 2016), *Acipenser* sp. (Delsoz et al., 2017; Falah et al., 2020), *C. catla* (Khan e Khan, 2020), *C. punctatus* (Zehra e Khan, 2020), *M. cephalus* (Badran e Ali, 2021), *O. mykiss* (Esmaili e Khara, 2014; Roudsari et al., 2021) e *M. salmoides* (Hang et al., 2022).

Outro fator relevante é que o ácido fólico reforça o sistema imunológico inato dos peixes com o aumento dos níveis séricos da atividade da lisozima (Khan e Khan, 2020). Isso é importante pois ela atua como um mediador endógeno contra parasitas, infecções bacterianas e virais (Saurabh e Sahoo, 2008). Assim, sua mensuração é importante para estudos voltados a saúde dos peixes (Song et al., 2021). Neste caso, a atividade de lisozima aumentou em *E. malabaricus* (Lin et al., 2011), *O. mykiss* (Esmaili e Khara 2014; Firouz et al., 2013), *C. idella* (Shi et al., 2015), *A. baerii* (Falah et al., 2020) e *C. catla* (Khan e Khan, 2020) que foram alimentados com dietas suplementada com ácido fólico.

Nos parâmetros bioquímicos do sangue, o ácido fólico pode aumentar as concentrações de proteínas totais séricas e suas frações. Isso é um indicativo de melhorias do estado fisiológico geral dos peixes (Coeurdacier et al., 2011) e da imunidade (Sesay et al., 2016). Isso sugere uma maior capacidade de utilizar esta vitamina e reverter em nutrientes essenciais para melhorar o crescimento e a saúde (Sesay et al., 2016; Khan e Khan, 2020; Falah et al., 2020). Em consequência desse aumento, o ácido fólico também pode elevar as concentrações da albumina, que desempenha papel importante para a osmorregulação e principalmente no transporte lipídico, de hormônios e no metabolismo energético (Ascenzi et al., 2013; Nelson e Cox, 2014; Andreeva, 2019; Andreeva, 2022). Além disso, também tem papel no transporte de anticorpos que auxilia na imunidade por meio da globulina (Chernyavskikh et al., 2019; Panigrahi et al., 2021). Estudos relatam que o aumento das proteínas totais melhora a saúde de *M. amblycephala* (Sesay et al., 2006), *A. baerii* (Falah et al., 2020) *C. catla* (Khan e Khan, 2020) a partir da suplementação de ácido fólico na dieta.

Além disso, o ácido fólico pode evitar danos no fígado dos peixes (Kopp et al., 2009; Abdel-Daim et al., 2015) e apresentam respostas de melhoria da saúde hepática (Rastiannasab et al., 2016; Badran e Ali, 2021). Assim, sugere-se que o ácido fólico possa prevenir ou retardar avanço da esteatose hepática nos animais com a diminuição dos níveis homocisteína (Tripathi et al., 2022). Outro ponto relevante é que o ácido fólico pode diminuir as enzimas transaminases. Isso auxilia na proteção hepática e é importante para manutenção do metabolismo e síntese de aminoácidos essenciais para o crescimento dos peixes (Falah et al., 2020). Essas enzimas estão presentes em maior parte nos hepatócitos e quando os níveis são elevados, são liberadas no sangue em consequência de lesão hepática de naturezas diversas (Abdel-Daim et al., 2015). O ácido fólico também é importante para o equilíbrio da fosfatase alcalina, que também é fundamental pela saúde hepática. Caso haja desregulações, pode indicar obstrução do fluxo biliar. Ela é responsável por remover grupos fosfatos de diversas de moléculas, entre elas nucleotídeos e proteínas (Khan e Khan, 2020). Estudos indicam a importância do ácido fólico para manutenção funcional e saúde hepática dos peixes conforme relatado em *O. niloticus* (Wu et al., 2016), *A. baerii* (Falah et al., 2020), *C. catla* (Khan e Khan, 2020) *M. salmoides* (Hang et al., 2022).

O ácido fólico também atua no equilíbrio entre as espécies reativas e defesas antioxidantes, que é mantido pela presença de antioxidantes naturais e enzimas antioxidantes (Lubrano e Balzan, 2015; Amri et al., 2020). Os peixes desenvolvem uma complexa grade de defesa antioxidante como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidação lipídica

(LPO) e Glutathionas (GSH), que protegem contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus subprodutos (Sáez e Están-Capell, 2017; Aliko et al., 2018; Liang et al., 2022). Nos peixes, estudos associam essas atividades ligadas ao fígado e músculo durante a fase de crescimento (Shi et al., 2020; Zehra e Khan 2020). A enzima SOD catalisa a dismutação de radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio para que possa eliminar o excesso de ROS (Nguyen et al., 2020; Eleutherio et al., 2021). O aumento dessa atividade foi relatado em *S. aurata* (Amri et al, 2020), *C. idella* (Shi et al, 2020) e *C. punctatus* (Zehra e Khan, 2020) com a suplementação dietética de ácido fólico.

O ácido fólico também aumenta a atividade CAT e como benefício anula a ação tóxica do peróxido de hidrogênio. Nos peixes, o fígado é o órgão mais investigado e sua atividade aumenta com suplementação de ácido fólico na dieta, conforme observado em *C. punctata* (Zehra e Khan, 2020), *E. malabaricus* (Lin et al., 2011), *A. baerii* (Falah et al., 2020) e *O. mykiss* (Roudsari et al., 2021). Outro benefício documentado é que os animais alimentados com dieta suplementada com ácido fólico diminuíram a atividade LPO (Moat et al., 2003; Ebaid et al., 2013), isso foi relatado no fígado da *E. malabaricus* (Lin et al., 2011) e *M. amblycephala* (Sesay et al., 2016). Com isso, o ácido fólico pode reduzir em até 80% a LPO (Amri et al., 2020).

Por último, a glutathiona é o principal antioxidante produzido pelos animais (Xue et al., 2022). Ela neutraliza os radicais livres, auxilia no processo de destoxificação hepático, destoxificação de metais pesados, tem papel vital para a função mitocondrial e na manutenção de DNA, cofator para várias enzimas antioxidantes e reciclagem dos antioxidantes (Ming et al., 2018). O ácido fólico é precursor na via metabólica em que transforma homocisteína em cisteína, que posteriormente forma a glutathiona (Cherukad et al., 2012). O aumento de sua atividade é vital para saúde dos peixes, e é impulsionado pela suplementação de ácido fólico conforme relatado em *C. idella* (Shi et al., 2015; Shi et al., 2020), *A. baerii* (Falah et al., 2020) e *O. mykiss* (Roudsari et al., 2021).

Tabela 1. Sistematização dos principais resultados de saúde, crescimento e reprodução encontrado em pesquisas com a suplementação de ácido fólico para peixes.

Espécie	Fase de criação	Necessidade	Resultados	Resposta	Referências
<i>Ictalurus punctatus</i>	Crescimento (3,00 – 842,00 g)	4,0 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso. Aumento do número de eritrócitos, leucócitos e porcentagem do hematócrito.	Positiva	Duncan et al., (1993)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crescimento (1,36 - 86,92 g)	0,3 - 0,6 mg kg ⁻¹	Maior peso final, aumento da sobrevivência e menor conversão alimentar. Capacidade de recuperação do crescimento em peixes com deficiência de ácido fólico.	Positiva	Cowey e Woodward (1993)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Crescimento (1,50 – 44,00 g)	4,0 mg kg ⁻¹	Aumento no hematócrito e número de eritrócitos. Aumenta imunidade e sobrevivência ao desafio por <i>E. ictaluri</i> .	Positiva	Duncan e Lovell (1994)
			Exclusão da vitamina C da dieta pode anular os efeitos da suplementação de ácido fólico	Negativa	
<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	Crescimento (0,41 - 4,50 g)	0,82 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso e melhor eficiência alimentar.	Positiva	Shiau e Huang (2001)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Crescimento (14,50 - 191,40 g)	0,5 - 1,0 mg kg ⁻¹	Diminuição da conversão alimentar. Aumento do número de eritrócitos, hemoglobina e volume corpuscular médio. Aumenta imunidade e manutenção das respostas fisiológicas após estresse em baixas temperaturas.	Positiva	Barros et al. (2009)
<i>Mystus nemurus</i>	Crescimento (18,74 - 41,54 g)	2,0 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso, crescimento, eficiência proteica e diminuição da conversão alimentar.	Positiva	Hien e Doolgindachbaporn (2011)
<i>Epinephelus malabaricus</i>	Crescimento (7,28 - 25,80 g)	0,69 - 0,88 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso e eficiência alimentar. Menor índice hepatossomático. Atuação antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade de catalase.	Positiva	Lin et al. (2011)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crescimento (0,25 - 37,40 g)	2,0 mg kg ⁻¹	Maior peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e menor conversão alimentar.	Positiva	Shafaeipour et al. (2011)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crescimento (6,00 - 24,20 g)	6,0 mg kg ⁻¹	Maior peso final e ganho de peso. Aumento do volume corpuscular médio. Aumento do número de leucócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. Melhorou o sistema imunológico com aumento da Imunoglobulina e atividade lisozima.	Positiva	Firouz et al. (2013)
			Diminuição da concentração de hemoglobina, número de eritrócitos, monócitos e porcentagem de hematócritos	Negativa	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crescimento (8,10 - 32,10 g)	2,5 mg kg ⁻¹	Maior peso final, comprimento e sobrevivência. Menor conversão alimentar. Aumento do hematócrito, hemoglobina corpuscular média e concentração média de hemoglobina corpuscular. Diminuição do volume corpuscular médio.	Positiva	Esmaeili e Khara (2014)

			Melhorou o sistema imunológico com aumento da Imunoglobulina e atividade lisozima		
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Crescimento (267,70 - 747,22 g)	1,6 - 2,08 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso, peso final, crescimento e diminui conversão alimentar. Proteção e saúde das brânquias. Manutenção da imunidade adequada com base na fosfatase ácida e atividade de lisozima. Diminuiu proteína carbonilada e malondialdeído. Atuação antioxidante com aumento da superoxidação dismutase sérica, atividade de catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase. Atuou na regulação da expressão gênica de citocinas, proteínas, enzimas antioxidantes, fator nuclear kappa B p65 e quinase na cadeia de miosina.	Positiva	Shi et al. (2015)
<i>Megalobrama amblycephala</i>	Crescimento (27,10 - 69,45 g)	0,68 - 0,82 mg kg ⁻¹	Maior peso final, ganho de peso, crescimento específico e a taxa de eficiência alimentar. Aumento da proteína bruta no músculo e proteína total sérica. Aumento da imunidade com imunoglobulina. Aumento da atividade enzimática de amilase, lipase, tripsina e quimotripsina no intestino. Atuação antioxidante com aumento da superoxidação dismutase sérica e atividade de catalase.	Positiva	Sesay et al. (2016)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Crescimento (60,23 - 315,60 g)	0,4 - 0,7 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso. Aumento do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito. Diminuição das atividades de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.	Positiva	Wu et al. (2016)
<i>Acipenser nudiiventris</i>	Crescimento (12,40 - 60,00 g)	2,0 - 4,0 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso, crescimento e diminuição da conversão alimentar. Melhora o fator de condição. Aumenta o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito. Aumento dos níveis de imunoglobulina e leucócitos. Efeito sinérgico com <i>Pediococcus acidilactici</i> na dieta.	Positiva	Delsoz et al. (2017)
<i>Megalobrama amblycephala</i>	Crescimento (27,10 - 69,45 g)	1,0 - 2,0 mg kg ⁻¹	Aumento das proteínas totais séricas, superoxidação dismutase sérica e atividade de catalase hepática e a expressão de HSP60, HSP70 e HSP90. Diminuição das atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, glicose, cortisol e peroxidação lipídica hepática.	Positiva	Sesay et al. (2017)
<i>Acipenser baerii</i>	Crescimento (4,36 - 18,28 g)	1,82 - 4,41 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso e menor conversão alimentar. Aumento do número de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina e hematócrito. Aumento da atividade da lisozima e proteína total sanguínea. Diminuição do aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Atuação antioxidante com aumento	Positiva	Falah et al. 2020

			da superoxidação dismutase sérica, atividade de catalase e glutathione peroxidase.		
<i>Catla catla</i>	Crescimento (3,40 - 43,57 g)	0,4 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso e taxa de crescimento. Menor conversão alimentar. Diminuição do índice hepatossomático. Aumento no número de eritrócitos e hemoglobina. Aumento da atividade lisozima, fosfatase alcalina e proteína total sanguínea. Atuação antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e aumento da superoxidação dismutase sérica e atividade de catalase.	Positiva	Khan e Khan (2020)
<i>Sparus aurata</i>	Crescimento (2,99 - 16,91 g)	2,0 mg kg ⁻¹	Maior peso final, ganho de peso e taxa de crescimento. Menor índice hepatossomático. Atuação antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e aumento da superoxidação dismutase sérica e atividade de catalase.	Positiva	Amri et al. (2020)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Crescimento (267,70 - 747,22 g)	1,87 e 1,80 mg kg ⁻¹	Aumento de proteína e lipídeos e diminuição da umidade no músculo. Aumentou o valor nutritivo de aminoácidos e ácido graxo no músculo. Aumentou o pH e diminuiu o lactato no músculo. Diminuiu proteína carbonilada, malondialdeído e espécies reativas ao oxigênio. Atuação antioxidante com aumento da superoxidação dismutase sérica, atividade de catalase, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione S-transferases. Atuou na regulação da expressão gênica de proteína 1a e 1b associada a ECH semelhante a Kelch, NF-E2-fator relacionado 2 e caseína quinase 2 no músculo.	Positiva	Shi et al. (2020)
			Excesso de ácido fólico na dieta diminuiu a capacidade antioxidante e qualidade do músculo.	Negativa	
<i>Channa punctatus</i>	Crescimento (4,88 - 48,85 g)	0,74 - 1,15 mg kg ⁻¹	Maior peso final, ganho de peso e sobrevivência. Menor conversão alimentar. Aumento no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina. Atuação antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e aumento da superoxidação dismutase sérica e atividade de catalase.	Positiva	Zehra e Khan (2020)
<i>Mugil cephalus</i>	Crescimento (39,10 - 54,50 g)	30,0 – 50,0 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso, peso final e crescimento. Melhor fator de condição. Aumento do número de eritrócitos, leucócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito.	Positiva	Badran e Ali (2021)
			Aumento das atividades de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.	Negativa	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crescimento (31,00 - 100,23 g)	1,0 mg kg ^{-1*}	Aumento do ganho de peso, crescimento e fator de condição. Diminuição da conversão alimentar. Aumento do número de	Positiva	Roudsari et al. (2021)

			eritrócitos, leucócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito. Aumento da imunidade com atividade Lisozima e imunoglobulina. Atividade antioxidante com aumento da atividade de superoxidação dismutase sérica, catalase e glutathione peroxidase.		
<i>Micropterus salmoides</i>	Crescimento (14,50 - 46,78 g)	1,42 - 1,46 mg kg ⁻¹	Maior Peso final, ganho de peso e a taxa de crescimento. Reduziu os índices viscerossomático e hepatossomático. Aumento do número de eritrócito, taxa de hematócrito e concentração de hemoglobina. Diminuiu a atividade da alanina aminotransferase. Aumento da atividade catalase e protegeu a saúde do fígado. Diminuiu a sobrevivência	Positiva Negativa	Hang et al. (2022)
<i>Huso huso</i>	Crescimento (6,58 – 19,17 g)	3,72 mg kg ⁻¹	Maior ganho de peso e menor conversão alimentar. Aumento de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Diminuiu a atividade da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Aumentou a resistência em estresse de hipóxia.	Positiva	Yeganeh et al. (2022)
<i>Danio rerio</i>	Reprodução (Embrião)	50 µM**	Diminui o edema cardíaco, atuou na formação dos olhos e aumentou o comprimento dos embriões. Diminui defeitos cardíacos induzidos pelo etanol.	Positiva	Sarmah e Marrs (2013)
<i>Danio rerio</i>	Reprodução (Embrião)	100 µM**	Aumento das taxas de eclosão e sobrevivência. Diminui a taxa de malformação e melhora o desenvolvimento cardíaco e neural dos embriões. Diminuiu a toxicidade do arsenito. Resgatou o efeito deletério do arsenito no desenvolvimento neural, protege a estrutura e dinâmica do axônio do neurônio. Atuou na regulação positiva da expressão de Dvr1/GDF1 (decapentaplégico e relacionado a Vg-1 e fator de diferenciação de crescimento 1).	Positiva	Ma et al. (2015)
<i>Danio rerio</i>	Reprodução (Embrião)	0,05 µM**	Diminui os defeitos cardíacos embrião. Atuou na regulação de genes alvo de AhR. Atuou através da sinalização AhR e Wnt/b-catenina.	Positiva	Yue et al. (2017)
<i>Danio rerio</i>	Reprodução (Embrião)	75 µM**	Diminui os defeitos morfológicos no coração, olhos e inflação da bexiga natatória. Regulou atividade natatória e diminuiu a toxicidade do etanol.	Positiva	Cadena et al. (2020a)
<i>Labeo rohita</i>	Reprodução (350,00 g)	4,0 mg kg ⁻¹	Aumentou o índice gonadosomático. Regulou diferentes hormônios reprodutivos e os níveis de vitelogenina. Efeito inibitório de dióxido de titânio nos níveis de vitelogenina e testosterona. Aumento da atividade de superoxidação	Positiva	Anagha et al. (2021)

			dismutase sérica hepática e ovariana e reduziu a atividade da catalase.		
			Reduz a ocorrência de edemas cardíacos.	Positiva	
<i>Danio rerio</i>	Reprodução (Embrião)	100 µM**	Superdosagem de ácido fólico pode estar relacionado a doenças cardiovascular no início do desenvolvimento embrionário, ocorrência de disfunção genética e letalidade embrionária, sugere substituição do ácido fólico por MTHF-Ca (forma ativa).	Negativa	Lian et al. (2022)

*Nanoquitosana revestida com ácido fólico; **Diluição na água de incubação (1 µM = 10⁻⁶ mol/l)

6. Ácido fólico na nutrição de reprodutores e embriologia

No geral, as informações sobre os efeitos da deficiência ou suplementação dietética de ácido fólico para machos e fêmeas de peixes em atividade reprodutiva são escassas na literatura. Os dados disponíveis são insuficientes para garantir a formulação e a produção de rações que atendam às exigências desta vitamina para reprodutores. De forma geral, a suplementação do ácido fólico para reprodutores de peixes atua de forma direta sobre a reprodução e o desenvolvimento embrionário, além disso, também atua de forma indireta sobre a reprodução dos peixes por meio da melhora do *status* de saúde do animal.

As poucas informações disponíveis sugerem que a suplementação de 4 mg kg⁻¹ ácido fólico em fêmeas de *Label rohita* aumenta o índice gonadossomático, regula os níveis de FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante) e o estradiol sérico. Além disso, o ácido fólico combinado a vitamina E proporciona uma regulação da atividade de superóxido dismutase e catalase no fígado e ovário, tendo papel antioxidante (Anagha et al., 2021). Nesse sentido, o ácido fólico é importante na regulação do ritmo da gametogênese, uma vez que interfere nos níveis plasmáticos dos hormônios reprodutivos e na vitelogênese.

Estudos mostram que a ação antioxidante que o ácido fólico proporciona é importante para reprodução devido agir no início do desenvolvimento gonadal (Ma et al., 2015; Anagha et al., 2021). Ele regula o metabolismo vitelogênico necessário para o desenvolvimento gonadal, eliminando os radicais livres nas gônadas e no ovo após fertilização (Beltagy et al., 2016; Anagha et al., 2021). Isso pode evitar danos aos lipídios, proteínas e DNA na formação do embrião (Guerra et al., 2004; Schieber e Chandel, 2014).

Até o momento, não foi avaliado a transferência do ácido fólico dietético no desenvolvimento embrionário dos peixes ao vitelo. Porém, estudos envolveram a exposição de embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) durante a incubação em água contendo o ácido fólico (Cadena et al., 2020a; Cadena et al., 2020b). Apesar de não ser uma suplementação dietética, esses ensaios *in vitro* são importantes porque também apresentaram benefícios do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário (Yue et al., 2017). Além disso, o *zebrafish* pode ser considerado um modelo biológico tanto para embriologia de outros peixes quanto em humanos (Cassar et al., 2019; Teame et al., 2019; Hajam et al., 2021). Na embriologia, o ácido fólico apresentou-se como agente antitoxicológico e sua importância é fundamental para inibir anormalidades induzidas pela exposição ao arsênio e etanol nos embriões (Sarmah e Marrs, 2013; Ma et al., 2015, Cadena et al., 2020a). O ácido fólico evita edema no pericárdio e perturbações no miocárdio, endocárdio e na morfogênese do coxim endocárdico dos embriões

causados pelo etanol, além disso auxilia na formação dos olhos (Sarmah e Marrs, 2013). O ácido fólico também resgatou as normalidades no desenvolvimento embrionário induzidas por arsenito. Isso refletiu em melhorias no aumento da taxa de eclosão e sobrevivência das larvas, também na diminuição da taxa de malformações e melhora o desenvolvimento cardíaco e neural de embriões de peixe-zebra (Ma et al., 2015).

Em outros estudos, o ácido fólico diminuiu a taxa de malformações cardíacas de embriões de *zebrafish* exposto a EOM-PM2.5 (matéria orgânica extraída de ar poluído na zona urbana de Wuhan na China) (Yue et al, 2017). Ainda, o ácido fólico diminuiu malformações como deformações no olho, na coluna vertebral e da cauda, e por fim, também previniu alterações no comportamento, equilíbrio corporal e respostas ao estímulo visual das larvas induzidos pelo etanol (Cadena et al., 2020a).

Estes resultados sugerem que o ácido fólico pode ser positivo no combate aos efeitos deletérios causados por fatores ambientais, genéticos, xenobióticos ou condições fisiológicos e nutricionais impostos aos embriões e larvas de peixes tanto em ambiente natural quanto na piscicultura (Lall e Lewis-McCrea, 2007). Estes efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário podem apresentar impactos na saúde dos animais (Nagano et al., 2007), resultando em perdas de crescimento e até mortalidade (Gavaia et al., 2009).

Espera-se que a inclusão de ácido fólico na dieta de reprodutores possa refletir em melhorias da qualidade das larvas. Com o armazenamento do ácido fólico no fígado dos peixes (Falah et al., 2020), podemos supor que no período reprodutivo das fêmeas, os hepatócitos iniciam a produção de vitelogenina (Sullivan e Yilmaz, 2018), processo em que o ácido fólico teve efeito regulatório (Anagha et al., 2021). Esta proteína se formará a partir dos nutrientes armazenados no fígado (Honji e Moreira, 2017), incluindo o ácido fólico. 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 (Mommsen e Korsgaard, 2008; Fernandez-Palacios et al., 2011)

O ácido fólico além da sua capacidade de proteger o embrião de alguns compostos químicos nocivos na água durante a incubação, também pode influenciar no desenvolvimento embrionário a partir da formação do tubo neural, que posteriormente se converte no cérebro, medula espinhal e coluna vertebral (Blanco et al., 2016; Millacura et al., 2017). Assim, sugere melhorias no aumento da eclosão de larvas mais saudáveis, vigorosas e com baixa ocorrência de malformações.

Portanto, é imprescindível que novas pesquisas sejam direcionadas para este tema, a fim de se buscar um maior entendimento e compreensão sobre dos efeitos e das relações da suplementação dietética de ácido fólico e o desempenho reprodutivo de machos e fêmeas e, a qualidade e o vigor das proles. Assim, como a importância dessa vitamina já foi comprovada para outros vertebrados em idade reprodutiva (Wilson et al., 2015; Gomes et al., 2022), é claro que a sua aplicação na piscicultura contribuirá para o desenvolvimento deste setor, por meio da melhora da saúde e consequentemente da reprodução dos peixes (Anagha et al., 2021).

7. Suplementação dietética de ácido fólico para outros organismos aquáticos

Além dos peixes, a suplementação de ácido fólico também é importante para outras modalidades da aquicultura como equinodermocultura, malacocultura e carcinicultura. O ácido fólico promoveu ganho de peso, imunidade e capacidade antioxidante em pepinos-do-mar suplementado com 7 mg kg⁻¹ (Shi et al., 2022). O molusco marinho *Haliotis discus* aumentou o ganho de peso quando suplementado com 2,62 a 5,29 mg kg⁻¹ de ácido fólico (Miao et al., 2013). O camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) necessita de 2,0 mg kg⁻¹ para aumento da sobrevivência, crescimento e atividades antioxidantes e enzimáticas (Asaikkutti et al., 2016). O ácido fólico também influenciou no crescimento do camarão capim (*Penaeus monodon*) quando suplementado com 1,9 a 2,1 mg kg⁻¹ (Shiau e Huang, 2001b). O caranguejo (*Eriocheir sinensis*) necessita de 2,29 a 2,90 mg kg⁻¹ para o crescimento, sobrevivência, aumento da atividade de lisozima, fosfatase ácida e fosfatase alcalina (Wei et al., 2016).

8. Estabilidade e perdas do ácido fólico nas rações para organismos aquáticos

Apesar da evidente necessidade da suplementação de ácido fólico nas rações para organismos aquáticos, em geral para peixes, as rações são processadas na forma extrusada. Esta forma de processamento das rações expõe o ácido fólico às condições de elevadas temperaturas e pressão. Neste caso, durante o processamento da ração, o ácido fólico é instável, podendo diminuir em 10% de sua eficiência em temperaturas entre 100 e 105 °C e, perdas de até 30% em temperaturas acima de 130°C (Coelho, 2002). Além da instabilidade térmica, existem perdas desta vitamina durante a alimentação, quando a lixiviação dessa vitamina inicia a partir de 10 segundos em rações com peletes de 2mm (Slinger et al., 1979). Por outro lado, após a ração estar processada e ensacada, o ácido fólico possui solubilidade baixa quando armazenada adequadamente em temperatura ambiente, podendo ser deteriorada pela luz do sol e calor (Araújo et al., 2011; Gazzali et al., 2016). Em geral, as rações comerciais possuem validade de

90 dias, justamente pela garantia da qualidade nutricional e dos padrões pré-estabelecidos (Pastore et al., 2013).

9. Perspectivas

Para uma população mundial que deverá ultrapassar 9 bilhões de pessoas até 2050, a aquicultura será amplamente reconhecida e priorizada pelos países como ferramenta para a produção de proteína animal (Béné et al., 2015; FAO, 2020). A expectativa da produção global da aquicultura será de 109 milhões de toneladas em 2030, um aumento de 32% (26 milhões de toneladas) em relação a 2018 (FAO, 2020). Como os peixes representam a maior parte da produção aquícola mundial, acompanhando essa tendência, haverá aumento pela demanda de juvenis de qualidade e com vigor para atender às demandas de mercado. Com isso, surgirão novos laboratórios para produção de proles, os quais precisarão atender às exigências pela entrega de alevinos vigorosos e resistentes. Neste sentido, o conhecimento sobre a suplementação dietética do ácido fólico para os reprodutores de peixes surge como alternativa importante para promover o aumento da produtividade em sistemas intensivos e para promover o fornecimento de proles de qualidade.

Grande parte do crescimento da atividade piscícola será em regiões onde possuem terras de baixo custo, clima quente e com proximidade dos produtores de grãos e indústria de rações. Isso possibilitará menor custo de produção. Além disso, novas tecnologias surgirão principalmente com foco em sistemas de produção e uso de suplementos e aditivos para otimização do tempo de criação e maior produtividade (Valenti et. al., 2021; Naylor et al., 2021). Por isso, o conhecimento sobre as exigências vitamínicas na nutrição dos peixes contribuirá para a consolidação desta cadeia produtiva.

Assim, o adequado uso do ácido fólico certamente contribuirá para o desenvolvimento de sistemas produtivos mais eficientes, uma vez que esta vitamina está envolvida em diversas via metabólicas como a formação e desenvolvimento do tubo neural, a hematopoiese, a síntese do DNA e RNA, prevenção de malformações dos embriões, capacidade de neutralizar a toxicidade de compostos químicos nocivos e, ação antioxidante nas gônadas que resulta em melhora na qualidade dos ovócitos e espermatozóides. O conjunto destes benefícios resultará em animais mais saudáveis e com maior longevidade produtiva.

De modo geral, a qualidade das formulações e da produção das rações melhorou muito nos últimos anos, estando mais completas e atendendo às exigências impostas pelos sistemas produtivos intensivos. Contudo, apesar de a nutrição dos reprodutores ser uma ferramenta

poderosa na produção de proles de qualidade para atender à atual demanda de mercado, a disponibilidade de dietas especializadas para machos e fêmeas em atividade reprodutiva ainda não estão facilmente disponíveis nos diferentes mercados. Assim, espera-se que futuramente sejam desenvolvidos os conhecimentos científicos e tecnológicos que permitam a produção em escala industrial destas rações e que estas contribuam para a consolidação da piscicultura mundial.

10. Conclusão

O ácido fólico é uma vitamina essencial para alimentação de peixes. Uma suplementação entre 0,4 e 4,0 mg kg⁻¹ atendeu a necessidade nutricional para maioria das espécies tropicais nas fases inicial e de crescimento. Essa suplementação variou de acordo com estágio de vida, sistemas de criação e espécies de peixe. O ácido fólico também apresenta interações com as vitaminas B6, B12, C, E e probióticos dietéticos.

O ácido fólico é fundamental para formação e maturação de glóbulos vermelhos, melhora a imunidade dos peixes e fornece proteção contra infecção bacteriana. Também está diretamente envolvido no crescimento, saúde e participa de muitos processos fisiológicos como síntese de purina e pirimidina, metabolismo de aminoácidos e síntese de DNA. No entanto, o papel do ácido fólico no crescimento, parâmetros sanguíneos e atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica, superóxido dismutase e catalase são as funções mais investigadas.

A deficiência de ácido fólico retarda o crescimento, piora conversão alimentar, causa anorexia, anemia em geral, alterações no baço, coloração escura, letargia, pigmentação da pele escura e peixes com nadadeiras frágeis. Finalmente, o ácido fólico deve desempenhar um papel importante na reprodução dos peixes. Os dados disponíveis sugerem que o ácido fólico pode melhorar o desenvolvimento dos embriões, a eclosão dos ovos e a qualidade das proles. Apesar destas informações, os estudos sobre a exigência dietéticas de ácido fólico para reprodutores e larvicultura ainda são escassas.

11. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) pelo apoio a bolsa de estudo (Edital n.º 012/2021 – POSGFE) referente ao processo n.º 53855.850.4653.06092021-79853.

12. Referências

- Abdel-Daim MM, Abdelkhalek NK, Hassan AM. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. and Environ.* 2015; 111:146-152. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.019>
- Akhtar MS, Ciji A. Pyridoxine and its biological functions in fish: current knowledge and perspectives in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science e Aquaculture*, 2020; 29(2):260-278. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1813081>
- Alaburda J, Shundo L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2007; 66(2):95-102.
- Aliko V, Qirjo M, Sula E, Morina V, Faggio C. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish Shellfish Immunol*, 2018; 76: 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.042>
- Alonge S, Melandri M, Leoci R, Lacalandra GM, Caira M, Aiudi GG. 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*, 2019, 9(34). <https://doi.org/10.3390/ani9020034>
- Alsop D, Matsumoto J, Brown S, Van Der Kraak G. Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *General and comparative endocrinology*, 2008;156(1): 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.11.008>
- Alvarez-Lajonchère L. Nutrición de reproductores de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuicola*. 2006; 8: p 1-19
- Amaduruonye W, Nathaniel J, Agida CA, Ibrahim Y, Ndukauba CA, Herbert U. Semen and hematological responses of rabbit bucks administered oral folic acid. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021; 6(1):1-7. <https://doi.org/10.31248/JASVM2020.239>
- Amri A, Kessabi K, Bouraoui Z, et al. Effect of melatonin and folic acid supplementation on the growth performance, antioxidant status, and liver histology of the farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under standard rearing conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020; 46(6):2265-2280. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-020-00879-5>
- Anagha T, Gupta S, Sahu NP, et al. Titanium dioxide nanoparticles alter reproductive and thyroid hormones of *Labeo rohita* females: amelioration through vitamin E and folic acid. *Aquaculture*, 2021; 539:736633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736633>
- Andreeva AM. The Strategies of Organization of the Fish Plasma Proteome: with and without Albumin. *Russian Journal of Marine Biology*, 2019; 45(4): 263-274. <https://doi.org/10.1134/s1063074019040023>
- Andreeva AM, 2022. Evolutionary Transformations of Albumin Using the Example of Model Species of Jawless Agnatha and Bony Jawed Fish (Review). *Inland Water Biology*, 2022; 15(5):641-658. <https://doi.org/10.1134/S1995082922050029>
- Aoe H, Masuda I, Saito T, Takada T. Water-soluble vitamin requirements of carp. 5. Requirement for folic acid. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 1967; 33:1068-1071.
- Arai S, Nose T, Hashimoto Y. Qualitative requirements of young eels, *Anguilla japonica*, for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms. *Bull. Freshwater Res. Lab.* 1972; 22:69-83

- Araújo MM, Marchioni E, Bergaentzle M, Zhao M, Kuntz F, Villavicencio ALCH. Irradiation stability of folic acid in powder and aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011; 59(4):1244-1248. <https://doi.org/10.1021/jf103977q>
- Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 2005;16: 253-66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.013>
- Asaikkutti A, Bhavan PS, 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*, 2016; 464:136–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.014>
- Ascenzi P, Masi A di, Leboffe L, Alberio T, Fanali G, Fasano, M. Molecular phylogenetic analyses of albuminoids reveal the molecular evolution of allosteric properties. *Iubmb Life*, 2013; 65(6):544-549. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1164>
- Badran MF, Ali MAM. Effects of folic acid on growth performance and blood parameters of flathead grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 2021; 536: 736459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736459>
- Baldisserotto B, Gomes LC. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ª edição, Santa Maria, Editora UFSM; 2020.
- Barros MM, Ranzani-Paiva MJT, Pezzato LE, Falcon DR, Guimarães IG., Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, 2009; 40(8): 895-903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02175.x>
- Barroso RM, Muñoz AEP, Cai J. Social and economic performance of tilapia farming in Brazil, No. 1181. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Rome; 2019. <https://doi.org/10.4060/CA5304EN>
- Bastos DN de, Freccia A, Negreiros Sousa SM de, Graça WJ da, Meurer F, Bombardelli RA. Hipervitaminose induzida pela suplementação de vitamina A em rações para pós-larvas de tilápia do Nilo. *Semina: Ciências Agrárias*, 2013; 34(5):2465-2472. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2465>
- Beato S, Toledo-Solís FJ, Fernández I. Vitamin K in Vertebrates' Reproduction: Further Puzzling Pieces of Evidence from Teleost Fish Species. *Biomolecules*, 10, 2020; 9: 1303. <https://doi.org/10.3390/biom10091303>
- Beltagy DM, Mohamed TM, El Said AS, Tousson E. Beneficial role of ascorbic and folic acids antioxidants against thyroxine-induced testicular dysfunction in hyperthyroid rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016; 23:17246–17254. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6876-x>
- Béné C, Barange M, Subasinghe R, *et al.* Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. *Food Security*. 2015; 7:261–274. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0427-z>
- Bhujel RC, Little DC, Hossain A. Reproductive performance and the growth of pre-stunted and normal Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish at varying feeding rates. *Aquaculture*, 2007; 273:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.022>
- Bhujel RC, Yakupitiyage A, Turner WA, Little DC. Selection of a commercial feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish breeding in a hapas-in-pond system. *Aquaculture*, 2001; 194: 303-314. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00521-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00521-4)

- Bhujel RC. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*, 2000; 181:37–59. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00217-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00217-3)
- Blanco AM. Hypothalamic and Pituitary-Derived Growth and Reproductive Hormones and the Control of Energy Balance in Fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2019;113322. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ygcen.2019.113322>
- Blanco R, Colombo A, Pardo R, Suazo J. Maternal biomarkers of methylation status and non-syndromic orofacial cleft risk: a meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2016; 45(11):1323–1332. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.06.011>
- Blom HJ, Shaw, GM, Heijer MD, Finnell, RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006; 7(9):724-731. <https://doi.org/10.1038/nrn1986>
- Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, 2010; 165:535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- Bombardelli RA, Sanches EA, Tessaro L, Buzzi AH, Martins CVB, 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*, 2015; 43(3):566-574. <http://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-18>
- Bombardelli RA, Hayashi C, Natali MRM, Sanches EA, Piana PA. Reproductive and animal performance and lipids deposition in hepatocytes for Nile tilapia females fed different levels of energy in the ration. *R. Bras. Zootec*, 2009; 38(8):1391–1399. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000800001>
- Bombardelli RA, Goes ESR, Sousa SMN, et al. Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing different levels of protein and energy. *Aquaculture*, 2017; 479:817-823. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.031>
- Bombardelli RA, Oliveira EJ de, Syperreck MA, et al. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. *Aquaculture*, 2021a; 530: 735724. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735724>
- Bombardelli RA, Mewes JK, Buzzi AH, et al. Diets containing crude glycerin modify the ovary histology, cause reproductive harm on Nile tilapia females and impair the offspring quality. *Aquaculture*, 2021b; 533:736098. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736098>
- Bombardelli RA, Henriques JK dos S, Cestari MM, Marques AEML, Chagas TV, 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*, 2023; 562:738682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738682>
- Borba MRD, E Sá MVC, De Abreu J.S. Vitaminas e Minerais. In: Fracalossi DM, Cyrino JEP, eds. *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª ed. Aquabio; 2013:121-167.
- Bortolus R, Filippini F, Cipriani S, et al. Efficacy of 4.0 mg versus 0.4 mg Folic Acid Supplementation on the Reproductive Outcomes: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 2021; 13:4422. <https://doi.org/10.3390/nu13124422>
- Bricknell I, Dalmo RA. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture, *Fish & Shellfish Immunology*, 2005; 19(5):457-472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.008>

Bromage NR. Broodstock management and seed quality- General considerations. In: Bromage NR, RobertsRJ, eds. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. 1st edi. Blackwell Science; 1995:1-25.

Cadena PG, Cadena MRS, Sarmah S, Marrs JA. 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, 2020a; 96:249–257. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.07.013>

Cadena PG, Cadena MRS, Sarmah S, Marrs JA. Protective effects of quercetin, polydatin, and folic acid and their mixtures in a zebrafish (*Danio rerio*) fetal alcohol spectrum disorder model. Neurotoxicology and Teratology, 2020b; 106928. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106928>

Canyurt MA, Akhan S. Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2008; 8(1):171-175.

Carvalho PLPF, Koch JFA, Cintra, FT, et al. Available phosphorus as a reproductive performance enhancer for female Nile tilapia. Aquaculture, 2018; 486:202-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.023>

Cassar S, Adatto I, Freeman JL, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chemical Research in Toxicology, 2019; 33(1):95-118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>

Cejas JR, Almansa E, Jérez S, Bolaños A, Felipe B, Lorenzo A. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, 2004; 139(B):209-216. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.010>

Chavarro JE, Cardozo E, Afeiche M. Nutrition in Human Fertility. In: Jungheim E eds. Obesity and Fertility. 1st edi. Springer New York; 2015;31-72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2611-4_4

Chavarro JE, Schlaff WD. Introduction: Impact of nutrition on reproduction: an overview, Fertility and Sterility, 2018; 110(4):557-559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.07.023>

Chernyavskikh SD, Borodaeva ZA, Borisovskiy IP, Ostapenko SI, Galtseva OA., Blood protein spectrum in representatives of the fish superclass. EurAsian Journal of BioSciences, 2019; 13(2):979-981.

Cherukad J, Wainwright V, Watson E D. Spatial and temporal expression of folate-related transporters and metabolic enzymes during mouse placental development. Placenta, 2012; 33(5):440-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.02.005>

Chi X. Zhang T, Zhao J, Feng J. 2011. Study on extraction conditions and antioxygenic activity of folic acid. Modern Food Science and Technology, 2011; 27(10):1234–1237.

Cho CY, Bureau DP. 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. Aquaculture Research, 2001; 32:349-360. <https://doi.org/10.1046/j.1355557x.2001.00027.x>

Cieřlik E, Cieřlik I. Occurrence and significance of folic acid. Pteridines, 2018; 29(1):187-195. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2018-0017>

Clagett-Dame M, DeLuca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. Annual review of nutrition, 2002; 22(1):347-381. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102745E>

- Coelho M, eds. Vitamin stability in premixes and feeds. A practical approach in ruminant diets. Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Univ. Florida; 2002:127-145.
- Coeurdacier JL, Dutto G, Gasset E, Blancheton JP. Is total serum protein a good indicator for welfare in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? Aquat. Living Resour., 2011; 24 (2):121-127. <https://doi.org/10.1051/alr/20111130>
- Coldebella IJ, Neto JR, Mallmann CA, et al. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. Aquaculture, 2011; 312(1-4):137-144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.021>
- Coussirat C, Batista C, Schneider RH, Resende T de L, Schwanke CHA. Vitaminas B12, B6, B9 e homocisteína e sua relação com a massa óssea em idosos. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, 2012; 15(3):577-585. <http://dx.doi.org/10.1590/s1809-98232012000300018>.
- Cowey CB, Woodward B. The Dietary Requirement of Young Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) for Folic Acid. The Journal of Nutrition, 1993; 123(9):1594-1600. <https://doi.org/10.1093/jn/123.9.1594>
- Czeczot H. Folic acid in physiology and pathology. Postepy Hig Med Dosw. 2008; 62:405-419.
- Czeizel AE, Dudás I, Vereczkey A, Bánhidý F. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. Nutrients, 2013;5(11):4760-4775. <https://doi.org/10.3390/nu5114760>
- Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. British Medical Journal, 1992; 327: 1832-1835. <https://doi.org/10.1056/NEJM199212243272602>
- Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. Nutr Ver, 2009; 67(4): 235-44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00193.x>
- Das UN. Folic acid says NO to vascular diseases. Nutrition, 2003; 19(7/8):686-692. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)01044-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)01044-4)
- Delsoz N, Khara H, Shenavar AR, Mohseni M. Interaction of dietary *Pediococcus acidilactici* and folic acid on growth performance, haematological parameters and non - specific immune response of finger barbel, *Acipenser nudiiventris*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2017;16(3):869-883.
- Dias DDC, Furlaneto FDPB, Sussel FR, et al. Economic feasibility of probiotic use in the diet of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during the reproductive period. Acta Scientiarum. Animal Sciences, 2020; 42. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v42i1.47960>
- Diemer O, Graciano TS, Boscolo WR, Feiden A, Signor A, Signor AA. Vitamina B12 na qualidade do sêmen de jundiás, *Rhamdia voulezi* criados em tanques-rede. Agrarian, 2013; 6(22):500-504.
- Duncan PL, Lovell RT, Butterworth CE Jr, Freeberg LE, Tamura T. Dietary folate requirement determined for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Nutr, 1993; 123(11):1888-1997. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1888>
- Duncan PL, Lovell RT. Dietary Folic Acid and Bacterial Infections in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Applied Aquaculture, 1994; 3:1-2:109-120, https://doi.org/10.1300/J028v03n01_09

- Dunlap B, Shelke K, Salem SA, Keith LG. Folic acid and human reproduction-ten important issues for clinicians. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.*, 2011; 8:2.
- Ebaid H, Bashandy SAE, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr. Metab.* 2013; 10–20. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-20>
- Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R. Folic acid: a public health challenge. *Lancet*, 2006; 367:352-361. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68582-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68582-6)
- Elango R. Methionine nutrition and metabolism: insights from animal studies to inform human nutrition. *The Journal of Nutrition*, 2020; 150(1):251S-252S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa155>
- Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, Araújo BA de, Monteiro NJR, Holanda PL de. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*, 2021; 15:10697:108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
- El-Fotoh A, El-Sayed M, El-Rahman A, Farag ME, Khalil BA, Ayyat MS. Dietary combination of vitamin e, selenium, and zinc effect on the reproductive efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 2020;47(2):597-606. <https://doi.org/10.21608/zjar.2020.94498>
- El-sayed A-FM, Mansour CR, EZZAT AA. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 2003; 220:619-632. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00221-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00221-1)
- El-Sayed A-FM, Mansour CR, Ezzat AA. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities, *Aquaculture*, 2005; 248(1-4):187-196. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04>
- El-Sayed A-FM, Kawanna M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. *Aquaculture*, 2008; 280:179-184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.030>
- El-sayed A-FM, Izquierdo M. The importance of vitamin E for farmed fish—A review. *Reviews in Aquaculture*, 2021; 14(2):688-703. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12619>
- Emata AC, Borlongan IG, Damaso JP. Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* Forsskal. *Aquaculture Research*, 2000; 31:557–564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00467.x>
- Esmaili B, Khara H. Growth performance, hematology and immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with diets containing different levels of vitamin E and folic acid. *IJFS*, 2014; 13(4):931-943.
- EWAN RC. Vitaminas. In: Swenson MJ, Reece WO, Eds. *Dukes - fisiologia dos animais domésticos*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996:456-469.
- Ezzat W, Shoeib MS, Mousa SMM, Bealish AMA, Ibrahim ZA. Impact of betaine, vitamin C and folic acid supplementations to the diet on productive and reproductive performance of Matrouh poultry strain under Egyptian summer condition. *Egyptian Poultry Science Journal*, 2011;31(3):521-537.
- Falah FJ, Islami HR, Mehrgan MS. Dietary folic acid improved growth performance, immunophysiological response and antioxidant status of fingerling Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). *Aquaculture Reports*, 2020; 17:100391, <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100391>

- Félix F, Oliveira CC, Cabrita E. Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants*, 2020; 10(1):36. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Fernández I, Fernandes JMO, Roberto, VP, et al. Circulating small non-coding RNAs provide new insights into vitamin K nutrition and reproductive physiology in teleost fish. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects*, 2019; 1863(1):39-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.017>
- Fernández-Murray JP, Prykhodzhiy SV, Dufay JN, et al. Glycine and Folate Ameliorate Models of Congenital Sideroblastic Anemia. *PLOS Genetics*, 2016; 12(1):e1005783. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005783>
- Fernandez-Palacios H, Norberg B, Izquierdo M, Hamre K., Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In: Holt J, Eds. *Larval Fish Nutrition*, 1st ed. John Wiley e Sons Inc., Oxford, 2011:153–181. <https://doi.org/10.1002/9780470959862.ch5>
- Figuroa E, Farias JG, Lee-Estevez M, et al. 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*, 2018; 493: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04>
- Firouz A, Soheil L, Hossein K, Shabanali N, Mohammad B, Mohammadalikhani M. The effects of folic acid treatment on biometric and blood parameters of finger-ling rainbow trout fishes (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Aquac. Res. Dev.*, 2013; 4:175. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000175>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome, 2020. <http://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Furuita H, Ishida T, Suzuki T, et al. Vitamin content and quality of eggs produced by broodstock injected with vitamins C and E during artificial maturation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 2009; 289(3-4), 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.032>
- Furuita H, Tanaka T, Yamamoto M, Shiraishi T. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci.*, 2001; 67:606-613. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00296.x>
- Furuya WM. *Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias*. 1^a ed. GFM; 2010.
- Garcia-Navarro CEK, Pachaly JR. *Manual de hematologia veterinária*. 2^a ed. Varela, São Paulo; 2005.
- Gatlin III DM, Li P. Nucleotides. In: Nakagawa H, Sato M, Gatkin III DM, eds. *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. 1st ed. Wallingford UK: CABI; 2007:193-209. <https://doi.org/10.1079/9781845931995.0193>
- Gatlin III, DM. *Principles of Fish Nutrition*. Southern Regional Aquaculture Center, SRAC 5003 Texas AeM University; 2010.
- Gavaia PJ, Domingues S, Drake P, Sarasquete C, Dinis MT, Cancela ML. Comparing skeletal development of wild and hatcheryreared Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858): evaluation in larval and postlarval stages. *Aquacult. Res.*, 2009; 40:1585-1593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02258.x>

- Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, Frochot C. Stability of folic acid under several parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016; 93:419-430. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.045>
- Ghadhban RF, Alwan NA. The Role of Folic Acid on Some Physiological Parameters and Efficiency of Sperm in Male Rabbits. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2020; 11(9):1003-1007. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.9.144>
- Goes MD, Feihrmann AC; Carvalho, KIFS, et al. Diets with soybean oil and l-carnitine alter lipid metabolism and improve the growth and reproduction of *Rhamdia quelen* females. *Aquaculture*, 2024; 579:740158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740158>
- Gomes F, Agustina R, Black RE, et al. Multiple micronutrient supplements versus iron-folic acid supplements and maternal anemia outcomes: An iron dose analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2022; 1512(1):114-125. <https://doi.org/10.1111/nyas.14756>.
- Graciano TS, Natali MRM, Vidal LVO, Michelato M, Righetti JS, Furuya M. Desempenho e morfologia hepática de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com metionina e colina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2010, 45(7):737–743. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2010000700015>
- Guay F, Matte JJ, Girard CL, Palin MF, Giguère A, Laforest JP. Effects of folic acid and vitamin B12 supplements on folate and homocysteine metabolism in pigs during early pregnancy. *British Journal of Nutrition*, 2002; 88(3):253-263. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002653>
- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: Revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2004; 28:187-195.
- Guerreiro LRJ, Streit Jr DP, Rotta MA. Gerenciamento em unidade de produção de alevinos de peixes reofílicos: custos de produção e boas práticas de manejo. *Custos e @gronegócio Online*, 2014; 10:54-82
- Guerreiro LRJ, Streit Jr DP, Rotta MA. 2016. Análises econômica e de custos em unidade produtora de alevinos de peixes reofílicos brasileiros. *Custos e @gronegócio Online*, 2016; 11(4):377-400.
- Gunasekera RM, Shim KF, Lam TJ. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 1996; 146(3-4):245-259. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01380-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01380-4)
- Hajam YA, Rani R, Sharma P, Kumar R, Verma SK. Zebrafish (*Danio rerio*): A Versatile Model for Reproductive Biology. In: Sundaray JK, Rather MA, Kumar S, Agarwal D, eds. *Recent updates in molecular Endocrinology and Reproductive Physiology of Fish*. Springer, Singapore; 2021. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8369-8_8
- Halver JE. Nutrition of salmonoid fishes: III. Water-soluble vitamin requirements of chinook salmon. *The Journal of nutrition*, 1957; 62(2):225-243.
- Halver JE. Nutritional deficiency diseases in salmonids. *Fish Pathology*, 1976; 10:165-180. <http://doi.org/10.3147/jsfp.10.165>.
- Halver JE, Hardy R. *Fish Nutrition*. 3th ed. San Diego: Elsevier; 2002.
- Halver JE. In “Nutrition and Feeding in Fish,” 1st ed. Academic Press, New York; 1985.
- Halver JE, The vitamins. In: Halver JR, eds. *Fish Nutrition*, 2nd ed. Academic Press, New York, USA; 1989:31-109.

- Hang Y, Hua X, Li X, Yi W, Cong X. Effect of dietary levels of folic acid on growth performance, blood biochemistry, antioxidant capacity, and immunity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Journal Of The World Aquaculture Society, 2022; 53(4):836-847. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12889>.
- Hansen AC, Waagbo R, Hemre GI. New B vitamin recommendations in fish when fed plant-based diets. Aquac. Nutr., 2015; 21(5):507–527. <https://doi.org/10.1111/anu.12342>
- Hardy RW, Kaushik SJ. Fish nutrition, 4th ed. Academic press; 2021.
- Hardy RW, Kaushik SJ, Mai K, BAI SC. Fish nutrition-history and perspectives. F. Nutrition, 2022; 1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-819587-1.00006-9>
- Hebert K, House JD, Guenter W. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. Poultry Science, 2005; 84(10):1533-1538.
- Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19^a ed. Manole, São Paulo: 2000.
- Hernandez LH, Hardy RW. Vitamin A functions and requirements in fish. Aquaculture Research, 2020; 51(8):3061-3071. <https://doi.org/10.1111/are.14667>
- Hien DV, Doolgindachbaporn S. Effect of Niacin and Folic Acid in Feed Rations on Growth and Live Weights of Green Catfish (*Mystus nemurus* Valenciennes 1840). Pakistan Journal of Biological Scien., 2011;14:64-68. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.64.68>
- Hilbig CC, Nascimento NF do, Heinen AL, et al. Effects of dietary fatty acids on the reproduction of south american female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). Lat. Am. J. Aquat. Res., 2019; 47:456–466. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-8>.
- Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. British journal of haematology, 2001; 113(3):579-589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02822.x>
- Honji RM, Moreira RG. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. Rev Bras Reprod Anim, 2017; 41(1):86-93.
- Hosokawa, H. The vitamin requirements of fingerling yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. United Graduate School of Agricultural Sciences Ehime University, Ehime, Japan; 1999.
- Hunter GA, Ferreira GC. 5-aminolevulinate synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. Cell. Mol. Biol., 2009; 55(1):102–110.
- Ibrahim W, Tousson E, Ali EMM, Mansour MA. Folic acid alleviates oxidative stress and hyperhomocysteinemia involved in testicular dysfunction of hypothyroid rats. General and Comparative Endocrinology, 2011; 2(174):143-149. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.012>
- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, TACON AGJ. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 2001; 197(1-4):25-42. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00581-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00581-6)
- Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. J Nutr, 1998;128(7):1204e12. <https://doi.org/10.1093/jn/128.7.1204>
- Jahaabad MJ, ziaenejad S, Ghayedi A, Moradian H, Seyyedi AM. The Effects of Selenium Nanoparticles Enriched food on Sperm Quality and Fertilization of Rainbow Trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) Male Breeders. Iranian Veterinary Journal, 2020; 16(3):106-115. <https://doi.org/10.22055/ivj.2019.188278.2164>
- Jeziarska B, Lugowska K, Witeska M, Sarnowski P. Malformations of newly hatched common carp larvae. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2000; Fisheries; 3(2).
- Ji J-F, HU C-B, ZHANG N, et al. New Insights into IgZ as a Maternal Transfer Ig Contributing to the Early Defense of Fish against Pathogen Infection. The Journal of Immunology, 2021; 206(9):2001-2014. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2001197>
- Jobling M. Fish nutrition research: past, present and future. Aquaculture International, 2016; 24:767-786. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>.
- Johnston TA, Wiegand MD, Leggett WC, et al. Hatching success of walleye embryos in relation to maternal and ova characteristics. Ecology of Freshwater Fish, 2007; 16(3):295-306. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2006.00219.x>
- Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine, 2001; 30(12):1390-1399. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00543-3)
- Karakula H, Opolska A, Kowal A, Domanski M, Plotka A, Perzynski J. Czy dieta ma wpływ na nasz nastrój? Znaczenie kwasu foliowego i homocysteiny. Pol Merkur Lekarski, 2009; 26(152):136-41.
- Kashiwada K, Kanazawa A, Teshima S. Studies on the production of B vitamins by intestinal bacteria. 6. Production of folic acid by intestinal bacteria of carp. Mem. Fac. Fish. 1971; 20:185-189. <https://doi.org/10.2331/suisan.36.421>
- Khan YM, Khan MA Dietary folic acid requirement of fingerling Catla, *Catla catla* (Hamilton). Aquaculture Nutrition, 2020. <https://doi.org/10.1111/anu.13061>
- Kopp R, Mareš J, Palíková M, et al. Biochemical parameters of blood plasma and content of microcystins in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from a hypertrophic pond with cyanobacterial water bloom. Aquac. Res. 2009; 40(15):1683-1693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02285.x>.
- Krishnaswamy K, Madhavan Nair K. Importance of folate in human nutrition. Br J Nutr, 2001; 85(2):S115-S124. <https://doi.org/10.1079/bjn2000303>
- Lall SP, Lewis-McCrea LM. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - an overview. Aquaculture, 2007; 267:3-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.053>.
- Lauinger L, Kaiser P. Sensing and Signaling of Methionine Metabolism. Metabolites, 2021; 11(2):83. <https://doi.org/10.3390/metabo110>
- Lee K-J, Dabrowski K. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. Aquaculture, 2004; 230:377-389. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00421-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00421-6)
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. 4ª ed. Sarvier, São Paulo: 2006.
- Lian Z, Wu Z, Gu R, et al. Evaluation of Cardiovascular Toxicity of Folic Acid and 6S-5-Methyltetrahydrofolate-Calcium in Early Embryonic Development. Cells, 2022; 11(24):3946. <https://doi.org/10.3390/cells11243946>
- Liang YS, Wu R X, Niu SF, Miao BB, Liang ZB, Zhai Y. Liver transcriptome analysis reveals changes in energy metabolism, oxidative stress, and apoptosis in pearl gentian grouper exposed

to acute hypoxia. *Aquaculture*, 2022; 561: 738635. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738635>

Liew, S. C. (2016). Folic acid and diseases – supplement it or not? *BioMed Research International*, 1(62), (90-100), <https://doi.org/10.1155/2014/560183>.

Lim C, Klesius PH. Influence of dietary levels of folic acid on growth response and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus iniae*. Sixth Asian Fisheries Forum, 2001; 150: Book of Abstracts.

Lima SA de, Pedreira ACO de, Freitas JMA de, et al. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. *Aquaculture*, 2020; 528:735509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735509>

Lin YH, Lin H-Y, Shiau S-Y. Dietary folic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses, *Aquaculture*, 2011; 317(1–4):33-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.010>.

Ling S, Kuah M-K, Tengku Muhammad TS, Kolkovski S, Shu-Chien AC. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 2006; 261(1):204-214. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.045>

Liu JJ, Li QF, Guo BF, Gao Y. Selective utilization of fatty acids by Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray, 1835) during gonadal development and first year juvenile growth. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014; 30:1181– 1185. <https://doi.org/10.1111/jai.12612>

Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med.*, 2015; 20;5(4):218-24. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i4.218>

Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2001; 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001056>

Luo L, Ai L, Li T, et al. The impact of dietary DHA/EPA ratio on spawning performance, egg and offspring quality in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture*, 2015; 437:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.036>

Ma Y, Zhang C, Gao X, et al. Folic acid protects against arsenic-mediated embryo toxicity by up-regulating the expression of Dvr1. *Scientific Reports*, 2015; 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep16093>

Machlin LJ. Handbook of vitamins. 2nd ed. Rev. and expanded. New York: M. Dekker; 1991.

Maia CS; Queiroz Júnior JRA de; Medeiros JP de, et al. Folic acid metabolism and its actions in embryogenesis. *Brazilian Journal of Development*, 2020; 6(8): 57002-57009. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n8-200>

Marchioro AA, Sá-Nakanishi ABD, Campanerut PAZ. Importância do ácido fólico. *Revista Uningá Review*, 2010; 1(1):64-70.

Martinez CA, Northrup H, Lin JI, et al. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. *Am J. Obstet. Gynecol.*, 2009; 201(4):394-41. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.06.042>

Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez MP, Sarasquete C, Cabrita E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of

cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*. 2012; 77(6):1129-1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>

Martins TPA, Ferreira TMS, Gomides PFV, Navarro FKSP, Murata LS, Navarro RD. Importância da vitamina C no crescimento e desenvolvimento gonadal em peixes. *Nucleus Animalium*, 2014; 6(1):9. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1084>

Mataveli M, Moraes GVD, Streit Junior DP, Ribeiro RP, Gasparino, E. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. *Acta scientiarum: animal sciences*, 2010; 32(3):345-349. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i3.7836>

May CD, Hamilton A, Stewart CT. Experimental megaloblastic anemia and scurvy in the monkey. IV. Vitamin B-12 and folic acid compounds in diet, liver, urine, and feces and effects of therapy. *Blood*, 1952; 7:978-991.

May CD, Nelson EN, Lowe CU, Salmon RJ. Pathogenesis of megaloblastic anemia in infancy: An interrelationship between pteroylglutamic acid and ascorbic acid. *Am. J. Dis. Child.*, 1950; 80:191-206.

Mazorra C, Bruce M, Bell JG, et al. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 2003; 227:21–33. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00493-9).

McDowell LR. Vitamins in animal and human nutrition. University Press, Iowa: Iowa State; 2000. <https://doi.org/10.1002/9780470376911>

McKillop D, Pentieva K, Daly D, et al. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br. J. Nutr.*, 2002; 88:681–688 <https://doi.org/10.1079/BJN2002733>

McLaren BA, Keller E, O'Donnell DJ, Elvehjem CA. The nutrition of rainbow trout. I. Studies of vitamin requirements. *Arch. Biochem. J.*, 1947; 169-178.

Mehrad B, Sudagar M. Dietary vitamin E requirement, fish performance and reproduction of guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation e Legislation*, 2010; 3(3):239-246.

Mewes JK, Meurer F, Tessaro L, Buzzi AH, Syperreck MA, Bombardelli RA. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. *Aquaculture*, 2016; 465:164-171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.035>

Miao S, Zhang W, Xu W, Mai K. Dietary folic acid requirement of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 2013; 400-401:73-76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.005>

Migaud H, Bell G, Cabrita E. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Rev. Aquac.*, 2013; 5:S194–S223. <https://doi.org/10.1111/raq.12025>

Millacura N, Pardo R, Cifuentes L, Suazo J. Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: A metaanalysis. *Public Health Nutrition*, 2017; 20(12): 2260-2268. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000878>

Ming J, Ye J, Zhang Y, et al. Dietary optimal reduced glutathione improves innate immunity, oxidative stress resistance and detoxification function of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against microcystin-LR. *Aquaculture*, 2018; 498: 594-605. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.014>

- Moat SJ, Hill MH, McDowell IFW, et al. Reduction in plasma total homocysteine through increasing folate intake in healthy individuals is not associated with changes in measures of antioxidant activity or oxidant damage. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003; 57:483–489. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601554>
- Mommsen PT, Korsgaard B. Vitellogenesis. In: Rocha MJ, Arukwe A, Kapoor BG, Eds. *Fish Reproduction Science Publishers*, CRC Press, Boca Raton; 2008:113–169.
- Moraes G, Almeida LC de. Nutrition and functional aspects of digestion in fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, 2020; 251–271. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815872-2.00011-7>
- Moran VH. Nutritional status in pregnant adolescents: a systematic review of biochemical markers. *Matern Child Nutr.*, 2007; 3(2):74-93. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2007.00081.x>
- Nagano N; Hozawa A, Fujiki, W. et al. Skeletal development and deformities in cultured larval and juvenile seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Aquacult. Res.*, 2007; 38:121-130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01627.x>
- Nascimento CZ do, Meurer F, Romão S, 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*, 2023; 297:115568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115568>
- Nash CE. *The History of Aquaculture*. 1st ed. Wiley-Blackwell, Iowa. 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470958971>
- Nasser C, Nobre C, Mesquita S, et al. Week of awareness about the importance of folic acid. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 2005; 11(4):199-203. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-26492005000400009>.
- National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of coldwater fishes*. The National Academies Press, Washington DC, USA; 1981.
- National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of coldwater fishes*. The National Academies Press, Washington DC, USA; 1993.
- National Research Council (NRC). *Nutrient Requeriments of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington DC, USA; 2011. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Navarro RD, Lanna EAT, Donzele JL, Matta SLP da, Souza MA de. Níveis de energia digestível da dieta sobre o desempenho de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) em fase pós-larval. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 2007; 29(1):109-114. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v29i1.266>
- Navarro RD, Matta SLP da, Ribeiro Filho OP, Ferreira WM, Miranda DC, Pereira FKS. Morfometria e desenvolvimento gonadal em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com suplementação de vitaminas E. *Archivos de Zootecnia*, 2010; 59:519-528.
- Navarro RD, Ribeiro Filho OP, Ferreira WM, Pereira FKS. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2009; 33(1):20-25.
- Naylor RL, Hardy RW, Buschmann AH, et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 2021; 591(7851):551–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>

- Nazki FH, Sameer AS, Ganaie, BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 2014; 533(1):11-20. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.063>
- Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 8th ed. Artmed, Porto Alegre; 2022.
- Ng W-K, Romano N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, 2013; 5(4):220–254. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>
- Ng W-K, Wang Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture*, 2011; 314(1-4):122–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.034>
- Nguyen NH, Tran GB, Nguyen CT. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)*, 2020; 98(1):59-69. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>
- Oiano Neto J. Aspectos químicos e qualidade nutricional dos alimentos. Embrapa, 2010; 9-83. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3380.5927>
- Oliveira MM de, Ribeiro T, Orlando TM, et al. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. *Animal Reproduction Science*, 2014; 150(1-2):62-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.006>
- Panigrahi A, Naveenkumar R, Das RR. Immunoprophylactic Measures in Aquaculture. In: Pandey PK, Parhi J, eds. *Advances in Fisheries Biotechnology*. Springer, Singapore; 2021:263–288. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3215-0_18
- Pastore SCG, Gaiotto JR, Ribeiro FAZ, Nunes AJP. Boas práticas de fabricação e formulação de rações para peixes. In: Fracalossi DM, Cyrino JEP, eds. *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª ed. Aquabio; 2013:295-346.
- Pedreira ACO, Malacarne AM, Dalmaso ACS, 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. *Animail Reproduction Science*, 2022; 245:107054. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107054>
- Penteado MVC. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1ª ed. Manole, São Paulo; 2003.
- Pertiwi H, Mahendra MYN, Kamaludeen J. Folic Acid: sources, chemistry, absorption, metabolism, beneficial effects on poultry performance and health. *Veterinary Medicine International*, 2022, 2002:1-9 <http://dx.doi.org/10.1155/2022/2163756>
- Pezzato LE, Barros MM, Fracalossi DM, Cyrino JEP. 2004. Nutrição de peixes. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnoli, N, eds. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TecArt, São Paulo, Brasil; 2004:75-170.
- Pradhan A, Olsson PE. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*, 2015; 217-218:81-91. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.002>
- Pustowka C, McNiven MA, Richardson GF, Lall SP. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquac. Res.*, 2000; 31:297–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00416.x>

- Rahimi S, Martel J, Karahan G, et al. Moderate maternal folic acid supplementation ameliorates adverse embryonic and epigenetic outcomes associated with assisted reproduction in a mouse model. *Human Reproduction*, 2019; 34(5):851-862. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dez036>
- Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M. Métodos para análise hematológica em peixes. 1ª Ed., Maringá: Edum; 2013. <https://doi.org/10.7476/9788576286530>
- Rastiannasab A, Afsharmanesh S, Rahimi R, Sharifian I. Alternations in the liver enzymatic activity of common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites, *Dactylogyrus spp.* and *Gyrodactylus spp.* *Journal of Parasitic Diseases*, 2016; 40:1146–1149. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0638-9>
- Rebelatto Jr IA, Lima AF, Rodrigues APO, et al. Reprodução e engorda do Pirarucu. Levantamento de processos produtivos e tecnologias. Embrapa, 2015.
- Reidel A, Boscolo WR, Feiden A, Romagosa E. The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture*, 2010; 298:354-359. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.005>
- Ribeiro MJP, Evangelista MM, Sanches ED, Gonçalves GS, Romagosa, E. Crude protein in diets for Nile tilapia broodfish. *Boletim do Instituto de Pesca*, 2017; 43:35-46.
- Riche, M. Evaluation of Digestible Energy and Protein for Growth and Nitrogen Retention in Juvenile Florida Pompano, *Trachinotus carolinus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2009; 40(1):45–57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00234.x>
- Romagosa E, Bittencourt F, Boscolo WR. Nutrição e alimentação de reprodutores, In: Fracalossi DM, Cyrino JEP, eds. Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª ed. Aquabio; 2013:167-179.
- Romanova EM, Mukhitova ME, Romanov VV, Lyubomirova VN, Spirina EV. Factors for increasing the survival rate of catfish fertilized eggs and larvae. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019; 341(1):012197. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/341/1/012197>
- Romanova E, Romanov V., Shadyeva L, et al. Functional biologically active feed additive for breeding stock of fish. *E3S Web of Conferences*, 2022; 363. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202236303060>
- Roudsari SF, Islami HR, Mousavi AS, Mehrgan MS. Folic Acid-Coated Nanochitosan Ameliorated the Growth Performance, Hematological Parameters, Antioxidant Status, and Immune Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Vet Sci*. 2021; 15(8):647722. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.647722>
- Rotta, M.A., Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Embrapa Pantanal, 2003; 53.
- Sáez GT, Están-Capell N. Antioxidant enzymes. In: Schwab M. eds. *Encyclopedia of Cancer*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg; 2017:288–294.
- Santos LMP, Pereira MZ. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Caderno de Saúde Pública*, 2007; 23(1):17-24.
- Sarmah S, Marrs JÁ. Complex cardiac defects after ethanol exposure during discrete cardiogenic events in zebrafish: Prevention with folic acid. *Developmental Dynamics*, 2013; 242(10):1184-1201. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24015>

- Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 2008; 39(3):223-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 2014; 24:453-462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schisterman EF, Sjaarda LA, Clemons T, et al. Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth Among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2020; 323(1):35–48. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714>
- Schulter EP, Vieira Filho JER. Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil. *Revista de Economia e Agronegócio*, 2018; 16(2):177–201. <https://doi.org/10.25070/rea.v16i2.554>
- Serezli R, Akhan S. The effect of vitamin E on black sea trout (*Salmo labrax*) broodstock performance. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010; 16(1). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1364>
- Sesay DF, Tsion HM, Zhou, Q, 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*, 2016; 452:142–150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.026>
- Sesay, D.F., Habte-Tsion, HM., Zhou, Q. *et al.* The effect of dietary folic acid on biochemical parameters and gene expression of three heat shock proteins (HSPs) of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerling under acute high temperature stress. *Fish Physiol Biochem*, 2017; 43, 923–940. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0311-6>
- Shafaeipour A, Gorjipour E, Kamayi K, Falahatkar B. Effects of Different Levels of Folic Acid and Vitamin C on Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2011; 42(2):281–286. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00465.x>
- Shi L, Feng L, Jiang W-D, et al. Folic acid deficiency impairs the gill health status associated with the NF-κB, MLCK and Nrf2 signaling pathways in the gills of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Fish & Shellfish Immunology*, 2015; 47(1):289-301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.023>
- Shi L, Zhai H, Wei L, Zeng F, Ren T, Han Y. Effects of dietary folic acid on growth performance, body wall folate content, immune and antioxidant enzyme activity of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Research*, 2022; 53(17):6219-6226. <http://dx.doi.org/10.1111/are.16095>
- Shi L, Zhou X-Q, Jiang W-D, et al. The effect of dietary folic acid on flesh quality and muscle antioxidant status referring to Nrf2 signalling pathway in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 2020; 26(3):631-645. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.13023>
- Shiau S-Y, Huang S-Y. Dietary folic acid requirement determined for grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2001b; 200(3-4):339–347. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00598-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00598-6)
- Shiau S-Y, Huang S-Y. Dietary folic acid requirement for maximum growth of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fisheries Science*, 2001; 67(4):655–659. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00302.x>
- Singh SK, Baidya S, Das P, Biswas P. Functional Role of Dietary Supplements on Reproductive Physiology of Fishes. In: Sundaray JK, Rather MA, Kumar S, Agarwal D, eds. Recent updates

- in molecular Endocrinology and Reproductive Physiology of Fish. Springer, Singapore; 2021:243-258 https://doi.org/10.1007/978-981-15-8369-8_17
- Slinger SJ, Razzaque A, Cho CY. (1979) Effect of feed processing and leaching on the losses of certain vitamins in fish diets. In: Halver JE, Tiews K, eds. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg; 1979;425–434.
- Slungaard RK, Higgins GM. Experimental megaloblastic anemia in young guinea pigs. *Blood*, 1956; 11:123-142
- Smith CE, Halver JE. Folic Acid Anemia in Coho Salmon. *Journal of The Fisheries Research Board of Canada*, 1969; 26(1):111-114. <http://dx.doi.org/10.1139/f69-009>
- Smith CE. Hematological Changes in Coho Salmon Fed a Folic Acid Deficient Diet. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968; 25(1):151-156. <http://dx.doi.org/10.1139/f68-009>
- Song Q, Xiao Y, Xiao, Z, et al. Lysozymes in Fish. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2021; 69(50):15039-15051. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06676>.
- Springate JRC, Bromage NR, Cumaranatunga PRT. The effects of different ration on fecundity and egg quality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Nutrition and Feeding in Fish*. 1985; 371- 393.
- 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*, 2010; 61(1);49-60.
- Sullivan CV, Yilmaz O. Vitellogenesis and yolk proteins, fish. *Encyclopedia of reproduction*, 2018; 6:266-277.
- Tacon AGJ. Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science e Aquaculture*, 2019; 1(14). <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1649634>
- Tamura T, Picciano MF, Folate and human reproduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006; 83(5):993–1016. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.993>
- Tan QR, He SX. Effect of dietary supplementation of Vitamins A, D3, E, and C on yearling rice field Eel, *Monopterus albus*: serum indices, gonad development, and metabolism of calcium and phosphorus. *J World Aquacult Soc*, 2007; 29:432-440. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00083.x>
- Teame T, Zhang z, Ran C, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models, *Animal Frontiers*, 2019; 9(3):68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, et al. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*, 2012; 326-329:74-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.012>
- Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, et al. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. *Aquaculture Research*, 2014; 45:1425–1433. <https://doi.org/10.1111/are.12087>
- Tripathi M, Singh BK, Zhou J, et al. Vitamin B₁₂ and folate decrease inflammation and fibrosis in NASH by preventing syntaxin 17 homocysteinylation. *J Hepatol.*, 2022; 77(5):1246-1255. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.033>.

- Uehara SK, Rosa G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. *Revista de Nutrição*, 2010; 23(5):881-894. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000500018>
- Valenti WC, Barros HP, Moraes-Valenti P, Bueno GW, Cavalli, RO. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, 2021; 19:100611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquacult*, 2018; 10(2):351-369. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12164>
- Vallée M, Guay F, Beaudry D, et al. Effects of Breed, Parity, and Folic Acid Supplement on the Expression of Folate Metabolism Genes in Endometrial and Embryonic Tissues from Sows in Early Pregnancy, *Biology of Reproduction*, 2002; 67(4):1259-1267. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1259>
- VANNUCCHI, H., MONTEIRO, T. H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Fólico. *Ilsi Brasil International Life Sciences Institute do Brasil*, São Paulo, v.10, p. 1-24, 2010.
- Vassallo-Agius R, Imazumi H, Watanabe T, Yamazaki T, Satoh S, Kiron V. The Influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish Sci*, 2001; 67:260-270. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00248.x>
- Volkoff H, London S. Nutrition and Reproduction in Fish. *Encyclopedia of Reproduction*, 2018; 6:743-748. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20624-9>
- Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *Lancet*, 2001; 358:2069-2073. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)07104-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)07104-5)
- Wald, N. J. Folic Acid and the Prevention of Neural-Tube Defects. *New England Journal of Medicine*, 2004; 350(2):101–103. <https://doi.org/10.1056/nejmp038186>
- Watanabe T, Arakawa T, Kitajima C, Fujita C. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1984; 50:495-501.
- Watanabe T, Itoh A, Satoh S, Kitajima C, Fujita S. Effect of dietary protein levels on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985; 51:1511-1521.
- Watanabe T, Vassalo-Agius R. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 2003; 227:35–61. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00494-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00494-0)
- Watanabe WO, Losordo TM, Fitzsimmons K, et al. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science*, 2002; 10(3):465–498.
- Webster CD, Lim CE. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. 1st ed. CAB International; 2002.
- Wei JJ, Zhang F, Tian WJ, et al. Effects of dietary folic acid on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response and disease resistance of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards, 1853). *Aquaculture Nutrition*, 2016; 22(3):567–574. <https://doi.org/10.1111/anu.12275>

- Wilson RD, Audibert F, Brock J-A, et al. Pre-conception Folic Acid and Multivitamin Supplementation for the Primary and Secondary Prevention of Neural Tube Defects and Other Folic Acid-Sensitive Congenital Anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*, 2015; 37(6):534–552.
- Wilson RD, O'Connor DL. Maternal folic acid and multivitamin supplementation: International clinical evidence with considerations for the prevention of folate-sensitive birth defects. *Preventive Medicine Reports*, 2021; 24:101617.
- Wilson RD, O'Connor DL. Guideline No. 427: Folic Acid and Multivitamin Supplementation for Prevention of Folic Acid–Sensitive Congenital Anomalies, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2022; 44(6): 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2022.04.004>
- Wisniewska K, Wysocki J. The importance of folic acid in the primary prevention of congenital malformations. *Archives of Perinatal Medicine*, 2008; 14(2): 32-40.
- Woynárovich E, Horváth L. A Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. 1ª ed. CODEVASF: CNPq, Brasília: 1983.
- Wright AJA, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potencial implications for proposed mandatory folic acid fortification in the US. *Br J Nutr*, 2007; 98(4):667-75. <https://doi.org/10.1017/S0007114507777140>.
- Wu G. Nutrition and Metabolism: Foundations for Animal Growth, Development, Reproduction, and Health. In: Wu G, eds. *Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Cham; 2022:1-24 https://doi.org/10.1007/978-3-030-85686-1_1
- Wu JP, Wu F, Jiang M, et al. Dietary folic acid (FA) requirement of a genetically improved Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 2016; 32(6):1155-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.13151>
- Xue S, Simiao C, Yixiao G, Tao G, Ying H. Regulation of glutathione on growth performance, biochemical parameters, non-specific immunity, and related genes of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ammonia, *Aquaculture*, 2022; 546: 737241. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737241>
- Yao Y, Yu B, Chen D, et al. Effect of Dietary Folic Acid Supplementation on Growth Performance and Hepatic Protein Metabolism in Early-Weaned Intrauterine Growth Retardation Piglets. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013; 12(5):862–868. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(13\)60262-2](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(13)60262-2)
- Ye N, Lv Z, Huang Z, Cheng Y, Wei Q, Shi F. Dietary folic acid supplementation improves semen quality and spermatogenesis through altering autophagy and histone methylation in the testis of aged broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 2022; 181:8-15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.032>
- Yeganeh KA, Ershad, LH, Valipour A, Alinezhad S. Fingerling beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758) growth, hematological, biochemical parameters and opercular respiratory rate under hypoxia challenge with levels of dietary folic acid. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2022; 21(6):1558-1572. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2023.128564>
- Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity. *Frontiers in nutrition*, 2019; 6(45). <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00048>

- Yossa R, Sarker PK, Proulx É, Vandenberg GW. The effects of the dietary biotin on zebrafish *Danio rerio* reproduction. *Aquaculture Research*, 2013; 46(1):117–130. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12166>
- Yue C, Ji C, Zhang H, et al. Protective effects of folic acid on PM2.5-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways. *Environmental Toxicology*, 2017; 32(10):2316–2322. <https://doi.org/10.1002/tox.22448>
- Zakeri M, Kochanian P, Marammazi JG, Yavari V, Savari A, Haghi M. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture*, 2011; 310(3-4):388–394. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.009>
- Zaniboni-Filho E, Nuñez APO. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N, Eds. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. 1ª ed. TecArt, São Paulo, SP; 2004:45-73.
- Zehra S, Khan MA. 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*, 2020; 262:114397. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114397>
- Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. *Handbook of vitamins*. 4th ed. Taylor e Francis, Boca Raton; 2007.
- Zhang S, Wang Z, Wang H. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013; 39:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.009>
- Zhang Y, Yuan H, Peng, M, et al. Folic acid deficiency damages male reproduction via endoplasmic reticulum stress-associated PERK pathway induced by Caveolin-1 in mice. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2021; 67(5):383-394. <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2021.1954724>
- Ziaei-nejad S, Falahat N-AE, Ghaed A, Seyyedi M, Moradian, S. Effects of enriched food with selenium nanoparticles on breeding efficiency of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 2021; 28(6):79-88. <https://doi.org/10.22092/isfj.2019.120169>

CAPÍTULO II

Dietas suplementadas com ácido fólico reduzem danos oxidativos e melhoram o crescimento, saúde e desempenho reprodutivo de fêmeas *Rhamdia quelen*

*Diets supplemented with folic acid reduce oxidative damage and improve growth, health and reproductive performance of *Rhamdia quelen* females*

Resumo

O ácido fólico (AF) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B importante para diversas funções do organismo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento, saúde e desempenho reprodutivo de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com dietas suplementadas com ácido fólico. Foram utilizadas 360 fêmeas ($155,70 \pm 1,97$ g), alojadas em 24 gaiolas (4x2x1m). Os tratamentos foram as rações (310 g kg⁻¹ Proteína Digestível; 12,98 MJ kg⁻¹ Energia Digestível) com diferentes níveis de suplementação de ácido fólico (0,00, 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 e 3,75 mg kg⁻¹). As fêmeas foram alimentadas *ad libitum* por 300 dias. Na estação reprodutiva (janeiro), todas as fêmeas foram pesadas e submetidas à reprodução artificial. Durante a segunda maturação gonadal (fevereiro), cinco fêmeas de cada unidade foram anestesiadas para coleta do sangue. Em seguida, foram eutanasiadas e dissecadas para coleta do fígado e ovário para análises histológicas e bioquímicas. O peso final, comprimento padrão e ganho de peso diário foram maiores ($p < 0,05$) nas fêmeas alimentadas com rações suplementadas entre 0,75 e 3,25 mg de AF kg⁻¹. A taxa de eclosão e comprimento das larvas foram maiores ($p < 0,05$) quando utilizadas as rações suplementadas com 1,50; 2,25 e 3,00 mg de AF kg⁻¹. A taxa de larvas com malformações diminuiu ($p < 0,05$) com dietas contendo 3,0 e 3,5 mg de AF kg⁻¹. A porcentagem de ovos vitelogênicos no ovário foi maior ($p < 0,05$) nas fêmeas alimentadas entre 1,5 e 3,75 mg de AF kg⁻¹. O ácido fólico aumentou ($p < 0,05$) o número de eritrócitos e trombócitos em fêmeas suplementadas entre 0,75 e 3,25 mg de AF kg⁻¹. A atividade plasmática de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase diminuíram ($p < 0,05$) nas fêmeas alimentadas com 0,75 e 3,75 mg de AF kg⁻¹. Os níveis plasmáticos de proteínas totais e globulina foram maiores ($p < 0,05$) nas fêmeas alimentadas com 2,25 mg de AF kg⁻¹. A atividade de catalase nos ovários e oócitos foi maior ($p < 0,05$) nas fêmeas alimentadas com 2,25, 3,0 e 3,75 mg de AF kg⁻¹ e 1,5 e 2,25 mg de AF kg⁻¹ respectivamente. A peroxidação lipídica nos embriões foi menor ($p < 0,05$) quando empregadas rações suplementadas entre 1,5, 2,25 e 3,0 mg de AF kg⁻¹. Assim, conclui-se que a alimentação de fêmeas de *Rhamdia quelen* de rações suplementadas entre 2,25 e 3,0 mg de ácido fólico kg⁻¹ melhora o equilíbrio redox e a proteção hepática, promove o desenvolvimento gonadal e aumenta a eritropoiese nas fêmeas de jundiá, resultando em melhorias da saúde, crescimento, desempenho reprodutivo e especialmente na qualidade da prole.

Palavras-chave: embrião, equilíbrio redox, eritropoiese, larva, ovário, vitamina B9.

Abstract

Folic acid (FA) is a water-soluble B-complex vitamin that is important for various functions of the body. The objective of the present study was to evaluate the growth, health and reproductive performance of female silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed diets supplemented with folic acid. 360 females (155.70 ± 1.97 g) were used, housed in 24 cages (4x2x1m). The treatments were rations (310 g kg⁻¹ Digestible Protein; 12.98 MJ kg⁻¹ Digestible Energy) with different levels of folic acid supplementation (0.00, 0.75, 1.50, 2.25, 3.00 and 3.75 mg kg⁻¹). Females were fed *ad libitum* for 300 days. In the breeding season (january), all females were weighed and subjected to artificial reproduction. During the second gonadal maturation (february), five

females from each unit were anesthetized for blood collection. They were then euthanized and dissected to collect the liver and ovary for histological and biochemical analysis. Final weight, standard length and daily weight gain were higher ($p<0.05$) in females fed diets supplemented between 0.75 and 3.25 mg of FA kg^{-1} . The hatching rate and length of the larvae were higher ($p<0.05$) when using diets supplemented with 1.50, 2.25 and 3.00 mg of AF kg^{-1} . The rate of larvae with malformations decreased ($p<0.05$) with diets containing 3.0 and 3.5 mg of FA kg^{-1} . The percentage of vitellogenic eggs in the ovary was higher ($p<0.05$) in females fed between 1.5 and 3.75 mg of AF kg^{-1} . Folic acid increased ($p<0.05$) the number of erythrocytes and thrombocytes in females supplemented between 0.75 and 3.25 mg of FA kg^{-1} . Plasma alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities decreased ($p<0.05$) in females fed 0.75 and 3.75 mg of AF kg^{-1} . Plasma levels of total proteins and globulin were higher ($p<0.05$) in females fed 2.25 mg of AF kg^{-1} . Catalase activity in ovaries and oocytes was higher ($p<0.05$) in females fed 2.25, 3.0 and 3.75 mg of AF kg^{-1} and 1.5 and 2.25 mg of AF kg^{-1} respectively. Lipid peroxidation in embryos was lower ($p<0.05$) when feeds supplemented with between 1.5, 2.25 and 3.0 mg of FA kg^{-1} were used. Thus, it is concluded that feeding *Rhamdia quelen* females with diets supplemented between 2.25 and 3.0 mg of folic acid kg^{-1} improves redox balance and liver protection, promotes gonadal development and increases erythropoiesis in females of silver catfish, resulting in improvements in health, growth, reproductive performance and especially in the quality of the offspring.

Keywords: embryo, redox balance, erythropoiesis, larva, ovary, vitamin B9.

1. Introdução

A aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce em todo o mundo (FAO, 2022). Com a redução da produção pesqueira extrativista nas últimas décadas, a oferta de pescado para população é atendida pela aquicultura (FAO, 2020). Neste contexto, os peixes de água doce constituem o maior grupo de organismos aquáticos produzidos pela aquicultura (FAO, 2022). Com o crescimento contínuo e acelerado da piscicultura, os sistemas de produção têm empregado técnicas de intensificação da produção como estratégia para melhorar a produtividade e atender a demanda de alimento (Barroso et al., 2019).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um teleósteo que pertence à família Heptapteridae (ordem Siluriformes). A espécie é encontrada do sul do México ao centro da Argentina (Baldisserotto et al., 2020). É uma espécie onívora, com rápido crescimento, boa conversão alimentar (Santos e Meurer, 2020) e aceitação do mercado consumidor (Baldisserotto, 2009; Santos e Meurer, 2020). Este peixe apresenta boa taxa de fecundidade e fertilidade (Adames et al., 2015, Bombardelli et al., 2015, Bombardelli et al., 2021a) e, é uma espécie relevante na aquicultura sul-americana, especialmente para pisciculturas de clima temperado e subtropical (Barcellos et al., 2001, Carneiro, 2004, Amaral Jr. et al., 2015). No Brasil, são mais de 36 mil produtores de jundiá e a região sul concentra 97,6% da produção nacional (Peixe BR, 2020). Pelas semelhanças com outras famílias de siluriformes, *R. quelen* pode ser usado como modelo de pesquisa para bagres em todo o mundo (Koakoski et al., 2012).

Assim, para atender a demanda crescente deste setor da aquicultura, diversas pesquisas têm sido focadas no desenvolvimento de estratégias para garantir o fornecimento de proles em quantidade e qualidade (El-Sayed e Kawanna, 2008), uma vez que a disponibilidade de alevinos vigorosos, resistentes e rústicos tem se tornado um fator limitante para o crescimento da produção de peixes (FAO, 2020). Dentre várias estratégias, a nutrição de reprodutores recebe atenção pela relação direta com a qualidade dos gametas e das proles (Ng e Romano, 2013; Bombardelli et al., 2021b, Nascimento et al., 2023). Recentemente, diversos estudos foram direcionados para a determinação das exigências nutricionais dos peixes durante a fase reprodutiva (Tessaro et al., 2012; Bombardelli et al., 2015; Bombardelli et al., 2017, Carvalho et al., 2018, Figueroa et al., 2018; El-Fotoh et al., 2020), além da avaliação de alimentos potenciais (Parra et al., 2008; Mewes et al., 2016, Hilbig et al., 2019) e aditivos funcionais (Lima et al., 2020, Bombardelli et al., 2023, Nascimento et al., 2023).

A nutrição das fêmeas é importante devido os nutrientes da dieta serem recrutados para a vitelogênese (Mommsen e Korsgaard, 2008; Fernández-Palacios et al., 2011), influenciando a

maturação gonadal e a qualidade do vitelo (Bobe e Labbé, 2010; Hilbig et al., 2019, Lima et al., 2020). Isso determina o vigor e a qualidade da prole (Bombardelli et al., 2009; Ng e Wang, 2011; Nascimento et al., 2023), pois os embriões e larvas em estágio inicial de desenvolvimento dependem exclusivamente dos nutrientes do vitelo para alimentação (Mazorra et al., 2003; Fernández Palacios et al., 2011). Além disso, a nutrição modula a saúde e o vigor das fêmeas, e determina sua capacidade de tolerar o estresse metabólico imposto pelo intenso processo reprodutivo (Lima et al., 2020).

Devido ao elevado esforço metabólico no qual os reprodutores de peixes são submetidos, suas exigências nutricionais estão além dos nutrientes presentes na dieta ou absorvidos naturalmente (Wu, 2022). Dentre vários nutrientes, as vitaminas se destacam pois não são produzidas pelo organismo nas quantidades exigidas (Borba et al., 2013), sendo necessária a suplementação exógena nas dietas, na forma de ingredientes (El-Gamal et al., 2007). As vitaminas contribuem para a manutenção dos organismos vivos e estão envolvidas como cofatores e substratos em algumas reações bioquímicas e fisiológicas (NRC, 2011, Martins et al., 2014; Hardy e Kaushik, 2021).

O ácido fólico (vitamina B9 - $C_{19}H_{19}N_7O_6$) é uma vitamina hidrossolúvel (Liew, 2016) e utilizada de forma sintética na fortificação dos alimentos (Alaburda e Shundo, 2007). É caracterizado pela forma totalmente oxidada no grupo dos folatos (Zempleni et al., 2007), sendo o composto mais estável e facilmente absorvido (Eichholzer et al., 2006). A ação dessa vitamina está relacionada a transferência de unidades monocarbônicas dos grupos metila e formil envolvidos no metabolismo de aminoácidos e reações de síntese dos ácidos nucleicos (Marchioro et al., 2010; Blanco et al., 2016). Tem papel importante no desenvolvimento embrionário inicial (Millacura et al., 2017) e formação das células do sangue nos vertebrados (McDowell, 2000). Além disso, o ácido fólico elimina os radicais livres oxidantes, sendo considerado um agente antioxidante (Joshi et al., 2001). Com isso, apresenta inúmeros benefícios para imunidade, saúde, crescimento e reprodução animal (Robinson, 1996; Chavarro e Schlaff, 2018).

Em rações comerciais para peixes de água doce, os níveis de garantia de ácido fólico variam entre 0,3 e 1,5 mg kg⁻¹ (Lin et al., 2011; Wu et al., 2016), o qual é adicionado nos suplementos minerais e vitamínicos na forma de mistura homogênea de microingredientes (Li et al., 2022). Pesquisas com suplementação de ácido fólico na dieta de peixes foram documentadas apenas na fase de crescimento (Shi et al., 2020; Badran e Ali, 2021; Roudsari et al., 2021). A suplementação de ácido fólico aumentou a imunidade (Sesay et al., 2016; Falah et

al., 2020; Roudsari et al., 2021), proteção hepática (Hang et al., 2022) e o desempenho produtivo (Falah et al., 2020; Badran e Ali 2021; Roudsari et al., 2021). Contudo, as informações sobre os efeitos da suplementação dietética de ácido fólico sobre a reprodução de peixes são escassas. As poucas pesquisas relacionadas com este tema sugerem que esta vitamina atua na regulação de hormônios reprodutivos (Anagha et al., 2021) e na redução de malformações no desenvolvimento embrionário (Ma et al., 2015; Yue et al., 2017).

Por outro lado, em vertebrados terrestres, os efeitos da suplementação dietética do ácido fólico são bem documentados e relacionados com a prevenção de anencefalia, de espinha bífida, defeitos orofaciais e auxilia no fechamento do tubo neural durante a gravidez humana (Wisniewska e Wysocki, 2008; Dunlap et al., 2011; Millacura et al., 2017). Na produção animal, o ácido fólico minimiza as complicações durante o parto de vacas (Duplessis et al., 2014), fortalece os tecidos endometriais e embrionários durante a gestação, aumenta da produção e qualidade do leite e auxilia no crescimento de leitões nascidos prematuros (Guay et al., 2002; Vallée et al., 2002; Yao et al., 2013). Em aves, os seus efeitos estão relacionados com o aumento a produção de ovos (Hebert et al., 2005). Por outro lado, a deficiência de ácido fólico causa anemia, diagnosticada por níveis baixos de hemoglobina e eritrócitos (Garcia-Navarro e Pachaly, 2005).

Assim, considerando os benefícios do ácido fólico, o objetivo do presente trabalho foi alimentar reprodutores de jundiá (*Rhamdia quelen*) com rações suplementadas com ácido fólico e avaliar os seus efeitos sobre a saúde e a reprodução das fêmeas, além da qualidade e vigor das proles.

2. Material e métodos

2.1 Estrutura, estocagem e delineamento experimental

Todos os procedimentos conduzidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção em Pesquisas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUAP/Unioeste), conforme certificado n°. 07/2022. Um total de 1200 juvenis ($3,71 \pm 0,01\text{g}$) de jundiá (*Rhamdia quelen*), foram alojados em 24 gaiolas (4,0m x 2,0m x 1,0m; malha 15 mm) durante o outono (abril). As gaiolas foram instaladas em viveiros escavados de 200 m² (10x20m) revestidos em alvenaria e com fundo de terra. No início da primavera (outubro), quando os peixes já apresentavam tamanho corporal que permitisse a identificação dos machos e fêmeas, foi realizada uma biometria total para adequar as densidades de estocagem e ajustar a proporção fêmeas:machos. Após a biometria, em cada gaiola foram alojadas 15 fêmeas

(155,70 ± 1,97 g) e 15 machos (128,14 ± 1,83 g). O experimento teve duração de 300 dias com término no verão (fevereiro). Os peixes foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo natural e, os viveiros foram abastecidos com água proveniente do rio São Francisco Falso, apenas para compensar as perdas por infiltração e evaporação.

As gaiolas foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro réplicas. Os tratamentos foram compostos pela alimentação das fêmeas com rações isoprotéicas e isoenergéticas, contendo 310 g kg⁻¹ de proteína digestível (PD) e 12,98 MJ kg⁻¹ de energia digestível (ED) e, suplementadas com 0,00; 0,75; 1,50; 2,25; 3,00 e 3,75 mg ácido fólico kg⁻¹ de ração. Foi considerada como uma unidade experimental uma gaiola contendo 15 fêmeas e 15 machos.

2.2 Dieta experimental e alimentação

A formulação das dietas foi realizada com base no conhecimento da composição nutricional dos ingredientes e valores de digestibilidade para *R. quelen* (Oliveira Filho e Fracalossi, 2006; Meurer et al. 2012; Santos e Meurer, 2020), utilizando o software SuperCrac 6.4[®] (Tabela 1). O ácido fólico utilizado na suplementação foi corrigido pela pureza (97%, Salus[®] - Nutrição Animal) e com acréscimo de 10% para compensar as perdas da eficiência pela alta temperatura (100-110°C) durante o processamento da ração (Coelho, 2002).

Os ingredientes utilizados na fabricação das rações foram triturados em moinho de martelo (Vieira[®]), utilizando-se peneira de 0,5 mm (Meurer et al., 2005). Após a moagem, os ingredientes foram homogeneizados em misturador vertical de hélice dupla por 20 minutos. Após a mistura as rações foram processadas em extrusora (E-62, Ferraz[®]) com peletes 3 mm e 5 mm, de acordo com Meurer et al. (2005) e Bombardelli et al. (2021a).

Os juvenis foram alimentados até a primeira biometria (abril a outubro) com as rações com peletes de 3,0 mm, em regime *ad libitum*, três vezes ao dia (8h:00min, 12h:00min e 17h:00min). Após a biometria e ajuste da proporção sexual, entre o início da primavera (outubro) e o término do experimento (fevereiro) os reprodutores foram alimentados com as rações produzidas com peletes de 5 mm, em regime *ad libitum*, duas vezes ao dia (9h:00min e 16h:00min) (Bombardelli et al., 2021b).

Tabela 1. Composição dos alimentos e conteúdo de nutrientes das rações experimentais suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico, utilizadas na alimentação de reprodutores de jundiá (*Rhamdia quelen*).

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Níveis de ácido fólico (mg kg ⁻¹)					
	0,0	0,75	1,5	2,25	3,0	3,75
Milho em grãos	270,00	270,00	270,00	270,00	270,00	270,00
Farelo de soja	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00	250,00
Farinha de vísceras de aves	235,60	235,60	235,60	235,60	235,60	235,60
Farelo de trigo	119,30	119,30	119,30	119,30	119,30	119,30
Farinha de salmão	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
Óleo de soja	37,00	37,00	37,00	37,00	37,00	37,00
Suplemento mineral e vitamínico*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Hidroxitolueno butilado	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido fólico** (mg kg ⁻¹)	0,00	0,83	1,66	2,50	3,33	4,16
Nutrientes calculados (g kg⁻¹)						
Ácido Araquidônico	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Ácido Linoleico	40,40	40,40	40,40	40,40	40,40	40,40
Ácido Linolênico	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Amido	289,00	289,00	289,00	289,00	289,00	289,00
Cálcio	18,70	18,70	18,70	18,70	18,70	18,70
Fósforo total	12,10	12,10	12,10	12,10	12,10	12,10
Proteína Bruta	347,50	347,50	347,50	347,50	347,50	347,50
Proteína Digestível	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
Fibra Bruta	21,80	21,80	21,80	21,80	21,80	21,80

*Suplemento vitamínico e mineral (mínimo kg⁻¹): vitamina A: 2.000.000 UI kg⁻¹, vitamina D3: 640.000 UI kg⁻¹, vitamina E: 2.400 UI kg⁻¹, vitamina K3: 688 mg kg⁻¹, vitamina B1: 400 mg kg⁻¹, vitamina B2: 1.000 mg kg⁻¹, vitamina B6: 1.200 mg kg⁻¹, vitamina B9: 0 (zero); vitamina B12: 4.000 µg kg⁻¹, niacina: 9.000 mg kg⁻¹, ácido pantotênico: 3.000 mg kg⁻¹, biotina: 35 mg kg⁻¹, manganês: 14 g kg⁻¹, zinco: 11 g kg⁻¹, ferro: 10 g kg⁻¹, cobre: 2.000 mg kg⁻¹, iodo: 200 mg kg⁻¹, cobalto: 40 mg kg⁻¹, selênio: 40 mg kg⁻¹, hidroxitolueno butilado (BHT): 300 mg kg⁻¹. ** Ajuste pela pureza (97%) e acréscimo de 10% pela perda da eficiência durante a extrusão e secagem em 100-110°C.

2.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água

A temperatura da água durante todo o experimento (outono, inverno, primavera e verão) foi aferida diariamente utilizando um termômetro digital de máxima e mínima (19,69 ± 0,21°C e 22,80 ± 0,22°C; Incoterm® ±0,1°C). Especificamente durante o período reprodutivo (primavera e verão), a temperatura da água manteve-se entre 24,46 ± 0,17°C e 26,43 ± 0,19°C. Semanalmente também foram mensurados os níveis de oxigênio dissolvido da água (5,19 ± 0,2 mg L⁻¹; às 6h; Oxímetro YSI® 550A), o pH da água (7,14 ± 0,14; às 6h e às 16h; pHmeter Tecnal® Tec5), a amônia total (0,08 ± 0,02 mg L⁻¹; Fotocolorímetro AlfaKit® AT100 PBII) e nitrito (0,07 ± 0,02 mg L⁻¹; Fotocolorímetro AlfaKit® AT100 PBII).

2.4 Manejo reprodutivo

No final da primavera, as fêmeas foram avaliadas a cada 10 dias para identificar o estágio de maturação gonadal, observando-se as características de abdômen arredondado, papilas urogenitais entumecidas e avermelhadas e, a evidência de liberação de pequenas parcelas de ovócitos de coloração e tamanho uniforme (Bombardelli et al. 2006; Hilbig et al., 2019).

Na primeira maturação do ano (janeiro), todas as fêmeas de cada unidade experimental foram individualmente pesadas, medidas e alojadas em aquários de 500 litros, instalados em sistema de recirculação de água, com aeração, filtros mecânico e biológico, esterilização ultravioleta (UV) e aquecimento elétrico ($26 \pm 1^\circ\text{C}$).

Todas as fêmeas foram submetidas à manipulação hormonal para sincronização da ovulação. Para tanto foi utilizado o extrato de hipófise de carpa (CPE) (Woynarovich e Horváth, 1980), aplicado em duas doses de forma intramuscular na região dorsal do peixe. A primeira dose hormonal foi aplicada contendo 0,5 mg de CPE kg de fêmea⁻¹ e, após 12 horas, aplicada uma segunda dose com 5,0 mg de CPE kg de fêmea⁻¹ (Bombardelli et al., 2006).

Após 10 horas (água a 24°C), contadas a partir da aplicação da segunda dose hormonal (Goes et al., 2024), as fêmeas foram contidas e secas com pano e papel toalha e, em seguida submetidas à massagem abdominal na direção cefalocaudal (Witeck et al., 2011). Os oócitos foram coletados em recipientes plásticos e secos.

O sêmen utilizado na fertilização artificial dos ovócitos foi proveniente de um grupo de machos não experimentais, com um ano de idade, criados nas mesmas condições das fêmeas, mas alimentados com ração comercial contendo 320 g kg⁻¹ de PD e 13.40 MJ kg⁻¹ de ED. Para tanto, foram utilizados 79 machos ($173,41 \pm 0,3\text{g}$) que apresentavam características de maturação gonadal e liberação de sêmen sob leve pressão abdominal (Buzzi et al., 2021). Estes machos foram manejados de forma semelhante às fêmeas, contudo receberam uma dose única de 3,0 mg de CPE kg de reprodutor⁻¹, aplicado de forma intramuscular na região dorsal (Bombardelli et al., 2021a). O sêmen foi coletado individualmente em tubos graduados ($\pm 0,2\text{ mL}$) (Neumann et al, 2021; Pedreira et al., 2022). A primeira gota de sêmen de cada reprodutor foi desprezada para evitar a contaminação do sêmen com fezes e urina (Goes et al., 2017). Após a coleta do sêmen, as amostras foram armazenadas à 12°C durante o tempo necessário (± 20 minutos) para a realização de análises das características espermáticas (Bombardelli et al., 2021a).

Foram realizadas avaliações individuais nas amostras de sêmen de cada reprodutor, para avaliar de forma subjetiva a ocorrência de espermatozoides móveis decorrentes de contaminações acidentais das amostras (Da Costa et al., 2021). Em seguida, somente as amostras de sêmen com espermatozoides imóveis foram avaliadas pelo Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) para determinar os parâmetros de movimento espermático (Bombardelli et al., 2021a). A concentração espermática também foi mensurada em câmara hematómica de Neubauer (Rurangwa et al., 2004; Goes et al., 2017; Bombardelli et al., 2021a).

Para a fertilização dos oócitos foram utilizadas somente amostras de sêmen sem a ocorrência de ativação espermática acidental, com $71,42 \pm 4,91$ % de espermatozoides móveis e $2,05 \pm 0,17 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} . Assim, amostras de sêmen provenientes de três machos foram homogeneizadas para compor um “*pool*” de sêmen, o qual serviu para fertilizar os ovócitos de todas as fêmeas de uma única gaiola. A partir deste “*pool*” de sêmen, foi utilizado um volume de sêmen para a fertilização dos ovócitos que disponibilizasse 100.000 espermatozoides móveis oócito⁻¹ (Bombardelli et al., 2006; Goes et al., 2024). Após a coleta dos gametas, as fêmeas e machos foram novamente alojados em suas respectivas gaiolas e criados conforme descrito anteriormente até alcançarem a segunda maturação gonadal da estação reprodutiva.

2.5 Fecundidade das fêmeas e ensaios de fertilização dos oócitos e eclosão dos ovos

Imediatamente após a desova, 5,0 mL de oócitos de cada fêmea desovante, provenientes de cada gaiola foram separados para os ensaios de fertilização. Em seguida, outras três amostras de 0,1mL de oócitos foram retiradas para determinação do número de ovócitos liberados em cada mililitro, além do peso dos oócitos. Outras duas amostras de 0,1mL de oócitos de cada fêmea foram fixadas em solução de formol 4%, tamponado com carbonato de cálcio (pH=7,0), para posterior mensuração do diâmetro dos oócitos. Outras duas amostras de 1 mL de oócitos de cada fêmea foram coletadas e armazenadas em microtubos a -80°C para posterior análises bioquímicas e quantificação dos níveis de ácido fólico. Os oócitos remanescentes e não utilizados nos ensaios de fertilização foram hidratados para posterior mensuração do volume total de oócitos hidratados. Em seguida, três amostras de 5,0 mL de oócitos hidratados proveniente de cada fêmea foram retiradas para determinação do número de oócitos hidratados presentes em cada mililitro. Finalmente, a fecundidade de cada fêmea foi estimada a partir da somatória do número total de oócitos utilizados nos ensaios de fertilização, aqueles utilizados

para as diferentes análises e os oócitos hidratados remanescentes. Foram determinadas a fecundidade absoluta (número total de oócitos liberados pela fêmea desovante; número total de oócitos liberados por todas as fêmeas de uma gaiola) e as fecundidades relativas (número de oócitos liberados por cada grama de peso corporal da fêmea desovante; número de oócitos liberados por cada grama de peso corporal das fêmeas presentes na gaiola) (Bombardelli et al., 2015; Goes et al., 2017; Goes et al., 2024).

Os ensaios de fertilização artificial foram realizados em duplicata imediatamente após as desovas. Para tanto, de cada gaiola foram organizados três “*pools*” de oócitos, sendo cada “*pool*” composto pelas amostras de oócitos de 5mL descritos anteriormente provenientes de três fêmeas (3 “*pools*”/gaiola; 15 fêmeas/gaiola). Cada “*pool*” de oócitos foi submetido à fertilização artificial a seco, em recipientes plásticos de 2000 mL, onde foram adicionadas parcelas de sêmen fresco, de modo a disponibilizar 100.000 espermatozoides móveis oócito⁻¹ (Bombardelli et al., 2006; Goes et al., 2017). Em seguida, a ativação dos espermatozoides foi realizada pela adição de 200mL de água, seguida pela imediata e suave homogeneização dos gametas pelo tempo de 60 segundos. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em água limpa e hidratados antes de serem transferidos para incubadoras cônicas de 60L. As incubadoras foram instaladas em um sistema de recirculação de água, dotado de aeração constante, filtros mecânicos e biológicos, além de esterilização UV e aquecimento elétrico ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Após o início da incubação dos ovos, as temperaturas máxima e mínima foram monitoradas diariamente, por meio de termômetro digital (Incoterm®).

As taxas de fertilização foram mensuradas depois do fechamento do blastóporo, aproximadamente 12 horas após a fertilização (HPF) (Pereira et al., 2006; Amorim et al., 2009; Pedreira et al., 2022). Este procedimento foi realizado a partir da contagem de três amostras de ovos ($203,67 \pm 16,62$ ovos) de cada incubadora (Neumann et al., 2019). Depois da eclosão (36 HPF; água à $25,56 \pm 0,36^\circ\text{C}$) as larvas de cada incubadora foram fixadas em solução de formol 4%, tamponado com carbonato de cálcio (pH=7,0). As taxas de eclosão foram estimadas por meio da contagem total das larvas fixadas (Goes et al., 2017). Finalmente, cerca de 300 larvas fixadas foram utilizadas para avaliar a normalidade morfológica das proles e determinar o percentual de larvas normais e anormais (Amorim et al., 2009). Dentre as larvas com malformações, foram determinados o percentual de larvas com curvatura na coluna e com deformações no crânio, olhos, saco vitelino, edema cardíaco e tronco encurtado (Jezierska et al., 2000). Para a avaliação morfológica, imagens das larvas foram obtidas em microscópio Olympus CX23® (objetiva 4x) com câmera fotográfica acoplada (Olympus SC30®).

Posteriormente, foram mensurados o comprimento total e a área do saco vitelínico pelo software ImagePro-plus® e, o peso das larvas determinado em balança analítica ($\pm 0,0001\text{g}$; Gehaka AG200®).

Também foram coletadas aleatoriamente de cada incubadora amostras de embriões com 12 e 18 HPF e de larvas com 36 HPF. A coleta foi realizada com uma pipeta graduada de 10 mL, as amostras foram secas em peneira e separados 1 ml em microtubos, as quais foram congeladas em vapor de nitrogênio e armazenadas à -80°C para posterior realização das análises bioquímicas.

Ainda, imediatamente após a eclosão dos ovos, 100 larvas de cada incubadora foram alojadas em aquários de 500 mL e submetidas ao jejum. O vigor das larvas foi determinado pela mensuração do tempo necessário para ocorrência de 100% da mortalidade das larvas submetidas ao jejum (Lavens et al., 1999; Bombardelli et al., 2015; Bombardelli et al., 2021b).

2.6 Crescimento, índices corporais, coleta de sangue e tecidos

A partir dos dados obtidos pela biometria realizada em dezembro, foram calculados os parâmetros peso médio, comprimento padrão médio, ganho de peso, ganho de peso diário, conversão alimentar aparente, conversão alimentar em produção de ovos (Lima et al., 2020), fator de condição (Vazzoler, 1996) e sobrevivência.

Após 45 dias contados a partir da desova, cinco fêmeas de cada unidade experimental foram selecionadas aleatoriamente e anestesiadas com eugenol (50 mg L^{-1}) (Cunha et al., 2010). Em seguida, as fêmeas foram submetidas à coleta de sangue por meio de punção da veia caudal (Ranzani-Paiva et al., 2013), utilizando seringas de 3mL e agulha 0,55 x 20,00 mm. Uma alíquota de 1mL do sangue coletado com anticoagulante (EDTA) foi destinada para análise do sangue fresco. Outra alíquota sem EDTA foi centrifugada (Micro Centrífuga NT805 Novatécnica®) a 9.970 g por 10 minutos à 4°C . Em seguida o soro foi retirado e armazenado a -80°C (Ultra Freezer SS Scientific®) para análises bioquímicas e quantificação dos níveis de ácido fólico. Este procedimento foi realizado para garantir que o ritmo/intensidade dos parâmetros sanguíneos relacionados com a vitelogênese e a maturação gonadal pudessem ser identificados, uma vez que estes parâmetros se igualam quando todas as fêmeas entrem em estágio de dormência para aguardar o momento adequado para desova (Harvey e Carolsfeld, 1993).

Após a coleta de sangue, os animais anestesiados foram eutanasiados pela imersão em solução contendo dose letal de eugenol (500 mg L^{-1}) (Cunha et al., 2010), seguido pela secção

da coluna vertebral e dissecados para obtenção do peso do fígado, vísceras e gônadas. Amostras de fígado e ovário foram armazenados a -80 °C em ultrafreezer (Ultra Freezer SS Scientific®) para posterior realização das análises bioquímicas. Porções provenientes da região mediana dos fígados e dos ovários também foram coletadas e fixadas em solução de formol 10% tamponado, para posterior processamento e análise histológica. Em seguida foram calculados os índices hepatossomático (IHS), (Tessaro et al., 2012), gonadossomático (Vazzoler, 1996) e viscerossomático (IVS) (Ng e Wang, 2011).

2.7 Hemograma e parâmetros bioquímicos no soro

No sangue fresco foi mensurada a concentração de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina (Drabkin e Austin, 1935), utilizando kit comercial (Hemoglobina Bioclin®), com leituras realizadas em absorbância, em comprimento de onda de 530 nm (Ranzani-Paiva et al., 2013). O hematócrito (Ht) também foi mensurado pelo método de microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971), onde o sangue depositado em tubo capilar foi centrifugado a 12000 rpm (11.290g) por 5 minutos, seguido da avaliação em régua hematimétrica. A contagem de eritrócitos foi realizada em Câmara Hematimétrica de Neubauer, com o sangue diluído em proporção 1:200 em solução salina a 0,65% (Ranzani-Paiva et al., 2013). Com base nos resultados, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) = $[(Ht/n^{\circ} \text{ eritrócitos}) \times 10]$, hemoglobina corpuscular média (HCM) = $[(Hb/n^{\circ} \text{ eritrócitos}) \times 10]$ e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = $[(Hb/Ht) \times 100]$ (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A partir das amostras de sangue fresco, foram preparadas extensões sanguíneas para mensuração do leucograma e trombograma. As extensões sanguíneas (Ranzani-Paiva et al., 2013), foram coradas utilizando panótico rápido (Laborclin®) e secas a 25° C. Após a coloração, foram realizadas capturas de imagens das extensões coradas em uma câmera (True Chrome IIS®) acoplada a um microscópio (Nikon Eclipse E200®), na objetiva de 100x com óleo de imersão. As capturas de imagem foram analisadas no software ImageJ 1.48v®. De cada fêmea, foram contabilizadas pelo menos 2.000 células, e posteriormente determinada a contagem diferencial de leucócitos. As células avaliadas foram identificadas e contabilizadas como: linfócitos, monócitos, neutrófilos basófilos, eosinófilos, célula granulocítica especial (CGE), leucócitos imaturos e trombócitos, segundo Ranzani-Paiva et al. (2013).

Nas amostras de soro sanguíneo foram avaliados os níveis de glicose (REF. 112E), proteínas totais (REF. 418), triglicerídeos (REF. 459E), colesterol total (REF. 460E), colesterol

HDL (REF. 413), colesterol LDL (REF. 401), fosfatase alcalina (REF. 440), aspartato aminotransferase (REF. 421E), alanina aminotransferase (REF. 422E), creatinina (REF. 435) e albumina (REF. 419). As análises foram realizadas utilizando o kit comercial Gold Analisa Diagnóstica® (Minas Gerais, Brasil) e, as leituras realizadas em leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go®). No soro também foram quantificadas as concentrações de estradiol-17B, pelo método de quimioluminescência (Sing et al., 1997) (Bionostic®, Paraná, Brasil). Os níveis de globulinas foram calculados pela diferença entre o conteúdo de proteínas totais e albumina no soro (Ruiz-González et al., 2023).

2.8 Análises bioquímicas no fígado, ovários, ovócitos, embriões e larvas

As amostras do fígado, ovário, ovócitos, embriões (12 e 18 horas) e larvas (36 horas) foram processadas separadamente com adição de tampão fosfato salina (pH=7,2) e posteriormente rompidas (T10 basic, IKA®) e centrifugadas (Micro Centrífuga NT805 Novatécnica®) a 11000 rpm (12.806g) à 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, fracionado em microtubos de 1,5 mL e armazenado em ultra freezer a -80 °C (Ultra Freezer SS Scientific®). Uma fração da amostra preparada foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), com leitura em absorbância, em comprimento de onda de 595 nm. Após a quantificação de proteínas, as amostras foram padronizadas para 1mg mL⁻¹ de proteína, para realização dos ensaios.

Para determinar a peroxidação de lipídios utilizou-se o método de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) segundo Federici et al. (2007), que se baseia na oxidação do Fe²⁺ mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe³⁺ e laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, com leituras realizadas em absorbância, em comprimento de onda de 570 nm.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme Crouch et al. (1981), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a redução do NBT (Nitroblue tetrazolium) para azul de formazan, pelo radical superóxido gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, com leituras em absorbância, em comprimento de onda de 560 nm.

A análise da atividade da enzima catalase foi mensurada segundo Aebi (1984), que se baseia no decréscimo de absorbância devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, com leitura em absorbância, em comprimento de onda de 240 nm.

A mensuração da atividade da glutathione S-Transferase (GST) foi realizado conforme Habig et al. (1976), quer parte do princípio de que o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é

metabolizado pela enzima GST conjugado à enzima glutathiona reduzida (GSH) com aumentos de absorvância em comprimento de onda de 340 nm. Durante o ensaio, a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético CDNB que produz um conjugado, o qual é detectado em absorvância em comprimento de onda de 340 nm. Essa atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado.

O nível de carbonilação de proteínas (PCO) foi mensurado segundo Levine et al. (1990), que consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas em absorvância, em comprimento de onda de 370 nm.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas em uma leitora de microplaca (Fisherscientific Accuskan Go[®]), com leitura em absorvância.

2.9 Quantificação de ácido fólico no sangue e oócitos

Os níveis de folatos no soro sanguíneo foram quantificados pelo método de quimioluminescência (Sing et al., 1997), utilizando Sistemas de Imunoensaio Access (Bionostic[®], Paraná, Brasil). Apenas nos ovócitos, devido à reduzida quantidade de amostras, foi constituído um “pool de ovócitos”, proveniente de todas as fêmeas de cada tratamento. Aliquotas deste “pool” de ovócitos foram submetidas à análise de quantificação dos folatos, sendo os resultados apresentados de forma descritiva, constituída apenas pela média do tratamento.

Para a extração dos folatos nos ovócitos, as amostras foram tratadas com soluções aquosas de hidróxido de potássio (0,1 mol L⁻¹) e de tetraborato de sódio (0,04 mol L⁻¹) ajustado em pH 8,5. O extrato foi percolado em cartuchos SPE (*solid phase extraction*) contendo o sorvente SAX (*Strong anion exchange*) previamente condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água purificada. Para a eluição do ácido fólico foram utilizados 5 mL de solução tampão de acetato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH=4,5). A solução final foi filtrada em membrana 0,2 µm e analisada em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC- DAD) (Bionostic[®], Paraná, Brasil), com detecção em 285 nm (Prado et al., 2017).

2.10 Perfil de ácidos graxos do fígado e ovário

Os ácidos graxos foram medidos utilizando a extração lipídica total de acordo com a metodologia de Bligh e Dyer (1959). Os lipídios totais foram transmetilados conforme descrito por Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados utilizando

um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, acoplado a um detector de massa (Agilent 5975C), utilizando uma coluna RT-x Wax Polyetileno Glycol (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno). O hidrogênio foi usado como gás de arraste e o volume de injeção da amostra foi de 1 µL em uma proporção de divisão de 1:50. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, enquanto a temperatura da coluna foi de 80°C por 2 min, depois aumentou para 235°C a uma taxa de 4°C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 10 min. Os ácidos graxos foram identificados utilizando a biblioteca NIST (MS Search, versão 2.0), e a quantificação foi baseada na área relativa do padrão interno do éster metílico C23:0 (tricosanoato de metila). Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹ de ácidos graxos.

2.11 Histologia do fígado e ovário

As amostras fixadas de fígado e ovário foram desidratadas pela passagem em séries crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os diferentes tecidos foram cortados em 5µm de espessura, os quais foram corados em hematoxilina e eosina (H.E.) (adaptado de Mewes et al., 2016). As lâminas foram montadas em Permont[®], avaliadas e fotografadas em uma câmera (True Chrome IIS[®]) acoplada a um microscópio (Nikon Eclipse E200[®]) utilizando software ISCapture 4.1[®].

No fígado, a avaliação se baseou na observação dos aspectos gerais do tecido hepático, verificação de alterações no padrão do tecido, presença de distúrbios vasculares e formação de vacúolos citoplasmáticos nos hepatócitos. Foi atribuído um escore de vacuolização, onde 0 = não observados vacúolos, 1 = poucos vacúolos, 2 = vacuolização média, 3= vacuolização severa (Tessaro et al., 2014; Caballero et al., 2004; Mewes et al., 2016). Também foi verificado a presença de hemorragias e atribuído um escore para hemorragia hepática, onde 0 = não observado, 1= discreta (até duas ocorrências da alteração por lâmina), 2= moderada (três a cinco ocorrências da alteração por lâmina) e 3= intensa (acima de cinco ocorrências da alteração por lâmina) (Albinati et al., 2009).

As avaliações morfológicas do tecido hepático foram realizadas a partir da captura de imagens em campos aleatórios nas regiões adjacentes às veias centro lobulares, onde foram mensuradas a área e comprimento de pelo menos 200 hepatócitos (Bombardelli et al., 2021b; Bombardelli et al., 2023). A partir dos resultados obtidos, foram calculados a área e o comprimento médio dos hepatócitos. As avaliações do tecido hepático foram realizadas por meio da captura de imagens em objetiva de 40x (Tessaro et al., 2014) e analisadas pelo ImagePro-plus[®].

Nos ovários de cada fêmea, foram capturadas pelo menos 20 imagens (objetiva 4x) para avaliar os estágios de maturação gonadal (Vazoller, 1996; Reidel et al., 2010, Tessaro et al., 2014). Destas imagens, foram determinados os percentuais de ocorrência de ovogônias, ovócitos de crescimento primário e secundário, ovócitos vitelogênicos, folículos pós ovulatório e folículos atrésicos (Tessaro et al., 2014, Lima et al., 2020).

2.12 Composição centesimal dos tecidos corporais

Amostras de ovários, fígado, vísceras e músculos das fêmeas sacrificadas foram armazenadas a -25°C (Mewes et al., 2016) para posterior determinação do teor de proteína bruta, lipídio bruto, matéria seca e cinzas, segundo Mizubuti et al. (2009).

2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os resíduos obtidos foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Posteriormente, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando um nível de 5% de probabilidade. Somente os resultados de teores de folatos nos ovócitos não foram submetidos às análises estatísticas, sendo apresentados de forma descritiva como média $\pm$ erro padrão. O processamento e análise de dados foram realizados pelo software Statistica 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Resultados

A reprodução das fêmeas foi influenciada pela suplementação de ácido fólico na dieta (Tabela 2). O peso das fêmeas que desovaram foi maior ($p < 0,05$) quando os peixes foram alimentados com rações suplementadas entre 0,75 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} . Fêmeas alimentadas com rações suplementadas com 1,5, 2,25 e 3,0 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentaram maiores taxa de eclosão e larvas com maior comprimento ($p < 0,05$). A suplementação de ácido fólico não influenciou ($p > 0,05$) nos demais parâmetros reprodutivos.

A qualidade das larvas melhorou quando as fêmeas foram alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico (Tabela 3). As fêmeas alimentadas com rações suplementadas com 3,0 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} produziram proles com maiores ($p < 0,05$) taxas de normalidade larval. Especificamente as malformações na curvatura da coluna vertebral das

larvas diminuíram ($p < 0,05$) quando as fêmeas foram alimentadas com rações suplementadas entre 1,5 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} .

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg^{-1})						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
PFD (g)	399,89 $\pm 6,52^b$	444,26 $\pm 14,55^a$	454,81 $\pm 15,02^a$	465,41 $\pm 15,45^a$	441,67 $\pm 5,16^a$	446,58 $\pm 4,49^a$	0,0019
FD (%)	82,98 $\pm 3,47$	81,31 $\pm 4,26$	89,88 $\pm 5,75$	91,55 $\pm 1,63$	81,31 $\pm 3,17$	80,00 $\pm 8,16$	0,4360
Fecundidade O FD ⁻¹ ($\times 10^3$)	87,24 $\pm 8,97$	95,44 $\pm 15,02$	81,93 $\pm 16,34$	91,18 $\pm 6,55$	81,98 $\pm 12,59$	82,92 $\pm 10,38$	0,9529
Fecundidade O UE ⁻¹ ($\times 10^3$)	1.064,82 $\pm 108,63$	1.211,38 $\pm 180,51$	1.182,06 $\pm 240,36$	1.356,93 $\pm 115,26$	1.052,52 $\pm 141,16$	1.072,50 $\pm 215,14$	0,7985
Fecundidade (O GFD ⁻¹)	218,45 $\pm 23,14$	225,12 $\pm 23,03$	191,53 $\pm 19,61$	216,92 $\pm 24,62$	196,16 $\pm 24,90$	195,31 $\pm 23,87$	0,8204
Fecundidade (O GFUE ⁻¹)	183,14 $\pm 15,39$	184,63 $\pm 25,15$	176,76 $\pm 31,73$	206,16 $\pm 21,54$	161,57 $\pm 19,09$	163,99 $\pm 31,38$	0,8223
CAO ($\times 10^3$ ovos kg ração ⁻¹)	4,06 $\pm 0,77$	4,72 $\pm 0,63$	4,68 $\pm 0,56$	5,16 $\pm 0,84$	4,39 $\pm 0,88$	4,19 $\pm 0,91$	0,9484
D ovo (mm)	0,91 $\pm 0,01$	0,91 $\pm 0,02$	0,93 $\pm 0,01$	0,91 $\pm 0,02$	0,90 $\pm 0,01$	0,90 $\pm 0,01$	0,7875
Fertilidade (%)	29,17 $\pm 2,87$	31,75 $\pm 3,59$	38,63 $\pm 3,54$	35,23 $\pm 2,15$	41,22 $\pm 4,42$	30,89 $\pm 1,16$	0,1084
Eclosão (%)	20,00 $\pm 0,95^b$	28,95 $\pm 3,19^{ab}$	34,65 $\pm 1,86^a$	30,80 $\pm 1,55^a$	39,46 $\pm 3,97^a$	29,49 $\pm 0,90^{ab}$	0,0014
CTL (mm)	3,38 $\pm 0,06^b$	3,64 $\pm 0,11^{ab}$	3,77 $\pm 0,09^a$	3,78 $\pm 0,10^a$	3,77 $\pm 0,03^a$	3,72 $\pm 0,07^{ab}$	0,0275
ASV (mm^2)	0,41 $\pm 0,03$	0,44 $\pm 0,01$	0,46 $\pm 0,02$	0,46 $\pm 0,03$	0,46 $\pm 0,02$	0,46 $\pm 0,01$	0,4907
PL (g) ($\times 10^{-4}$)	7,51 $\pm 0,16$	8,04 $\pm 0,43$	7,72 $\pm 0,21$	7,25 $\pm 0,13$	7,92 $\pm 0,49$	7,54 $\pm 0,69$	0,7694
Sob jejum (dias)	6,09 $\pm 0,17$	6,35 $\pm 0,45$	6,49 $\pm 0,35$	6,50 $\pm 0,25$	6,70 $\pm 0,13$	6,64 $\pm 0,24$	0,7154

Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão. PFD: Peso médio fêmeas desovantes; FD: Fêmeas desovantes; O FD⁻¹: Oócitos por fêmea desovante; O UE⁻¹: Oócitos por unidade experimental; O GFD⁻¹: Oócitos por grama de fêmea desovante; O GFUE⁻¹: Oócitos por grama de fêmeas da unidade experimental; CAO: Conversão alimentar em ovos; D ovo: Diâmetro do oócito; CTL: Comprimento total da larva; ASV: Área do saco vitelino; PL: Peso larval; Sob. Jejum: Sobrevivência ao jejum. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros morfológicos e morfométricos de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Malformações	Ácido fólico (mg kg^{-1})						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Norm. L (%)	70,17 $\pm 6,08^b$	75,83 $\pm 1,67^{ab}$	83,83 $\pm 4,20^{ab}$	84,33 $\pm 2,68^{ab}$	88,00 $\pm 2,49^a$	88,17 $\pm 1,04^a$	0,0173
Curv. C (%)	23,83 $\pm 1,96^b$	16,83 $\pm 2,96^b$	7,17 $\pm 1,01^a$	5,67 $\pm 1,09^a$	6,83 $\pm 1,17^a$	5,33 $\pm 0,33^a$	0,0000
Colu. C (%)	0,17 $\pm 0,17$	0,00 $\pm 0,00$	0,50 $\pm 0,50$	0,17 $\pm 0,17$	0,00 $\pm 0,00$	0,17 $\pm 0,17$	0,7013
Crânio D (%)	0,67 $\pm 0,67$	1,17 $\pm 0,60$	0,83 $\pm 0,17$	1,00 $\pm 0,00$	0,17 $\pm 0,17$	0,67 $\pm 0,33$	0,6099
Olhos D (%)	1,67 $\pm 1,01$	2,00 $\pm 1,00$	1,33 $\pm 0,44$	2,00 $\pm 1,04$	0,33 $\pm 0,17$	3,00 $\pm 1,89$	0,6528
Saco VD (%)	2,50 $\pm 1,75$	1,33 $\pm 1,33$	1,50 $\pm 0,58$	2,17 $\pm 0,73$	1,00 $\pm 0,77$	1,33 $\pm 0,72$	0,9112
Ed. Card. (%)	0,33 $\pm 0,33$	0,00 $\pm 0,00$	0,17 $\pm 0,17$	0,33 $\pm 0,33$	0,00 $\pm 0,00$	0,50 $\pm 0,5$	0,7785
Tronco Enc. (%)	0,67 $\pm 0,67$	2,83 $\pm 1,92$	4,67 $\pm 3,44$	4,33 $\pm 2,59$	3,50 $\pm 2,02$	3,50 $\pm 0,76$	0,8432

Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão. Norm. L: Normalidade larval; Curv. C: Curvatura na coluna; Colu. C: Coluna em forma de “C”; Crânio D: Crânio deformado; Olhos D: Olhos deformados; Saco VD: Saco vitelino deformado; Ed. Card.: Edema cardíaco; Tronco Enc: Tronco encurtado. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

O crescimento das fêmeas foi influenciado ($p < 0,05$) pela suplementação de ácido fólico na dieta (Tabela 4). As fêmeas alimentadas com rações suplementadas entre 0,75 e 3,25 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentaram maiores peso final ($p < 0,05$), comprimento padrão ($p < 0,05$) e ganho de peso diário ($p < 0,05$). A menor conversão alimentar ($p < 0,05$) foi registrada nas fêmeas alimentadas com rações suplementadas com 3,00 mg de ácido fólico kg^{-1} . A suplementação de ácido fólico não influenciou na sobrevivência, fator de condição e índices somáticos das fêmeas ($p > 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros de crescimento e índices corporais de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg^{-1})						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
PF (g)	392,40±9,18 ^b	444,09±11,07 ^a	449,07±8,96 ^a	449,58±7,62 ^a	438,83±7,51 ^a	433,83±4,84 ^a	0,0012
CP (cm)	25,81±0,42 ^b	27,37±0,16 ^a	26,84±0,30 ^{ab}	26,72±0,11 ^{ab}	26,86±0,31 ^{ab}	26,69±0,39 ^{ab}	0,0483
GPD (g)	2,66±0,09 ^b	3,17±0,12 ^a	3,19±0,12 ^a	3,23±0,09 ^a	3,08±0,08 ^a	3,08±0,09 ^a	0,0097
CAA	1,50±0,03 ^b	1,39±0,05 ^{ab}	1,37±0,06 ^{ab}	1,37±0,02 ^{ab}	1,26±0,02 ^a	1,38±0,05 ^{ab}	0,0204
SOB (%)	98,33±1,67	98,33±1,67	100,00±0,0	100,00±0,0	100,00±0,0	100,00±0,0	0,5640
K	2,06±0,07	1,98±0,06	2,06±0,06	2,04±0,07	1,96±0,07	2,05±0,07	0,8100
IHS (%)	1,28±0,10	1,17±0,07	1,27±0,10	1,34±0,10	1,26±0,05	1,26±0,08	0,8368
IVS (%)	4,63±0,28	4,41±0,23	4,56±0,27	4,36±0,17	4,19±0,13	3,78±0,16	0,1251
IGS (%)	8,50±0,54	8,69±0,29	8,87±0,18	9,41±0,62	8,62±0,73	9,92±0,90	0,5287

Os valores são expressos como média ± erro padrão. PF: peso final; CP: comprimento padrão; GPD: ganho de peso diário; CAA: conversão alimentar aparente; SOB.: sobrevivência; K: Fator de condição; IHS: índice hepatossomático; IVS: índice viscerossomático; IGS: índice gonadossomático. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação aos parâmetros hematológicos, as fêmeas alimentadas com as rações suplementadas com 3,0 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} apresentaram os maiores números de eritrócitos ($p < 0,05$; Tabela 5). A alimentação com as rações suplementadas entre 0,75 e 3,75 mg de ácido fólico kg^{-1} aumentou ($p < 0,05$) o número de trombócitos no sangue (Tabela 5; Figura 1). Os demais parâmetros hematológicos não foram afetados pelas dietas ($p > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Erit. (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1,34±0,07 ^b	1,49±0,05 ^{ab}	1,49±0,01 ^{ab}	1,54±0,01 ^{ab}	1,56±0,06 ^a	1,56±0,03 ^a	0,0246
HB (g dL ⁻¹)	4,49±0,22	4,24±0,20	4,32±0,22	4,66±0,22	4,72±0,16	4,66±0,14	0,4360
HCT (%)	27,69±0,40	30,66±1,56	29,54±1,91	27,53±1,35	28,96±1,32	29,52±0,56	0,6743
VCM (fL)	196,52±3,77	201,47±6,61	198,70±10,84	178,39±8,02	180,57±3,26	188,72±5,73	0,2614
HCM (pg)	33,99±3,23	28,31±0,48	28,99±1,45	30,37±1,37	30,24±1,12	29,88±0,54	0,2574
CHCM (g dL ⁻¹)	15,81±0,63	14,27±0,59	15,20±0,58	17,85±1,19	16,14±0,17	15,76±0,79	0,1519
Leuc. (x10 ³ µL ⁻¹)	45,28±4,14	47,49±3,56	49,29±4,14	48,90±4,64	50,53±0,76	41,85±3,92	0,7592
Linf (x10 ³ µL ⁻¹)	20,46±1,90	20,84±4,16	21,78±1,12	20,88±2,86	23,53±2,55	20,37±2,69	0,9606
Mono. (x10 ³ µL ⁻¹)	0,75±0,08	0,89±0,17	0,87±0,11	0,57±0,15	0,88±0,08	0,76±0,14	0,4885
Neut. (x10 ³ µL ⁻¹)	12,22±1,74	12,63±0,94	13,66±2,37	14,40±1,59	12,02±1,38	9,92±1,09	0,4767
Bas. (x10 ³ µL ⁻¹)	0,11±0,07	0,09±0,03	0,07±0,04	0,11±0,07	0,11±0,08	0,10±0,03	0,9952
Eosi (x10 ³ µL ⁻¹)	0,60±0,06	0,79±0,14	0,83±0,13	0,83±0,22	0,88±0,08	0,72±0,14	0,7507
CGE (x10 ³ µL ⁻¹)	0,23±0,10	0,32±0,08	0,37±0,08	0,52±0,22	0,47±0,12	0,48±0,05	0,5535
CI (x10 ³ µL ⁻¹)	3,74±0,86	4,12±0,66	4,45±1,29	5,02±0,65	5,86±0,92	4,58±0,34	0,5776
Tromb (x10 ³ µL ⁻¹)	13,76±1,86 ^b	23,05±2,46 ^a	27,65±2,28 ^a	26,74±0,23 ^a	29,89±1,99 ^a	25,47±1,86 ^a	0,0002

Os valores são expressos como média ± erro padrão. Erit: Eritrócitos; HB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc.: leucócitos; Linf.: linfócitos; Mono.: monócitos; Neut.: neutrófilos; Bas.: basófilos; Eosi.: eosinófilos; CGE: célula granulocítica especial; CI: células imaturas; Tromb.: trombócitos. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

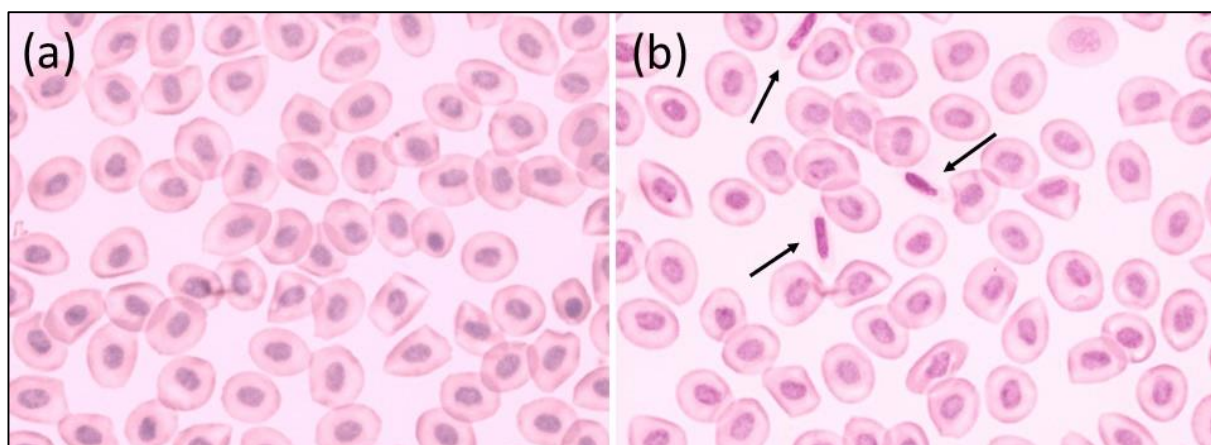


Figura 1. Eritrócitos de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva (Coloração panótico; 100x). (a) Fêmea alimentada com dieta isenta de suplementação de ácido fólico. (b) Fêmea alimentada com dieta suplementada com 3,0 mg kg⁻¹ de ácido fólico. As setas indicam a presença de trombócitos.

Os níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase diminuíram ($p < 0,05$) no sangue de fêmeas alimentadas com rações suplementadas entre 0,75 e 3,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ (Tabela 6). Além disso, as fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com 2,25 mg de ácido fólico kg⁻¹ apresentaram níveis mais elevados de proteínas totais ($p < 0,05$) e,

maiores níveis ($p < 0,05$) de albumina e globulina (Tabela 6). Os demais parâmetros bioquímicos não foram influenciados pelas dietas ($p > 0,05$).

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos no soro de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
GLU (mg dl ⁻¹)	90,05±9,14	104,27±3,97	114,45±9,55	119,85±10,86	120,10±12,68	121,58±12,98	0,2910
TG (mg dl ⁻¹)	232,75±32,98	208,41±35,91	249,61±35,38	227,74±36,17	230,57±36,34	211,98±33,13	0,9773
CHO (mg dl ⁻¹)	214,22±17,36	199,20±19,36	247,70±14,35	225,03±14,07	232,47±13,13	222,06±12,44	0,6935
HDL (mg dl ⁻¹)	134,27±16,49	131,22±15,94	130,10±13,93	137,14±11,54	141,28±9,52	153,42±10,05	0,7541
LDL (mg dl ⁻¹)	74,96 ± 0,22	75,03 ± 0,12	74,96 ± 0,17	74,99 ± 0,08	75,17 ± 0,05	75,20 ± 0,01	0,6480
ALP (U L ⁻¹)	72,06±4,20	71,06±3,70	70,03±3,68	69,71±1,47	76,64±1,26	72,21±2,36	0,8642
ALT (U L ⁻¹)	28,19±0,97 ^a	21,96±2,14 ^{ab}	23,47±1,71 ^{ab}	19,46±1,94 ^b	20,78±1,91 ^{ab}	22,49±2,05 ^{ab}	0,0361
AST (U L ⁻¹)	46,07±2,46 ^a	33,63±3,67 ^b	31,82±3,94 ^b	32,92±2,92 ^b	32,71±1,45 ^b	34,25±1,83 ^b	0,0014
CRE (mg dl ⁻¹)	0,37±0,08	0,38±0,08	0,38±0,05	0,33±0,08	0,40±0,07	0,39±0,07	0,9848
PTT (g dl ⁻¹)	4,32±0,19 ^b	4,29±0,16 ^b	4,83±0,15 ^{ab}	5,10±0,19 ^a	4,60±0,20 ^{ab}	4,48±0,21 ^b	0,0387
ALB (g dl ⁻¹)	1,20±0,03 ^b	1,20±0,02 ^b	1,40±0,02 ^a	1,39±0,04 ^{ab}	1,34±0,03 ^{ab}	1,29±0,05 ^{ab}	0,0092
GBL (g dl ⁻¹)	3,09±0,14 ^b	3,09±0,14 ^b	3,35±0,13 ^{ab}	3,86±0,18 ^a	3,23±0,19 ^{ab}	3,11±0,16 ^b	0,0145
E2 (pg ml ⁻¹)	1.954,75 ±102,14	2.012,75 ±108,69	1.960,00 ±94,67	2.001,75 ±33,48	2.031,75 ±33,37	1.969,50 ±17,21	0,8774

Os valores são expressos como média ± erro padrão. GLU: Glicose; TG: Triglicerídeos; CHO: Colesterol total; HDL: Colesterol HDL; LDL: Colesterol LDL; ALP: Fosfatase alcalina; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; CRE: Creatinina; PTT: Proteínas totais; ALB: Albumina; GBL: Globulina estimada; E2: Estradiol. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

A alimentação das fêmeas com as rações suplementadas com ácido fólico influenciou ($p < 0,05$) os indicadores de equilíbrio redox no ovário, ovócitos e embriões com 18 HPF (Tabela 7). A atividade de catalase aumentou ($p < 0,05$) no ovário de fêmeas quando suplementadas entre 2,25 e 3,75 mg de ácido fólico kg⁻¹ (Tabela 7). Também foi observado aumento ($p < 0,05$) da atividade da catalase nos ovócitos das fêmeas que foram alimentadas com rações suplementadas entre 1,5 e 2,25 mg de ácido fólico kg⁻¹ (Tabela 7). Por outro lado, a peroxidação lipídica diminuiu ($p < 0,05$) nos embriões com 18 HPF quando as fêmeas foram alimentadas com rações suplementadas entre 1,5 e 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹ (Tabela 7). Não foi observada atividade SOD no ovário, oócitos, embrião e larvas de jundiá (Tabela 7). A alimentação das fêmeas com rações suplementadas com ácido fólico não influenciou os parâmetros indicadores do equilíbrio redox no fígado, nos embriões com 12 HPF e nas larvas ($p > 0,05$; Tabela 7).

Tabela 7. Indicadores do equilíbrio redox no fígado, ovário, ovócitos, embriões e larvas de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*), alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Fígado							
LPO	0,25±0,06	0,22±0,03	0,23±0,04	0,24±0,06	0,25±0,05	0,24±0,03	0,9978
SOD	1,00±0,13	1,13±0,36	0,84±0,24	1,19±0,12	1,07±0,27	0,98±0,35	0,9685
CAT	0,25±0,02	0,28±0,02	0,22±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,25±0,03	0,0931
GST	0,42±0,29	0,46±0,043	0,40±0,03	0,36±0,14	0,39±0,19	0,43±0,20	0,2805
PCO (x10 ⁻⁶)	4,36±0,50	5,16±0,38	3,54±0,63	5,17±0,91	3,16±0,82	4,79±0,45	0,2284
Ovário							
LPO	0,90±0,04	0,99±0,11	1,18±0,12	1,20±0,05	1,08±0,09	1,13±0,09	0,1857
SOD	---	---	---	---	---	---	
CAT	0,04±0,003 ^b	0,05±0,004 ^{ab}	0,05±0,009 ^{ab}	0,06 ±0,002 ^a	0,06±0,004 ^a	0,06±0,002 ^a	0,0084
GST	0,20±0,16	0,19±0,01	0,20±0,02	0,18±0,01	0,19±0,01	0,20±0,01	0,8491
PCO (x10 ⁻⁵)	1,03±0,26	0,67±0,03	0,94±0,12	1,12±0,17	0,74±0,08	0,9±0,10	0,2910
Oócitos							
LPO	0,81±0,12	0,73±0,07	1,03±0,07	0,82±0,04	0,95±0,10	0,83±0,10	0,1770
SOD	---	---	---	---	---	---	
CAT	0,03±0,001 ^b	0,03±0,002 ^b	0,04±0,001 ^a	0,04±0,001 ^a	0,04±0,002 ^{ab}	0,04±0,003 ^{ab}	0,0031
GST	0,14±0,01	0,14±0,005	0,16±0,005	0,14±0,005	0,14±0,01	0,14±0,01	0,3356
PCO (x10 ⁻⁵)	3,10±0,76	4,05±0,53	3,75±0,49	5,10±0,41	4,02±1,03	2,78±0,77	0,3025
Embriões 12 HPF							
LPO	0,25±0,10	0,31±0,07	0,26±0,05	0,16±0,02	0,27±0,08	0,24±0,09	0,8805
SOD	---	---	---	---	---	---	
CAT	0,02±0,003	0,03±0,003	0,03±0,007	0,02±0,002	0,03±0,001	0,02±0,002	0,2321
GST	0,09±0,007	0,09±0,001	0,09±0,001	0,10±0,004	0,08±0,005	0,08±0,002	0,2796
PCO (x10 ⁻⁵)	1,04±0,33	0,98±0,32	0,58±0,09	0,91±0,29	1,3±0,15	0,76±0,16	0,6623
Embriões 18 HPF							
LPO	0,50±0,04 ^a	0,31±0,05 ^{ab}	0,22±0,05 ^b	0,29±0,05 ^b	0,29±0,04 ^b	0,30±0,05 ^{ab}	0,0093
SOD	---	---	---	---	---	---	
CAT	0,03±0,004	0,02±0,006	0,02±0,004	0,02±0,003	0,03±0,001	0,02±0,003	0,7790
GST	0,10±0,012	0,08±0,001	0,09±0,002	0,08±0,002	0,09±0,003	0,08±0,002	0,3795
PCO (x10 ⁻⁵)	1,27±0,63	0,64±0,13	0,55±0,10	0,61±0,16	1,07±0,37	0,89±0,38	0,618000
Larvas 36 HPF							
LPO	0,40±0,07	0,25±0,04	0,53±0,07	0,36±0,06	0,22±0,12	0,23±0,09	0,2023
SOD	---	---	---	---	---	---	
CAT	0,04±0,006	0,04±0,001	0,05±0,001	0,03±0,004	0,03±0,004	0,04±0,008	0,4717
GST	0,14±0,015	0,14±0,013	0,13±0,006	0,12±0,002	0,13±0,002	0,13±0,022	0,9863
PCO (x10 ⁻⁵)	0,99±0,10	1,29±0,10	0,96±0,43	1,05±0,31	1,23±0,24	1,04±0,44	0,9787

Os valores são expressos como média ± erro padrão. LPO: Peroxidação lipídica (mM de MDA/mg de proteína); SOD: Superóxido dismutase (und. SOD/mg de proteína); CAT: Catalase (mM de H₂O₂ degradado.min⁻¹/mg de proteína); GST: Glutathione S-Transferase (mM de CDNB.min⁻¹/mg de proteína); PCO: Carbonilação de proteínas (mM de DNPH/mg de proteína). Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores médios da concentração de folatos nos oócitos aumentou conforme foi realizada a suplementação do ácido fólico nas rações. (Figura 2). As maiores concentrações foram observadas nas fêmeas alimentadas com rações suplementadas com 2,25, 3,0 e 3,75 mg

de ácido fólico kg^{-1} . Por outro lado, as concentrações de folato no soro não foram influenciadas ($p>0,05$) pelas dietas das fêmeas (Figura 2).

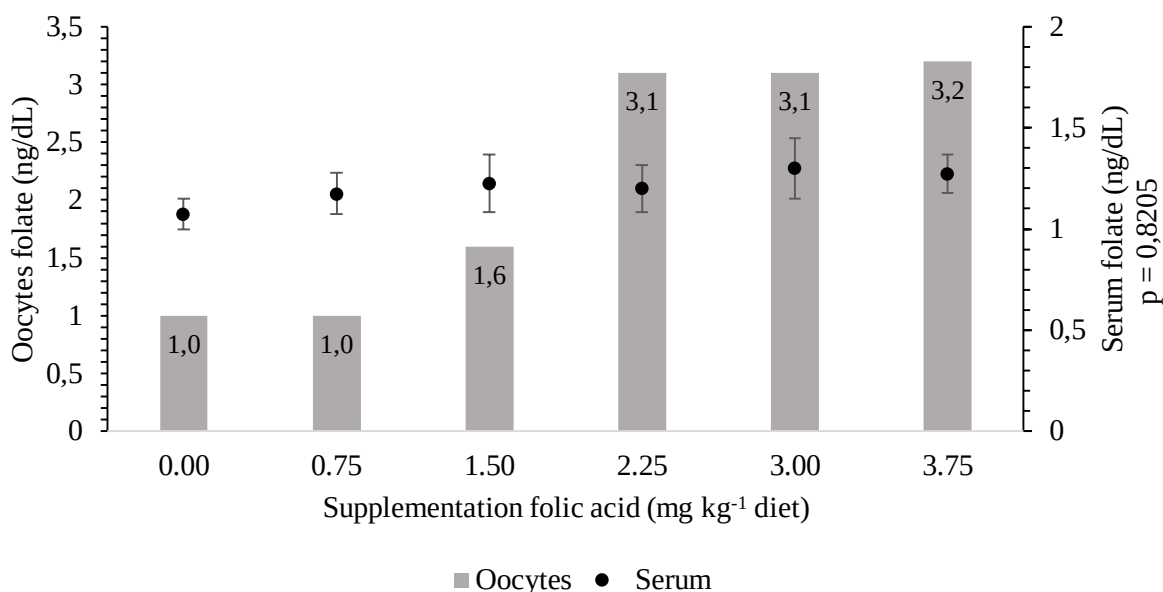


Figura 2. Quantificação de folatos totais no soro e nos ovócitos de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

O perfil e a soma de ácidos graxos no fígado e ovários das fêmeas foram influenciados por dietas suplementadas contendo diferentes níveis de ácido fólico ($p<0,05$; Tabelas 8 e 9). Os principais ácidos graxos presentes no fígado e ovários das fêmeas foram o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0) e o ácido oleico (C18:1) (Tabelas 8 e 9). De modo geral o fígado de fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com 2,25 e 3 mg kg^{-1} de ácido fólico apresentou as maiores quantidades de C14:0 , C18:1 , C18:1n9t , C20:2 , C20:3n6 , C20:4n6 , ácidos graxos C22:6n3 e maior soma de $\sum\text{MUFA}$ ($p<0,05$; Tabela 8). O ovário de fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com 2,25 e 3 mg kg^{-1} de ácido fólico apresentaram as maiores quantidades de ácidos graxos C14:0 , C16:1 , 18:0 , C18:1 , C20:1n9 , C20:3n6 , o maior soma de $\sum\text{MUFA}$ e maior relação entre $\sum\text{SFA}/\sum\text{PUFA}$ ($p<0,05$). Por outro lado, esses ovários apresentaram as menores quantidades de C20:5n3 e soma de $\sum\text{PUFA}$, soma de $\sum\text{n3}$ e soma da série $\sum\text{n6}$ ($p<0,05$; Tabela 9).

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos no fígado de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com dietas suplementadas com níveis variados de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
Ácidos graxos	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
C14:0	1,53±0,03 ^b	1,52±0,04 ^b	1,82±0,03 ^a	1,85±0,03 ^a	1,74±0,04 ^a	1,25±0,05 ^c	0,0002
C14:1	0,11±0,01	0,13±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01	0,14±0,01	0,15±0,00	0,0587
C16:1	3,40±0,02 ^{ab}	2,44±0,11 ^c	3,59±0,09 ^a	3,37±0,15 ^{ab}	2,93±0,18 ^b	2,11±0,04 ^c	0,0005
C16:0	31,69±0,47 ^e	43,17±0,18 ^a	38,30±0,36 ^c	35,23±0,57 ^d	39,71±0,50 ^{bc}	41,41±0,52 ^{ab}	0,0000
C17:0	0,22±0,02	0,22±0,01	0,17±0,07	0,25±0,01	0,23±0,01	0,17±0,01	0,3710
C18:3n3	0,69±0,02 ^c	1,02±0,06 ^b	0,74±0,04 ^c	0,91±0,01 ^{bc}	0,82±0,08 ^{bc}	1,40±0,04 ^a	0,0003
C18:2n6	8,78±0,16 ^a	4,82±0,06 ^d	5,78±0,09 ^c	6,68±0,06 ^b	5,84±0,15 ^c	7,03±0,06 ^b	0,0000
C18:1n9t	3,85±0,05 ^{cd}	4,36±0,02 ^{ab}	4,05±0,07 ^{cb}	3,55±0,08 ^d	4,62±0,12 ^a	4,22±0,01 ^{cb}	0,0003
C18:1	25,31±0,63 ^b	21,63±0,04 ^d	22,22±0,42 ^{cd}	24,35±0,38 ^{cb}	26,69±0,43 ^a	23,52±0,05 ^{cbd}	0,0007
C18:0	6,00±0,09 ^e	11,06±0,08 ^a	6,88±0,03 ^d	10,16±0,18 ^b	7,48±0,07 ^c	9,56±0,14 ^b	0,0000
C20:4n6	1,79±0,04 ^d	2,15±0,02 ^c	1,38±0,02 ^e	2,51±0,01 ^b	3,04±0,06 ^a	1,58±0,06 ^{ed}	0,0000
C20:5n3	1,93±0,05 ^a	1,60±0,04 ^b	1,39±0,04 ^c	1,25±0,04 ^c	1,72±0,04 ^b	1,52±0,03 ^b	0,0001
C20:3n6	1,04±0,01 ^b	1,12±0,01 ^b	1,26±0,01 ^a	1,26±0,05 ^a	1,13±0,01 ^b	1,11±0,01 ^b	0,0013
C20:2	0,94±0,05 ^{bc}	0,99±0,03 ^{ab}	0,79±0,02 ^c	0,93±0,06 ^{bc}	1,03±0,01 ^a	1,15±0,02 ^a	0,0059
C20:1n9	1,52±0,02 ^a	1,51±0,01 ^a	1,34±0,03 ^b	1,50±0,02 ^a	1,52±0,08 ^a	1,37±0,01 ^b	0,0328
C22:6n3	2,00±0,03 ^b	2,89±0,04 ^a	1,88±0,02 ^b	2,80±0,04 ^a	1,89±0,10 ^b	2,16±0,06 ^b	0,0000
ΣSFA	39,43±0,58 ^c	55,96±0,29 ^a	47,16±0,48 ^b	47,48±0,77 ^b	49,16±0,53 ^b	52,38±0,62 ^a	0,0000
ΣMUFA	34,18±0,67 ^{ab}	30,06±0,16 ^d	31,30±0,37 ^{dc}	32,89±0,60 ^{cb}	35,90±0,42 ^a	31,36±0,00 ^{dc}	0,0006
ΣPUFA	17,16±0,24 ^a	14,58±0,23 ^c	13,20±0,14 ^d	16,32±0,23 ^{ab}	15,46±0,08 ^{bc}	15,93±0,12 ^c	0,0001
Σn3	4,61±0,00 ^{bc}	5,51±0,14 ^a	4,01±0,06 ^d	4,95±0,06 ^b	4,42±0,14 ^c	5,07±0,01 ^{ba}	0,0002
Σn6	11,61±0,19 ^a	8,08±0,07 ^d	8,41±0,07 ^d	10,44±0,11 ^b	10,01±0,07 ^{cb}	9,71±0,13 ^c	0,0000
SFA/PUFA	2,30±0,00 ^d	3,84±0,04 ^a	3,57±0,00 ^a	2,91±0,00 ^c	3,18±0,05 ^b	3,29±0,02 ^b	0,0000
n3/n6	0,40±0,01 ^d	0,68±0,01 ^a	0,48±0,00 ^{cb}	0,47±0,00 ^{cb}	0,44±0,02 ^c	0,52±0,01 ^b	0,0000

Valores expressos como média ± erro padrão. ΣSFA: Soma dos ácidos graxos saturados. ΣMUFA: Soma de ácidos graxos monoinsaturados. ΣPUFA: Soma de ácidos graxos poliinsaturados. Σn6: Soma dos ácidos graxos da série n6. Σn3: Soma dos ácidos graxos da série n3. SFA/PUFA: Relação entre a soma dos ácidos graxos saturados e poliinsaturados. n3/n6: razão entre a soma dos ácidos graxos das séries n3 e n6. Letras diferentes na mesma linha indicam médias diferentes de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey (p < 0,05).

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos no ovário de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com dietas suplementadas com níveis variados de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	
Ácidos graxos							
C14:0	1,16±0,01 ^{cd}	1,21±0,02 ^{cbd}	1,21±0,01 ^{abc}	1,29±0,02 ^a	1,24±0,02 ^{ab}	1,13±0,02 ^d	0,0023
C14:1	0,11±0,01	0,14±0,01	0,10±0,01	0,11±0,00	0,13±0,01	0,11±0,01	0,0674
C16:1	2,84±0,07 ^a	2,50±0,02 ^b	2,99±0,10 ^a	3,11±0,01 ^a	2,94±0,04 ^a	2,52±0,02 ^b	0,0007
C16:0	33,37±0,16 ^a	27,05±0,17 ^d	30,39±0,06 ^b	28,75±0,12 ^c	31,37±0,26 ^b	26,47±0,09 ^d	0,0000
C17:0	0,18±0,01	0,19±0,01	0,19±0,01	0,22±0,02	0,17±0,01	0,19±0,01	0,0946
C18:3n3	1,05±0,07 ^c	2,07±0,06 ^a	1,71±0,03 ^b	1,07±0,08 ^c	1,23±0,03 ^c	1,58±0,04 ^b	0,0000
C18:2n6	8,75±0,01 ^b	8,61±0,28 ^b	7,88±0,02 ^c	9,36±0,20 ^b	7,43±0,03 ^c	10,97±0,07 ^a	0,0000
C18:1n9t	3,31±0,10 ^{ab}	3,22±0,01 ^{ab}	3,48±0,07 ^a	3,13±0,03 ^b	3,19±0,07 ^{ab}	3,10±0,01 ^b	0,0291
C18:1	24,63±0,02 ^b	22,22±0,07 ^d	24,21±0,10 ^{cb}	23,86±0,04 ^c	27,80±0,10 ^a	22,49±0,14 ^d	0,0000
C18:0	9,07±0,08 ^b	9,78±0,20 ^a	8,84±0,09 ^b	10,04±0,07 ^a	8,54±0,03 ^b	9,74±0,07 ^a	0,0002
C20:4n6	3,71±0,03 ^b	4,13±0,03 ^a	3,72±0,02 ^b	2,67±0,05 ^c	2,55±0,05 ^c	3,52±0,12 ^b	0,0000
C20:5n3	3,89±0,07 ^b	4,19±0,03 ^a	3,99±0,03 ^{ab}	3,13±0,03 ^c	2,10±0,01 ^d	3,63±0,02 ^c	0,0000
C20:3n6	1,14±0,01 ^c	1,10±0,01 ^c	1,12±0,01 ^c	1,23±0,01 ^b	1,33±0,03 ^a	1,06±0,02 ^c	0,0002
C20:2	1,35±0,02 ^{ab}	1,39±0,04 ^{ab}	1,26±0,01 ^{bc}	1,21±0,01 ^c	1,21±0,02 ^c	1,40±0,02 ^a	0,0029
C20:1n9	1,25±0,01 ^b	1,32±0,01 ^b	1,24±0,01 ^b	1,31±0,02 ^b	1,48±0,03 ^a	1,22±0,02 ^b	0,0003
C22:6n3	5,03±0,06 ^b	5,32±0,02 ^a	4,45±0,06 ^d	4,72±0,05 ^{cd}	4,95±0,06 ^{bc}	4,89±0,02 ^{bc}	0,0002
ΣSFA	43,77±0,09 ^a	38,21±0,00 ^d	40,63±0,05 ^{bc}	40,29±0,05 ^c	41,31±0,31 ^b	37,53±0,03 ^d	0,0000
ΣMUFA	32,13±0,14 ^b	29,39±0,04 ^d	32,02±0,06 ^{bc}	31,52±0,09 ^c	35,53±0,11 ^a	29,44±0,12 ^d	0,0000
ΣPUFA	24,89±0,25 ^b	26,79±0,32 ^a	24,12±0,18 ^b	23,38±0,41 ^b	20,79±0,09 ^c	27,03±0,28 ^a	0,0000
Σn3	9,96±0,21 ^b	11,57±0,01 ^a	10,14±0,12 ^b	8,92±0,16 ^c	8,27±0,10 ^c	10,10±0,08 ^b	0,0000
Σn6	13,59±0,03 ^{bc}	13,83±0,29 ^b	12,72±0,05 ^c	13,26±0,26 ^{bc}	11,31±0,01 ^c	15,54±0,18 ^a	0,0000
SFA/PUFA	1,76±0,02 ^b	1,43±0,02 ^b	1,68±0,01 ^b	1,72±0,03 ^b	1,99±0,02 ^a	1,39±0,02 ^c	0,0000
n3/n6	0,73±0,01 ^b	0,84±0,02 ^a	0,80±0,01 ^a	0,67±0,00 ^c	0,73±0,01 ^b	0,65±0,00 ^c	0,0001

Valores expressos como média ± erro padrão. ΣSFA: Soma dos ácidos graxos saturados. ΣMUFA: Soma de ácidos graxos monoinsaturados. ΣPUFA: Soma de ácidos graxos poliinsaturados. Σn6: Soma dos ácidos graxos da série n6. Σn3: Soma dos ácidos graxos da série n3. SFA/PUFA: Relação entre a soma dos ácidos graxos saturados e poliinsaturados. n3/n6: razão entre a soma dos ácidos graxos das séries n3 e n6. Letras diferentes na mesma linha indicam médias diferentes de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey (p < 0,05).

Todos os fígados apresentaram aparência morfológica normal com mínima deposição de gordura, mas foi observado um escore de hemorragia hepática mais elevado (p < 0,05) em fêmeas alimentadas com dietas sem suplementação de ácido fólico (Tabela 10). No ovário, fêmeas alimentadas com dietas sem suplementação de ácido fólico apresentaram maior percentual de oogônias (p < 0,05), enquanto aquelas alimentadas com dietas com 1,5 a 3,75 mg de AG por kg⁻¹ apresentaram maior percentual de oócitos vitelogênicos (p < 0,05; Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros histológicos do tecido hepático e ovariano de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

	Ácido fólico (mg.kg ⁻¹)						
Parâmetros	0,00	0,75	1,50	2,25	3,00	3,75	p-valor
Fígado							
HM (µm²)	31,34±3,45	30,74±2,12	31,64±2,00	30,58±2,01	29,36±2,12	29,52±1,01	0,9681
Hmax (µm²)	62,51±3,20	63,18±2,21	63,41±1,77	62,37±2,08	60,42±2,21	61,66±1,43	0,9407
Hmin (µm²)	16,17±1,50	15,82±0,84	16,21±0,84	15,29±0,84	15,72±0,84	15,81±0,51	0,9905
Comp. (µm)	5,72±0,40	5,79±0,21	5,83±0,10	5,61±0,23	5,69±0,21	5,65±0,33	0,9892
VD	1,04±0,24	0,80±0,08	0,84±0,13	0,95±0,21	0,96±0,08	0,99±0,09	0,9071
HH	0,83±0,14 ^a	0,58±0,09 ^{ab}	0,48±0,05 ^{ab}	0,55±0,10 ^{ab}	0,20±0,08 ^b	0,26±0,12 ^b	0,0046
Ovário							
Oog. (%)	47,49±3,48 ^a	40,32±2,91 ^{ab}	33,26±2,47 ^{bc}	27,53±1,60 ^c	29,42±1,24 ^c	31,20±0,58 ^{bc}	0,0000
Ooc. CP. (%)	5,07±0,81	4,90±0,44	6,06±1,31	8,54±1,51	8,94±1,25	8,58±1,38	0,0684
Ooc. CS. (%)	3,07±0,50	2,60±0,37	2,56±0,33	2,91±0,14	2,77±0,27	2,15±0,42	0,5481
Ooc. Vit. (%)	42,47±4,49 ^b	50,90±2,88 ^{ab}	56,59±1,92 ^a	59,65±2,18 ^a	57,27±2,33 ^a	56,42±1,12 ^a	0,0035
Fol. Pov. (%)	0,45±0,15	0,51±0,10	0,42±0,11	0,29±0,06	0,34±0,07	0,29±0,04	0,5714
Fol. Atr. (%)	1,57±0,30	1,41±0,35	1,45±0,39	1,28±0,27	1,37±0,33	1,59±0,42	0,9935

Os valores são expressos como média ± erro padrão. HM: Área média do hepatócito; Hmax: Área máxima do hepatócito; Hmin: Área mínima do hepatócito; Comp.: Comprimento do hepatócito; VD: Score de vacuolização hepática; HH: Score de hemorragia hepática. Oog.: Oogônias; Ooc. CP.: Oócitos de crescimento primário; Ooc CS: Oócitos de crescimento secundário. Ooc. Vit.: Oócitos maduros vitelogênicos; Fol. Pov: Folículo pós ovulatório; Fol. Atr.: Folículo atrésico. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey (p < 0,05).

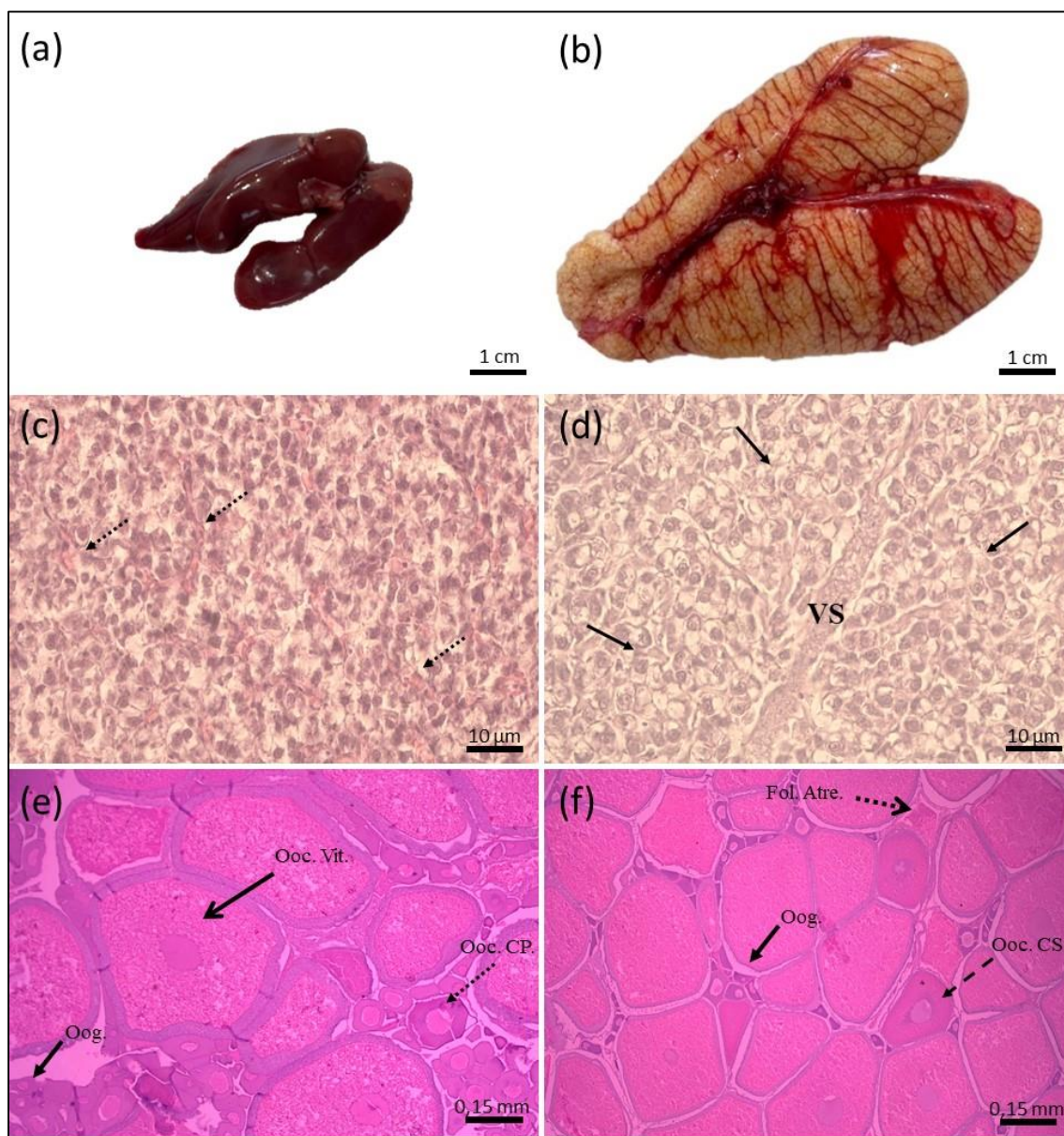


Figura 3. Aspectos macroscópicos do fígado (a) e ovário (b) de fêmeas de jundiá (*R. quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico. (c) Aparência morfológica padrão do tecido hepático (pontuação de vacuolização = 1) com presença de hemorragia hepática. Fêmeas de jundiá alimentadas com dietas sem suplementação de FA (coloração HE; 40×). As setas tracejadas mostram eritrócitos entre os hepatócitos (hemorragia). (d) Aparência padrão do tecido hepático (pontuação de vacuolização = 1). Fêmeas de jundiá alimentadas com dieta suplementada com 3,00 mg kg⁻¹ de FA (coloração H.E.; 40×). As setas pretas indicam os hepatócitos. VB: vaso sanguíneo. (e) Aparência morfológica de um ovário maduro de uma fêmea de jundiá alimentada com dietas sem suplementação de FA (coloração HE; 4×). Aqui destacamos o aumento da presença de oogônias. (f) Aparência morfológica padrão de um ovário maduro de uma fêmea jundiá alimentada com dietas suplementadas com 3,0 mg kg⁻¹ de FA (coloração HE; 4×). Oog.: Oogônia; PÁG. Ooc.: Oócitos de crescimento primário; SG. Ooc.: Oócitos de crescimento secundário. Vit.: Ooc. Oócitos maduros vitelogênicos; Atr. Fol.: Folículo atreico.

Finalmente, a composição centesimal em músculo, fígado e vísceras não foi influenciada por alimentos suplementados com diferentes níveis de ácido fólico ($p > 0,05$). A porcentagem de matéria mineral no ovário foi maior em fêmeas alimentadas com dietas isentas de suplementação de ácido fólico ($p < 0,05$; Tabela 11).

Tabela 11. Composição centesimal de músculo, fígado, ovário e vísceras de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva, alimentadas com rações suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico.

Parâmetros	Ácido fólico (mg kg ⁻¹)						p-valor
	0.00	0.75	1.50	2.25	3.00	3.75	
Músculo							
Umidade (%)	76,22±0,45	75,39±0,69	76,37±0,71	76,43±0,55	75,88±0,37	75,89±0,47	0,7766
Cinzas (%)	1,30±0,04	1,35±0,04	1,35±0,04	1,40±0,10	1,38±0,07	1,43±0,11	0,8479
PB (%)	21,76±0,75	21,01±0,55	21,61±0,69	22,25±0,92	22,42±0,36	21,92±0,51	0,7108
LP (%)	1,46±0,06	1,52±0,03	1,53±0,03	1,52±0,05	1,52±0,05	1,58±0,02	0,5107
Fígado							
Umidade (%)	69,05±1,53	70,55±0,28	71,89±0,93	71,05±0,77	69,31±1,13	72,03±1,16	0,2470
Cinzas (%)	1,37±0,08	1,52±0,07	1,33±0,04	1,40±0,03	1,57±0,22	1,34±0,17	0,6882
PB (%)	16,78±1,27	17,62±0,39	16,71±0,60	18,99±1,38	19,48±2,10	17,33±0,99	0,5287
LP (%)	9,62±0,33	9,52±0,20	9,63±0,22	9,69±0,14	9,48±0,19	9,36±0,16	0,8961
Ovário							
Umidade (%)	62,37±0,69	62,63±0,42	62,82±0,27	62,84±0,33	62,31±1,00	61,58±0,36	0,6491
Cinzas (%)	1,99±0,09 ^a	1,65±0,03 ^b	1,69±0,04 ^b	1,86±0,09 ^{ab}	1,83±0,04 ^{ab}	1,68±0,03 ^b	0,0058
PB (%)	25,43±1,95	27,11±1,82	25,69±1,70	29,41±2,09	30,72±1,93	27,95±1,67	0,3301
LP (%)	8,74±0,04	8,57±0,11	8,75±0,08	8,68±0,06	8,73±0,07	8,57±0,12	0,4560
Vísceras							
Umidade (%)	60,08±4,11	58,00±1,01	63,79±3,22	59,97±3,02	61,77±1,63	60,50±1,78	0,7538
Cinzas (%)	0,69±0,06	0,76±0,03	0,69±0,04	0,70±0,06	0,85±0,09	0,67±0,01	0,2020
PB (%)	13,13±0,97	12,94±0,63	13,39±0,71	14,93±1,04	14,18±0,92	14,69±0,82	0,4725
LP (%)	21,90±0,28	22,31±0,36	22,22±0,07	21,76±0,24	22,04±0,29	21,58±0,34	0,4670

Os valores são expressos como média ± erro padrão. PB: Proteína bruta; LP: Lipídios totais. Letras diferentes indicam diferenças nas médias devido aos tratamentos, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

4. Discussão

As informações sobre os efeitos da suplementação dietética de ácido fólico para peixes na atividade reprodutiva são escassas e provavelmente este é o primeiro dado relatado sobre os efeitos do ácido fólico em fêmeas de peixes de água doce. A alimentação das fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) com rações suplementadas com ácido fólico melhorou o desempenho reprodutivo e a qualidade da prole. Com isso, as exigências nutricionais das fêmeas de jundiá em atividade reprodutiva são consideravelmente superiores às recomendadas para peixes em crescimento. De forma geral, a demanda pela suplementação de ácido fólico nas

rações fornecidas às fêmeas de jundiá foi três vezes superior ao preconizado para peixes em crescimento.

Esta pesquisa mostrou que a melhora na taxa de eclosão e normalidade das larvas foram os principais pontos positivos deste estudo. Esses efeitos ocorreram possivelmente devido ao aumento de atividades antioxidante e à deposição de folatos no ovário, ovócitos e embriões. Embora sejam escassas as informações sobre os efeitos desta vitamina na reprodução dos peixes, alguns estudos sugerem que o ácido fólico atua como um importante antioxidante desde o início do desenvolvimento gonadal (Ma et al., 2015; Anagha et al., 2021). O ácido fólico também pode atuar na vitelogênese, maturação final do ovócito, ovulação e eclosão das larvas (Kazeto et al., 2008). Nos vertebrados em geral, o ácido fólico é reconhecido como um potencial agente antioxidante (Ebaid et al., 2013; Kemse et al., 2014; Réus et al., 2018) e de eliminação de radicais livres nas gônadas (Beltagy et al., 2016; Anagha et al., 2021).

Diante disso, a atividade da enzima catalase merece atenção nesta pesquisa, pois apresentou aumento de sua atividade no ovário e ovócitos das fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com ácido fólico. A catalase participa na melhoria do equilíbrio redox, contribui para diminuir as espécies reativas de oxigênio (EROs) e regula o metabolismo vitelogênico necessário para o desenvolvimento gonadal (Yang et al., 2015; Lima et al., 2020). Além disso, a atividade da catalase pode prevenir danos aos lipídios, proteínas e DNA (Guerra et al., 2004; Schieber e Chandel, 2014). A catalase é uma enzima que promove a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio e atua como antioxidante enzimático nas células (Gagnière e Bonnet 2017; Colak e Zoric, 2019). Por isso, o aumento da atividade da catalase nos tecidos sob elevada demanda metabólica, como os ovários vitelogênicos, pode contribuir em conjunto ou de forma indireta para a manutenção do equilíbrio redox e contribuir para o desenvolvimento gonadal (Behl, 2006). Efeitos semelhantes da catalase no ovário foram associados com melhoria no desempenho reprodutivo em fêmeas de tilápia (Lima et al., 2020) e na maturação dos oócitos de carpas (Behl, 2006).

Outro aspecto relevante para a reprodução das fêmeas de jundiá que merece atenção, foram os efeitos da suplementação dietética de ácido fólico sobre a redução da peroxidação lipídica (LPO) nos embriões. A diminuição da LPO nos embriões está intimamente ligada ao sucesso do desenvolvimento embrionário, aumento da taxa de eclosão e a qualidade da prole, uma vez que estes tecidos se encontram em intenso processo de multiplicação celular e crescimento. Como a maturação das gônadas impõe altas taxas metabólicas e os ovócitos possuem elevadas quantidades de diferentes lipídios funcionais (Lubzens et al., 2017), este é

um ambiente que pode favorecer o processo oxidativo, o que pode dificultar a maturação gonadal e acarretar prejuízos à reprodução e ao desenvolvimento embrionário. Nessas condições, a sobrecarga metabólica exercida na formação do embrião é inevitável e pode refletir na qualidade das proles. Além da capacidade antioxidante, diminuição da LPO nos embriões provenientes de fêmeas alimentadas com rações suplementadas com ácido fólico pode estar relacionada à capacidade desta vitamina em reduzir as gorduras nos tecidos, promover transporte de lipídios funcionais e impulsionar o sistema imune (Armi et al, 2020; Khan e Khan, 2020). Estudos semelhantes com a garoupa (*E. malabaricus*) (Lin et al., 2011) e dourada (*M. amblycephala*) (Sesay et al., 2017), foi observado diminuição da LPO no fígado com aumento de incremento de ácido fólico na dieta. Ainda, a presença de LPO também pode estar associada ao aumento da homocisteína no ciclo de metilação, prejudicando a saúde do animal. (Díez et al., 2015).

De modo geral, o emprego das dietas suplementadas com ácido fólico para as fêmeas se mostrou uma importante estratégia para melhorar a qualidade das larvas. Os efeitos positivos resultaram na eclosão de larvas mais saudáveis, maiores e com menores percentuais de ocorrência de malformações na coluna vertebral. Apesar de não ter sido objeto de estudo nesta pesquisa, outros efeitos positivos do ácido fólico podem ter contribuído para a melhoria do desenvolvimento embrionário, pois essa vitamina também é importante na formação do tubo neural e conseqüentemente do cérebro, medula espinhal e coluna vertebral (Blanco et al., 2016; Millacura et al., 2017). Além disso, o ácido fólico também pode proteger o embrião contra alguns compostos químicos nocivos presentes na água durante a incubação dos ovos e contribuir para a diminuição das malformações (Sarmah e Marrs, 2013; Ma et al., 2015). Outros estudos documentaram efeitos positivos do ácido fólico no aumento nas taxas de eclosão, tamanho das larvas e redução nas malformações no embrião de *Danio rerio* (Sarmah e Marrs, 2013; Ma et al., 2015; Yue et al., 2017).

De modo geral, os perfis de ácidos graxos do fígado e do ovário foram diferentes, conforme relatado por Goes et al. (2024). Apesar da falta de informações sobre o mecanismo que regula a deposição de ácidos graxos nos diferentes tecidos das fêmeas em atividade reprodutiva, podemos levantar a hipótese de que a maior quantidade de ácidos graxos 18:1, 20:3 n-6 e 20:4 n-6 no fígado podem ser vantajosos para as fêmeas, pois podem promover a produção de eicosanóides e prostaglandinas (Marks e Fürstenberger, 2008; Baker e Van Der Kraak, 2019). Os eicosanóides e prostaglandinas desempenham um papel importante na manutenção da saúde feminina (Enayatmehr et al., 2015) e, como nos vertebrados terrestres (Eilati et al.,

2013; Chen et al., 2021), podem desempenhar um papel importante na recuperação dos ovários devido à sua capacidade anti-inflamatória (Cui et al., 2020; Magalhães et al., 2021).

Curiosamente, as fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com ácido fólico que apresentaram melhor desempenho reprodutivo e melhor qualidade de descendência também apresentaram menores quantidades de ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6 dos ovários. Por outro lado, essas fêmeas apresentaram maior deposição de ácidos graxos monoinsaturados no fígado e ovários. Estes resultados merecem atenção, visto que alguns ácidos graxos poliinsaturados das séries n-3 ou n-6 comumente promovem a produção de eicosanóides e prostaglandinas e, conseqüentemente, regulam diversas vias do metabolismo reprodutivo (Lister e Van der Kraak, 2009; Criscuolo-Urbinati et al., 2012; Enaytmehr et al., 2015) que finalmente interferem no desenvolvimento embrionário e larval (Izquierdo et al., 2001). Possivelmente outros mecanismos possam estar envolvidos na regulação do perfil de ácidos graxos dos ovários de *Rhamdia quelen* e na sua influência na reprodução das fêmeas, uma vez que Goes et al. (2024) também relataram a relação entre as menores quantidades de ácidos graxos 20:4 n-6 e 20:5 n-3 do ovário das fêmeas com maior desempenho reprodutivo. De forma geral, a predominância de ácidos graxos monoinsaturados em diversos tecidos é comum às espécies de bagres (Ng et al., 2000; Bogut et al., 2002), que podem ser utilizados como suprimento parcial de ácidos graxos para apoiar o metabolismo energético dos reprodutores (Fernández-Palacios et al., 1997; Hu et al., 2009), para atender aos requisitos de gametogênese e maturação das gônadas ou como suprimento de ácidos graxos para embriões ou larvas em estágios iniciais da vida (Pousis et al., 2019; Cherian, 2022).

Outro ponto importante e relacionado com a saúde das fêmeas foi a redução dos níveis séricos de alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase em função da suplementação dietética de ácido fólico. Apesar de serem indicadores inespecíficos, normalmente estas enzimas estão associadas à saúde hepática, sugerindo algum tipo de lesão tecidual no fígado (Abdel-Daim et al., 2015; Peng et al., 2016; Cheng et al., 2017) ou outros órgãos como rins e brânquias (Shahsavani et al., 2010). Essa função hepatoprotetora é importante para manutenção do metabolismo e síntese de aminoácidos essenciais para o crescimento (Falah et al., 2020; Hang et al., 2022; Yeganeh et al., 2022) e, por analogia, para a vitelogênese em fêmeas em atividade reprodutiva. Assim, como o fígado é um órgão muito exigido durante a vitelogênese, o ácido fólico exerce um importante papel como doador de grupos metil para melhorar a síntese de metionina (Hang et al., 2022) e contribuir para a proteção hepática e o correto funcionamento do órgão. Ainda, mesmo que os baixos níveis de

suplementação dietética de ácido fólico sugeriram a ocorrência de maior grau desse tipo de lesão tecidual, não necessariamente estes danos estão relacionados com efeitos deletérios à saúde ou efeitos letais, uma vez que não foram evidenciados nenhum sinal clínico ou mortalidade associadas à estas fêmeas. Possivelmente estes danos estão associados ao esforço metabólico naturalmente exigido às fêmeas durante vitelogênese e a maturação gonadal. Danos teciduais semelhantes e, não deletérios à saúde, foram relatados durante o crescimento do esturjão e black bass (Falah et al., 2020; Hang et al., 2022; Yeganeh et al., 2022).

A suplementação dietética de ácido fólico para as fêmeas de jundiá também elevou a concentração sérica de proteína total. Isso é um indicativo de melhorias do estado fisiológico geral dos peixes (Coeurdacier et al., 2011) e da imunidade (Sesay et al., 2016). Do ponto de vista reprodutivo, este resultado é importante para o atendimento das exigências do metabolismo energético e proteico necessário para o desenvolvimento embrionário. Isso sugere uma maior capacidade de transporte de nutrientes essenciais para melhorar o crescimento e a saúde dos animais (Sesay et al., 2006; Khan e Khan, 2020; Falah et al., 2020). O ácido fólico presente nas rações também promoveu o aumento dos níveis séricos de albumina e globulina. Esses parâmetros associados a integridade hepática e aos indicadores do equilíbrio redox promoveram melhorias para a saúde, crescimento e reprodução dos jundiás. Neste contexto, a albumina desempenha uma importante função na osmorregulação e principalmente no transporte de nutrientes, além de lipídico para atender ao metabolismo energético (Andreeva, 2019). De forma geral, a albumina é importante para o transporte de ácidos graxos, peptídeos, além de hormônios responsáveis pela reprodução (Curry et al., 1998; Ascenzi et al., 2013; Andreeva, 2022). Logo, o aumento de seus níveis séricos é um indicador de melhor capacidade de suprimento de nutrientes para atender às suas necessidades metabólicas (Nelson e Cox, 2022), especialmente em animais de alta produção (Esmaeili, 2021), que normalmente estão sujeitos às condições de elevado esforço metabólico. Ainda, o aumento da globulina é um fator importante, pois ela está relacionada ao transporte de metais, lipídeos, bilirrubina e anticorpos e desempenha um importante papel sobre o sistema imune (Chernyavskikh et al., 2019). Este pode ser um indicador metabólico relacionado à capacidade de promover a transferência de imunidade passiva das progenitoras para as proles, produzindo consequentemente proles mais resistente e vigorosas para tolerar as condições adversas dos sistemas de criação intensiva (Panigrahi et al., 2021).

O ácido fólico também apresentou outra importante função relacionada com a manutenção da saúde animal, a qual está relacionada com a hematopoiese e o aumento do

número de eritrócitos e trombócitos no sangue. O aumento do número de eritrócitos verificado nas fêmeas de jundiá foi um resultado esperado, uma vez que este efeito positivo do ácido fólico já foi documentado em peixes em crescimento (Badran e Ali, 2021; Roudsari et al., 2021; Hang et al., 2022) e, é decorrente de sua participação na biossíntese de purina e pirimidina, que envolve a formação e maturação dos eritrócitos (Barros et al., 2009; Scully, 2014; Falah et al., 2020). Além disso, o aumento dos eritrócitos nas fêmeas é importante porque pode suprir a toda a necessidade do transporte de oxigênio que o metabolismo envolvido no processo reprodutivo exige. Por outro lado, a alimentação com dietas deficientes em ácido fólico pode causar a anemia do tipo megaloblástica, a qual já foi relatada em peixes em crescimento como o salmão (*Oncorhynchus kisutch*) e o bagre do canal (*I. punctatus*) (NRC, 2011).

Além dos eritrócitos, o ácido fólico também impulsionou a produção de trombócitos no sangue das fêmeas de jundiá. Este é um aspecto importante, pois sugere que o ácido fólico pode atuar na prevenção de hemorragias durante a ovulação e auxilia na recuperação das fêmeas após o processo de reprodução artificial. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de os trombócitos serem reconhecidos como componentes essenciais do sangue para o processo de coagulação e hemostasia, facilitando a cicatrização de ferimentos e impedindo hemorragias (Lin et al., 2017; Yang et al., 2022). Além disso os trombócitos também são células de defesa orgânica, que realizam fagocitose e atuam no foco inflamatório (Tavares-Dias et al., 2007). A baixa ocorrência de trombócitos pode ocorrer quando a medula óssea produz quantidades insuficientes, ou quando os trombócitos são destruídos por doenças imunodeficientes ou porque se acumularam no baço (Fiebach et al., 2007; Michelson et al., 2019). Porém, não há estudos clínicos desses efeitos sobre a reprodução dos peixes (Yang et al., 2022).

O conjunto de benefícios fisiológicos causado pela adequada suplementação dietética de ácido fólico também resultou em melhorias no crescimento das fêmeas de jundiá. Este é um ponto importante a ser considerado, pois devido a inexistência de enzimas chave envolvidas na via biossintética do folato nos animais (Cossins, 2000), a suplementação dietética constante é necessária para garantir o adequado funcionamento metabólico (Armi et al., 2020; Khan e Khan, 2020) e, impulsionar o crescimento (Falah et al., 2020) e consequentemente a reprodução dos peixes. Esta é uma importante estratégia para garantir o desempenho produtivo de peixes submetidos à intensas condições de criação ou submetidos às condições de elevado esforço metabólico (Shafaeipour et al., 2011; Firouz et al., 2013; Wu et al., 2015; Bradan e Ali, 2021). Por outro lado, a deficiência na suplementação dietética de ácido fólico pode causar letargia, coloração de pele mais escura, fragilidade nas nadadeiras e retardo do crescimento dos peixes

(Sesay et al., 2016; Falah et al., 2020). Este conjunto de fatores relacionados com o ácido fólico certamente atuou de forma combinada para regular direta ou indiretamente o ritmo da vitelogênese. Esta hipótese pode corroborada pelos resultados das avaliações histológicas dos ovários. Apesar de todas as fêmeas estarem maduras e com aspectos morfológicos dos ovários considerados normais para a espécie (Reidel et al., 2010; Tessaro et al., 2014), aquelas alimentadas com rações suplementados com ácido fólico apresentaram um maior percentual de ovócitos vitelogênicos e, conseqüentemente melhores respostas reprodutivas e de qualidade da prole.

Apesar da morfologia do tecido hepático não ter sido influenciada pelas rações, um aspecto curioso que merece atenção foi a ocorrência de hemorragia hepática leve em fêmeas alimentadas com rações sem a suplementação de ácido fólico. Isso pode estar relacionado a uma reação inflamatória causada por danos no fígado pelo acúmulo das transaminases, anemia ou pela diminuição dos trombócitos na corrente sanguínea. Nesse caso, ocorre uma migração celular para o sítio inflamado por diapedese de células recrutadas do compartimento sanguíneo (Sakabe et al. 2013, Manrique et al. 2017, Petrillo et al. 2017). Essa migração tem como função o reestabelecimento e reparação tecidual, assim como, o combate de agentes infecciosos (Havixbeck et al. 2016, Bayona et al. 2017, Moraes et al., 2018) e o controle da hemostasia exercido primordialmente por trombócitos (Ferdous e Scott, 2015).

De forma geral, as descobertas deste estudo apoiam a hipótese de que a suplementação dietética com ácido fólico melhora a saúde das fêmeas de jundiá, produzindo benefícios fisiológicos que melhoraram o crescimento e, conseqüentemente, a reprodução, a qualidade dos gametas e das proles. Assim, a suplementação dietética de ácido fólico pode ser considerada como uma estratégia importante para melhorar a reprodução, a saúde e o crescimento dos peixes. Por fim, vale destacar que a suplementação dietética de ácido fólico pode ser considerada uma estratégia chave para melhorar a reprodução, a saúde e o crescimento dos peixes. É importante notar que os níveis de suplementação de ácido fólico nas dietas para fêmeas de jundiá em atividade reprodutiva são superiores aos recomendados para peixes em crescimento, enfatizando a necessidade dos nutricionistas se concentrarem em atender a esses requisitos elevados para garantir melhor qualidade da prole e eficiência reprodutiva.

5. Conclusão

As rações suplementadas com 2,25 e 3,00 mg de ácido fólico kg⁻¹, fornecidas para fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em atividade reprodutiva melhoram o equilíbrio redox das fêmeas e das proles, interferiu na proteção hepática e no transporte de nutrientes pelo sangue e, regulou a hematopoiese. Este conjunto de benefícios resultou no sucesso reprodutivo e na produção de proles de melhor qualidade. Contudo, a demanda pela suplementação do ácido fólico pelas fêmeas de jundiá em atividade reprodutiva é três vezes maior que aquelas normalmente recomendadas para peixes em crescimento.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Salus® - Nutrição Animal pela doação do ácido fólico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) pelo apoio a bolsa de estudo (Edital n.º 012/2021 – POSGFE) referente ao processo n.º 53855.850.4653.06092021-79853.

7. Referências

- Abdel-Daim, M.M., Abdelkhalek, N.K., Hassan, A.M., 2015. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 111, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.019>
- Adames, M.S., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Buzzi, A.H., Buratto, C.N., Piana, P.A., Bombardelli, R.A., 2015. 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*, 1 (161), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. In: Packer, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, 105, Academic Press, New York, 121-126.
- Alaburda, J., Shundo, L., 2007. Ácido fólico e fortificação de alimentos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2 (66), 95-102.
- Albinati, A.C.L., Moreira, E.L.T., Albinati, R.C.B., Carvalho, J.V., Lira, A.D. de, Santos, G.B., Vidal, L.V.O., 2009. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 621-627. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352009000300015>
- Amaral Jr., H., Garcia, S., Warmling, P.F., Silva, B.C. da, Marchiori, N.C., 2015. *Assim cultivamos o Jundiá Rhamdia quelen no estado de Santa Catarina*. 1th ed., Camboriú, EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC, 81p.
- Amorim, M.P., B.V.C. Gomes, Y.S. Martins, Y. Sato, E. Rizzo; N. Bazzoli., 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquacult. Res.*, 40 (2), 172-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02079.x>

- Amri, A., Kessabi, K., Bouraoui, Z., Sakli, S., Gharred, T., Guerbej, H., Messaoudi, I., Jebali, J., 2020. Effect of melatonin and folic acid supplementation on the growth performance, antioxidant status, and liver histology of the farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under standard rearing conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2265-2280, <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-020-00879-5>
- Anagha, T., Gupta, S., Sahu, N.P., Srivastava, P.P., Varghese, T.; Chanu, T.I.; Ciji, A., 2021. Titanium dioxide nanoparticles alter reproductive and thyroid hormones of *Labeo rohita* females: amelioration through vitamin e and folic acid. *Aquaculture*, 539, 736633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736633>
- Andreeva, A. M., 2019. The Strategies of Organization of the Fish Plasma Proteome: with and without Albumin. *Russian Journal of Marine Biology*, 45(4), 263-274. <https://doi.org/10.1134/s1063074019040023>
- Andreeva, A.M., 2022. Evolutionary Transformations of Albumin Using the Example of Model Species of Jawless Agnatha and Bony Jawed Fish (Review), *Inland Water Biology*, 15(5), 641-658. <https://doi.org/10.1134/S1995082922050029>
- Ascenzi, P., Masi, A.di, Leboffe, L., Alberio, T., Fanali, G., Fasano, M., 2013. Molecular phylogenetic analyses of albuminoids reveal the molecular evolution of allosteric properties. *Iubmb Life*, 65 (6), 544-549. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1164>
- Badran, M.F., Ali, M.A.M., 2021. Effects of folic acid on growth performance and blood parameters of flathead grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 536, 736459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736459>
- Baker, S.J.C., Van Der Kraak, G., 2019. Investigating the role of prostaglandin receptor isoform EP4b in zebrafish ovulation. *General and Comparative Endocrinology*, 113228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113228>
- Baldisserotto, B., 2009. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, 1 (39), 291-299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008005000046>
- Baldisserotto, B., Barcelos, L.G., Fracalossi, D., Kruts, L., 2020. Jundia (*Ramdia* sp.). in: Baldisserotto e Gomes. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 3 ed. Santa Maria, Editora UFSM, 245-288.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittzés, I., Lulhier, F., 2001. Steroid Profiles in Cultured Female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. *Gen. Comp. Endocrinol*, 121, 325–332. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7603>.
- Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, 40(8), 895-903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02175.x>
- Barroso, R.M., Muñoz, A.E.P., Cai, J., 2019. Social and economic performance of tilapia farming in Brazil, No. 1181. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Rome.
- Bayona, J.A.M., Karuppannan, A.K., Trites, M.J., Barreda D.R., 2017. Application of imaging flow cytometry for characterization of acute inflammation in non-classical animal model systems. *Methods*, 112, 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.013>

- Behl, R., 2006. Stimulation of catalase activity in carp (*Cyprinus carpio*) ovarian follicles by gonadotropin in vitro. *Fish Physiol Biochem*, 32, 203–207. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-0012-7>
- Beltagy, D.M., Mohamed, T.M., El Said, A.S., Tousson, E., 2016. Beneficial role of ascorbic and folic acids antioxidants against thyroxin-induced testicular dysfunction in hyperthyroid rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 17246–17254. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6876-x>
- Blanco, R., Colombo, A., Pardo, R., Suazo, J., 2016. Maternal biomarkers of methylation status and non-syndromic orofacial cleft risk: a meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45 (11), 1323–1332. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.06.011>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiology*. 37 (8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bobé, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, 165, 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- Bogut, I., Has-Schön, E., Cacic, M., Milaković, Z., Novoselić, D., Brkić, S., 2002. Linolenic acid supplementation in the diet of European catfish (*Silurus glanis*): effect on growth and fatty acid composition. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(1), 1–6. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00304.x>
- Bombardelli, R.A., Morschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M.A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1251–1257. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000500001>
- Bombardelli, R.A., Hayashi, C., Natali, M.R.M., Sanches, E.A., Piana, P.A., 2009. Reproductive and animal performance and lipids deposition in hepatocytes for Nile tilapia females fed different levels of energy in the ration. *R. Bras. Zootec.* 38 (8), 1391–1399. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000800001>
- Bombardelli, R.A., Sanches, E.A., Tessaro, L., Buzzzi, A.H., Martins, C.V.B., Meurer, F., 2015. Digestible energy requirement for females of *Rhamdia quelen* on reproductive activity fed with ration based on vegetal ingredients. *Latin American Journal Of Aquatic Research*, 43(3), 566–574. <http://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-18>
- Bombardelli, R.A., Goes, E.S.R., Sousa, S.M.N., Syperreck, M.A., Goes, M.D., Pedreira, A.C.O., Meurer, F., 2017. Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing different levels of protein and energy. *Aquaculture*, 479, 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.031>
- Bombardelli, R. A., de Oliveira, E. J., Syperreck, M. A., de Oliveira Pedreira, A. C., de Freitas, J. M. A., Marques, A. E. M. L., Cestari, M. M., Meurer, F., 2021a. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. *Aquaculture*, 530, 735724. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735724>
- Bombardelli, R.A., Mewes, J. K., Buzzzi, A.H., Pedreira, A.C. de O., Syperreck, M.A., Dalmaso, A.C.S., Chagas, T.V., Chiella, R.J., Meurer, F., 2021b. Diets containing crude glycerin modify the ovary histology, cause reproductive harm on Nile tilapia females and impair the offspring quality. *Aquaculture*, v. 533, p. 736098. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736098>
- Bombardelli, R.A., Henriques, J.K. dos S., Cestari, M.M., Marques, A.E.M.L., Chagas, T.V., Meurer, F., 2023. Improved sperm DNA integrity and altered fat metabolism and intestinal

morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) males fed rations with purified nucleotide. *Aquaculture*, 562, 738682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738682>

Borba, M. R., Sá, M.V.C., Abreu, J.S., 2013. 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, 121-165.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1/2, p.248-254. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Buzzi, A.H., Cardoso, S.U., Malacarne, A.M., Adames, M.S., Neumann, G., Junior, E.G, Bombardelli, R.A., 2021. Simple hygienic procedures during silver catfish (*Rhamdia quelen*) sperm collection reduce microbial load and provide a new perspective for handling males. *Aquacult. Res.* 52 (8), 4003–4007. <https://doi.org/10.1111/are.15203>

Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Fernández, A.J., Rosenlund, G., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. *Journal of Fish Disease*, 27, 531-541. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x>

Carneiro, P.C.F., 2004. A produção de jundiá em cativeiro. In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. (Eds.), *Criação do Jundiá*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 117–141.

Carvalho, P.L.P.F., Koch, J.F.A., Cintra, F.T., Fernandes Jr., A.C., Sartori, M.M.P., Barros, M.M., Padilha, P. de M., Pezzato, L.E., 2018. Available phosphorus as a reproductive performance enhancer for female Nile tilapia. *Aquaculture*, 486, 202-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.023>

Chavarro, J.E., Schlaff, W.D., 2018. Introduction: Impact of nutrition on reproduction: an overview, *Fertility and Sterility*, 110(4), 557-559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.07.023>

Chen, W., Luo, J., Ye, Y., Hoyle, R., Liu, W., Borst, R., Kazani, S., Shikatani, E.A., Erpenbeck, V.J., Pavord, I.D., Klenerman, P., Sandham, D.A., Xue, L., 2021. The Roles of Type 2 Cytotoxic T Cells in Inflammation, Tissue Remodeling, and Prostaglandin (PG) D₂ Production Are Attenuated by PGD₂ Receptor 2 Antagonism. *J Immunol*, 206 (11): 2714-2724. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001245>

Cheng, C.H., Guo, Z., Ye, C.X., Wang, A.L., 2018. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44 (1), 209-218. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-017-0425-5>

Cherian, G., 2022. Hatching egg polyunsaturated fatty acids and the broiler chick. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 13 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00757-5>

Chernyavskikh, S.D., Borodaeva, Z.A., Borisovskiy, I.P., Ostapenko, S.I., Galtseva, O.A., 2019. Blood protein spectrum in representatives of the fish superclass. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(2), 979-981.

Coelho, M., 2002. Vitamin stability in premixes and feeds. A practical approach in ruminant diets. In: *Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, 127-145.

- Coeurdacier, J.L., Dutto, G., Gasset, E., Blancheton, J.P., 2011. Is total serum protein a bom indicador de bem-estar em robalo de criação (*Dicentrarchus labrax*)? Aquat. Living Resour. 24 (2), 121-127. <https://doi.org/10.1051/alr/2011130>
- Colak E., Zoric L., 2019. Antioxidants and age-related macular degeneration. In: Preedy VR, Watson RR, editors. Handbook of Nutrition, Diet, and the Eye, 2nd Edn. San Diego, CA: Academic Press, 85–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815245-4.00006-5>
- Cossins, E.A., 2000. Canadian society of plant physiologists gold medal review / synthèse médaillée d'or de la Société canadienne physiologie végétale the fascinating world of folate and one-carbon metabolism. Can. J. Bot. 78 (6), 691–708. <https://doi.org/10.1139/b00-061>
- Criscuolo-Urbinati, E., Kuradomi, R.Y., Urbinati, E.C., Batlouni, S.R., 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Theriogenology, 78 (9), 2087-2094. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.001>
- Crouch, R.K., Gandy, S.E., Kimsey, G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes, 35, 235-41. <http://dx.doi.org/10.2337/diab.30.3.235>
- Cui, K., Li, X., Chen, Q., Li, Q., Gao, S., Tan, P., Mai, K., Ai, Q., 2020. Effect of replacement of dietary fish oil with four vegetable oils on prostaglandin E2 synthetic pathway and expression of inflammatory genes in marine fish *Larimichthys crocea*. Fish & Shellfish Immunology. 107 (b), 529-536. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fsi.2020.09.038>
- Cunha, M.A.D., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.D.O., Loro, V.L., Fonseca, M.B.D., Emanuelli, T., Veeck, A.P.D.L., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. Ciência Rural, 40, 2107-2114. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782010005000154>
- Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N., 1998. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Mol Biol*, 5, 827–835. <https://doi.org/10.1038/1869>
- Da Costa, B.B., Marques, L.S., Lassen, P.G., Rodrigues, R.B., Da Rosa-Silva, H.T., Moreira, J.C.F., Oliveira, D.L., Streit Jr, D.P. 2021. Effect of glutamine and cysteine supplementation on quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. *Aquaculture Research*, 52(5), 2173–2181. <https://doi.org/10.1111/are.15070>
- Díez, N., Pérez, R., Hurtado, V., Santidrián, S. 2005. Hyperhomocysteinaemia induced by dietary folate restriction causes kidney oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*, 94(02), 204. <https://doi.org/10.1079/bjn20051468>
- Drabkin, D. L., Austin, J. H. 1935., Spectrophotometric studies: ii. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112, 51-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)74965-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74965-X)
- Dunlap, B., Shelke, K., Salem, S.A., Keith, L.G., 2011. Folic acid and human reproduction-ten important issues for clinicians. *J Exp Clin Assist Reprod*, 8(2).
- Duplessis, M., Girard, C.L., Santschi, D.E., Laforest, J.P., Durocher, J., Pellerin, D., 2014. Effects of folic acid and vitamin B12 supplementation on culling rate, diseases, and reproduction in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2346-2354. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7369>

- Ebaid, H., Bashandy, S.A.E., Alhazza, I.M., Rady, A., El-Shehry, S., 2013. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr. Metab.* 10, 20–30. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-20>
- Eichholzer M., Tonz O., Zimmermann R., 2006. Folic acid: a public health challenge. *The Lancet*, 61, 352 -367. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68582-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68582-6)
- Eilati, E., Bahr, J.M., Hales, D.B., 2013. Long term consumption of flaxseed enriched diet decreased ovarian cancer incidence and prostaglandin E2 in hens. *Gynecologic Oncology*, 130(3), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.05.018>
- El-Fotoh, E.A., El-Rahman, G.A., Farag, M., Khalil, B., Ayyat, M., 2020. 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. <http://dx.doi.org/10.21608/zjar.2020.94498>
- El-Gamal, A.H.E., El-Greisy, Z.A., El-Ebiary, E. H., 2007. Synergistic effects of vitamins C and E and selenium on the reproductive performance of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(7), 564-573.
- El-Sayed, A.F.M., Kawanna, M., 2008. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. *Aquaculture*, 280 (1-4), 179-184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.030>
- Enayatmehr, M., Jamili, S., 2015. Prostaglandins and its role in aquatic reproduction: A Review. *IJSR*, 4, 1238-1246.
- Esmaeili, N., 2021. Blood performance: a new formula for fish growth and health. *Biology*, 10 (12), 1236. <https://doi.org/10.3390/biology10121236>
- Falah, F.J., Islami, H.R., Mehrgan, M.S., 2020. Dietary folic acid improved growth performance, immuno-physiological response and antioxidant status of fingerling Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). *Aquaculture Reports*, 17, 100391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100391>.
- FAO., 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <http://dx.doi.org/10.4060/ca9229en>.
- FAO., 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome. <http://dx.doi.org/10.4060/cc0461en>.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 415-430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Ferdous F., Scott T.R.A., 2015. Comparative examination of thrombocyte/ platelet immunity. *Immunol. Lett*, 163(1), 32-39 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.010>
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Montero, D., 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 148(2-3), 233-246. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01312-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01312-9)
- Fernández-Palacios, H., Norberg, B., Izquierdo, M., Hamre, K., 2011. Effects of broodstock diet on eggs and larvae. In: Holt, J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*, first ed. John Wiley and Sons Inc., Oxford, 153–181.

- Fiebach, N.H., Barker, L.R., Burton, J.R., Zieve, P.D., 2007. Principles of Ambulatory Medicine. Lippincott Williams e Wilkins. 1978p.
- Figueroa, E., Farias, J. G., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Risopatrón, J., Magnotti, C., Oliveira, R. P. S., 2018. 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, 493 (1-8). <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04>
- Firouz, A., Soheil, L., Hossein, K., Shabanali, N., Mohammad, B., Mohammadalikhani, M., 2013. The effects of folic acid treatment on biometric and blood parameters of finger-ling rainbow trout fishes (*Oncorhynchus mykiss*). J. Aquac. Res. Dev., 4 (3), 327-345. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000175>
- Gagnière J., Bonnet M., 2017. Chapter 15 - Molecular mechanism underlying the actions of antioxidant molecules in digestive disorders. In: Gracia-Sancho J, Salvadó J, editors. *Gastrointestinal Tissue*. New York, NY: Academic Press, 197–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805377-5.00014-X>
- Garcia-Navarro, C.E.K., Pachaly, J.R., 2005. Manual de hematologia veterinária 2.ed. Varela, São Paulo, 206p.
- Goes, M.D., Goes, E.S.R., Ribeiro, R.P., Lopera-Barrero, N.M., Castro, P.L., Bignotto, T.S., Bombardelli, R.A., 2017. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of offspring. Theriogenology, 3 (8), 254–263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.029>
- Goes, M.D., Feihrmann, A.C., Carvalho, K.I.F.S., Baumgartner, L.A., Pedreira, A.C. de O., Chagas, T.V., Meurer, F., Goes, E.S. dos R., Bombardelli, R.A. 2024 Diets with soybean oil and l-carnitine alter lipid metabolism and improve the growth and reproduction of *Rhamdia quelen* females. Aquaculture, 579:740158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740158>
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology, 56, 35-39. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- Guay, F., Matte, J.J., Girard, C.L., Palin, M.F., Giguère, A., 2002. Laforest, J.P. Effects of folic acid and vitamin B12 supplements on folate and homocysteine metabolism in pigs during early pregnancy. British Journal of Nutrition, 88 (3), 253-263. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002653>
- Guerra, M.M.P, Evans, G., Maxwell, W.M.C., 2004. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: Revisão de literatura. Rev Bras Reprod Anim, 28, 187-195.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1976. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130- 7139. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hang, Y., Hua, X., Li, X., Yi, W., Cong, X., 2022. Effect of dietary levels of folic acid on growth performance, blood biochemistry, antioxidant capacity, and immunity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Journal of the World Aquaculture Society, 53 (4), 836-847. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12889>
- Hardy, R.W., Kaushik, S. J. (Eds.), 2021. Fish nutrition. Academic press. 922p.
- Harvey, B., Carolsfeld, J. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC, Ottawa, ON, CA.

- Hartman, L., Lago, R.C.A., 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. Lab. Pract. 22 (6), 475–476
- Havixbeck, J.J., Rieger, A.M., Wong, M.E., Hodgkinson, J.W., Barreda D.R., 2016. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. J. Leukoc. Biol, 99(2), 241-252. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0215-064R>
- Hebert, K., House, J.D., Guenter, W., 2005. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. Poultry Science., 84(10), 1533-1538. <https://doi.org/10.1093/ps/84.10.1533>
- Hilbig, C.C., Nascimento, N.F., Heinen, A.L., Tovo Neto, A., Funghetto, J.P., Bombardelli, R.A., Meurer, F., Nakaghi, L.S.O., 2019. Effects of dietary fatty acids on the reproduction of South American female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). Lat. Am. J. Aquat. Res. 47 (3), 456–466. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-8>
- Hu, E., Wang, R.J., Pan, C.Y., Yang, W.X., 2009. Fatty acids: composition and functions for reproduction. Aquaculture Research Progress, 127-146.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 197 (1-4), 25-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6)
- Jeziarska, B., Lugowska, K., Witeska, M., Sarnowski, P., 2000. Malformations of newly hatched common carp larvae. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries, 3 (2).
- Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B. S., Chattopadhyay, S., Mukherjee, T., 2001. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine, 30 (12), 1390-1399. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00543-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00543-3)
- Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J.M., Adachi, S., Yamauchi, K., 2008. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by Drosophila S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. Biol. Reprod. 79, 938–946. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070052>
- Kemse, N.G., Kale, A.A., Joshi, S.R., 2014. A combined supplementation of omega-3 fatty acids and micronutrients (folic acid, vitamin B12) reduces oxidative stress markers in a rat model of pregnancy induced hypertension. PLoS One 9 (11), e111902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111902>
- Khan, Y.M., Khan, M.A., 2020. Dietary folic acid requirement of fingerling Catla, *Catla catla* (Hamilton). Aquaculture Nutrition, 26(4), 1035-1045. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.13061>
- Koakoski G., Oliveira T.A., Rosa J.G.S., Fagundes M., Kreutz L.C., Barcellos L.J.G., 2012. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. Physiology e Behavior, 106 (2), 129-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.013>
- Lavens, P., Lebègue, E., Jaunet, H., Brunel, A., Dhert, PH., Sorgeloos, P., 1999. Effects of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. Aquaculture International, 7, 225-240. <https://doi.org/10.1023/A:1009225028889>
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.

Methods in Enzymology, 186, 464-479.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)

Li M. H., Robinson E. H., Davis D. A., 2022. 4 - Complete feeds - Intensive systems. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Feed and Feeding Practices in Aquaculture (Second Edition), Woodhead Publishing, 133-149
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821598-2.00007-2>

Liew, S.C., 2016. Folic acid and diseases - supplement it or not? Rev. Assoc. Med. Bras., 1(62), 90-100. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.01.90>

Lima, S.A. de, Pedreira, A.C.O. de, Freitas, J.M.A. de, Dalmaso, A.C.S., Chiella, R.J., Meurer, F., Bombardelli, R.A., 2020. Diets containing purified nucleotides reduce oxidative stress, interfere with reproduction, and promote growth in Nile tilapia females. Aquaculture 528, 735509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735509>

Lin, Q., Zhang, Y., Zhou, R., Zhao, L., Huang, M., Zhang, X, Leung, A.Y.H., Zhang, W., Zhang, Y., 2017. Establishment of a congenital amegakaryocytic thrombocytopenia model and a thrombocyte-specific reporter line in zebrafish. Leukemia, 31, 1206–1216. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.320>

Lin, Y.H., Lin, H.Y., Shiau, S.Y., 2011. Dietary folic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses. Aquaculture, 317(1-4), 133-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.010>

Lister, A.L., Van Der Kraak, G.J., 2009. Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 76(11), 1064-1075. <https://doi.org/10.1002/mrd.21072>

Lubzens, E. Bobe, J., Young, G., Sullivan, C.V., 2017. Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. Aquaculture, 472, 107-143, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.029>

Ma, Y., Zhang, C., Gao, X.-B., Luo, H.Y., Chen, Y., Li, H., Ma, X., Lu, C.L., 2015. Folic acid protects against arsenic-mediated embryo toxicity by up-regulating the expression of Dvr1. Scientific Reports, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep16093>

Magalhães, R., Guardiola, F.A., Guerreiro, I., Fontinha, F., Moutinho, S., Olsen, R. E., Peres, H., Oliva-Teles, A., 2021. Effect of different dietary arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acid content on selected immune parameters in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology Reports, 2, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100014>

Manrique M.G., Figueiredo, M.A.P., Belo M.A.A., Martins M.L., Moraes F.R., 2017. Chronic granulomatous inflammation in teleost fish *Piaractus mesopotamicus*: histopathology model study. Revta MVZ Cordoba, 22(1), 5738-5746. <https://doi.org/10.21897/rmvz.933>

Marchioro, A.A., Sá-Nakanishi, A.B.D., Campanerut, P.A.Z., 2010. Importância do ácido fólico. Revista Uningá Review, 1(1), 64-70.

Marks, F., Fürstenberger, G., 2008. Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application. John Wiley & Sons.

Martins, T.P.A., Ferreira, T.M.S., Gomides, P.F.V., Navarro, F.K.S.P., Murata, L.S., Navarro, R.D., 2014. Importance of vitamin c on growth and gonadal development in fish. Nucleus Animalium, 6(2), 111-118. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1084>

- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227, 21-33. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00493-9)
- McDowell, L.R., 2000. Vitamins in animal and human nutrition. Iowa: Iowa State University Press, 793p.
- Medici, V., Halsted, C.H., 2012. Folate, alcohol, and liver disease. *Molecular Nutrition e Food Research*, 57, (4), 596-606. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200077>
- Meurer, F., Bombardelli, R.A., Hayashi, C., Fornari, D.C., 2005. Grau de moagem dos alimentos em rações para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. *Acta Sci. Anim. Sci.* 27 <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i1.1245>
- Meurer, F., Franzen, A., Piovesan, P., Rossato, K.A., Santos, L.D. dos., 2012. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *Aquac. Res.* 43, 1734-1737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02974.x>
- Mewes, J.K., Meurer, F., Tessaro, L., Buzzi, A.H., Syperreck, M.A., Bombardelli, R.A., 2016. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. *Aquaculture*, 465, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.035>
- Michelson, A., Cattaneo, M., Frelinger, A., Newman, P., 2019. Platelets. 4th Edition, Academia Press, Elsevier Science, San Diego, CA, United States, 1268p.
- Millacura, N., Pardo, R., Cifuentes, L., Suazo, J., 2017. Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: A metaanalysis. *Public Health Nutrition*, 20(12), 2260-2268. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000878>
- Mizubuti, I.Y., Pinto, A.P., Ramos, B.M.O., Pereira, E.S., 2009. Métodos laboratoriais de avaliação de alimentos para animais. EDUEL, Londrina, 228p
- Mommsen, P.T., Korsgaard, B., 2008. Vitellogenesis. In: Rocha, M.J., Arukwe, A., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Reproduction Science* Publishers, CRC Press, Boca Raton, 113–169.
- Moraes, A.C., Prado, E.J.R., Foz, E.P., Barbuio, R., Faria, V.P., Belo, M.A.A., 2018. Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38 (8), 1570-1576. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5533>
- Nascimento, C.Z. do, Meurer, F., Romão, S., Cazarolli, L.H., Marcon, S., Chagas, T.V., Bombardelli, R.A., 2023. 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*, 297, 115568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115568>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2022. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 8th ed. Artmed, Porto Alegre. 1248p.
- Neumann, G., Bernardes Junior, J.J., Neumann, V., Bombardelli, R.A., 2021. Comparing accuracy of fish sperm motility measurements obtained from two computational extremes in tracking approaches: Nearest neighbor and multiple hypothesis tracking. *Reproduction in Domestic Animals*, 6 (56), 829-836. <https://doi.org/10.1111/rda.13922>

- Ng, W.K., Tee, M.C., Boey, P.L., 2000. Evaluation of crude palm oil and refined palm olein as dietary lipids in pelleted feeds for a tropical bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes). *Aquaculture Research*, 31(4), 337-347.
- Ng, W., Romano, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev. Aquac.* 5 (4), 220–254. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>
- Ng, W., Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture*, 314, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.034>
- NRC - Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp (United States), 2011. Division on Earth and Life Studies. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington: The National Academies Press, 376 p.
- Oliveira Filho, P.R.C., Fracalossi, D. M., 2006. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1581-1587. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000600002>
- Panigrahi, A., Naveenkumar, R., Das, R.R., 2021. Immunoprophylactic Measures in Aquaculture. In: Pandey, P.K., Parhi, J. (eds) *Advances in Fisheries Biotechnology*. Springer, Singapore. 263–288. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3215-0_18
- Parra, J.E.G., Radünz Neto, J., Veiverberg, C.A., Lazzari, R., Bergamin, G.T., Pedron, F. de A.; Rossato, S., Sutili, F.J., 2008. Use of lipid sources on feeding jundiá (*Rhamdia quelen*) and its relation with embryo and larval development. *Ciência Rural*, 38 (7), 2011-2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008000700033>
- Pedreira, A.C.O., Malacarne, A.M., Dalmaso, A.C.S., Carvalho, K.I.F.S., Chagas, T.V., Gambetta, M.I.R.S., Chiella, R.J., Bombardelli, R.A., 2022. L-carnitine solution used on *Rhamdia quelen* thawed sperm activation boosts sperm movement, maintains larval quality, and permits to optimize the sperm use. *Animail Reproduction Science*, 245, 107054. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107054>
- PeixeBR - Associação brasileira de piscicultura., 2020. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2020. São Paulo, SP: Associação Brasileira de Piscicultura. 136p.
- Peng, X., Li, F., Lin, S., Chen, Y., 2016. Effects of total replacement of fish oil on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Int.* 24 (1), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9914-7>
- Petrillo, T.R., Claudiano, G.S., Yunis-Aguinaga, J., Manrique, W.G., Castro, M.P., Belo M.A.A., Moraes J.R.E., Moraes F.R., 2017. Influence of dexamethasone and levamisole on macrophage recruitment, giant cell formation and blood parameters in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus*. *Biosci. J.*, 33, 1015-1027. <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n4a2017-33016>
- Pousis, C., Rodríguez, C., De Ruvo, P., De Virgilio, C., Pérez, J.A., Mylonas, C.C., Corriero, A., 2019. Vitellogenin receptor and fatty acid profiles of individual lipid classes of oocytes from wild and captive-reared greater amberjack (*Seriola dumerili*) during the reproductive cycle. *Theriogenology*. 140, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.014>

- Prado, G.C., Matos, F.S. de; Zanella, R. 2017. Método rápido para a determinação de ácido fólico em farinha de trigo empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos. *Scientia Chromatographica*, 9 (1), 55-61. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.005>
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. 1ª Ed., Maringá: Edum. 140p. <https://doi.org/10.7476/9788576286530>
- Reidel, A., Boscolo, W.R., Feiden, A., Romagosa, E., 2010. The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture*, 298, 354-359. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.005>
- Réus, G.Z., Maciel, A.L., Abelaira, H.M., de Moura, A.B., de Souza, T.G., dos Santos, T.R., Darabas, A.C., Parzianello, M., Matos, D., Abatti, M., Vieira, A.C., Facillini, V., Michels, M., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2018. Omega-3 and folic acid act against depressive-like behaviour and oxidative damage in the brain of rats subjected to early or late life stress. *Nutr*, 53, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.03.006>
- Robinson, J.J., 1996. Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 25-34. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01526-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(96)01526-6)
- Roudsari, S.F., Islami R.H., Mousavi, S.A., Mehdi, S.M., 2021. Folic Acid-Coated Nanochitosan Ameliorated the Growth Performance, Hematological Parameters, Antioxidant Status, and Immune Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Veterinary Science*, 8, <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.647722>
- Ruiz-González, L.E., Tafoya-Sánchez, D.J., Tintos-Gómez, A., Del Rio-Zaragoza, O.B., Ceballos, M.A.V., Vega-Villasante, F. 2023. Some blood parameters of Pacific fat sleepers, *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844): a comparative study between male and female in two growth stages. *Latin american journal of aquatic research*, 51(4), 592-597. <https://doi.org/10.3856/vol51-issue4-fulltext-2990>
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., Nash, J. P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>
- Sakabe, R., Moraes, F.R., Belo, M.A.A., Pilarski, F., Moraes, J.R.E., 2013. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids. *Pesq. Agropec. Bras*, 48(3), 313-319. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000300010>
- Santos, H.K., Meurer, F., 2020. Nutrition and Feeding Aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*) Nutrition and Feeding. Review in *Aquaculture*, 12, 299-309. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12318>
- Sarmah, S., Marrs, J.A., 2013. Complex cardiac defects after ethanol exposure during discrete cardiogenic events in zebrafish: prevention with folic acid. *Developmental Dynamics*, 242 (10), 1184-1201. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.24015>
- Schieber, M. and Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24, 453-462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Scully, C., 2014. 8-Haematology. In: Scully, C. (Ed.), *Scully's Medical Problems in Dentistry*, seventh edition. Churchill Livingstone, Oxford, pp. 212–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5401-3.00008-4>

- Sesay, D. F., Habte-Tsion, H.M., Zhou, Q., Ren, M., Xie, J., Liu, B., Chen, R., Pan, L., 2016. 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*, 452, 142-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.026>
- Sesay, D.F., Habte-Tsion, H.M., Zhou, Q., Ren, M., Xie, J., Liu, B., Chen, R., Pan, L., 2017. The effect of dietary folic acid on biochemical parameters and gene expression of three heat shock proteins (HSPs) of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerling under acute high temperature stress. *Fish Physiol Biochem*, 43, 923–940. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0311-6>
- Shafaeipour, A., Gorjipour, E., Kamayi, K., Falahatkar, B., 2011. Effects of Different levels of folic acid and vitamin C on Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42 (2) 281-286. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00465.x>
- Shahsavani, D., Mohri, M., Kanani, H. G., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish physiology and biochemistry*, 36 (1), 39-43. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-008-9277-3>
- Shi, L., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Feng, L., 2020. The effect of dietary folic acid on flesh quality and muscle antioxidant status referring to Nrf2 signalling pathway in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 26 (3), 631-645, <http://dx.doi.org/10.1111/anu.13023>
- Singh, A.K., Jiang, Y., White, T., Spassova, D., 1997. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats, and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9 (3), 261-8. <https://doi.org/10.1177/104063879700900307>
- Tavares-Dias, M.; Ono, E. A.; Pilarski, F.; Moraes, F. R., 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal of Applied Ichthyology*, 23 (6), 709-712. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00850.x>
- Tessaro, L., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Krause, R.A., Meurer, F., Natali, M.R.M., Bombardelli, R.A., 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*, 326-329, 74-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.012>
- Tessaro, L., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Krause, R. A., Meurer, F., Natali, M.R.M., Bombardelli, R.A., 2014. Animal performance and reproductive aspects of female *Rhamdia quelen* fed on different levels of digestible energy. *Aquaculture Research*, 45, 1425–1433. <https://doi.org/10.1111/are.12087>
- Vallée, M., Guay, F., Beaudry, D., Matte, J., Blouin, R., Laforest, J.P., Lessard, M., Palin, M.F., 2002. Effects of Breed, Parity, and Folic Acid Supplement on the Expression of Folate Metabolism Genes in Endometrial and Embryonic Tissues from Sows in Early Pregnancy, *Biology of Reproduction*, 67 (4), 1259-1267. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1259>
- Vazzoler, A.E.A., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá, São Paulo. 169p.
- Wisniewska, K., Wysocki, J., 2008. The importance of folic acid in the primary prevention of congenital malformations. *Archives of Perinatal Medicine*, 14(2), 32-40.
- Witeck, L., Bombardelli, R.A., Sanches, E.A., Oliveira, J.D.S. de Baggio, D.M., Souza, B.E. de., 2011. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on Jundiá catfish in cadmium

contaminated water. R. Bras. Zootec. 40 (3), 477-481. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300003>

Woynarovich, E., Horváth, L.A., 1980. The artificial propagation of warm-water finfishes-manual of extensions. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 1-183.

Wu, G., 2022. Nutrition and Metabolism: Foundations for Animal Growth, Development, Reproduction, and Health. In: Wu, G. (eds) Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1354. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85686-1_1

Wu, J.P.; Wu, F., Jiang, M., Wen, H., Wei, Q.W., Liu, W., Tian, J., Huang, F., Yang, C.G., 2016. Dietary folic acid (FA) requirement of a genetically improved Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Journal of Applied Ichthyology, 32 (6), 1155-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.13151>

Yang, H.T., Yang, M.C., Sun, J.J., Guo, F., Lan, J.F., Wang, X.W., Zhao, F. Wang, J.X. 2015. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. Fish & Shellfish Immunology, 47(1), 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.021>

Yang, L., Wu, L., Meng, P., Zhang, X., Zhao, D., Lin, Q., Zhang, Q., 2022. Generation of a thrombopoietin-deficient thrombocytopenia model in zebrafish. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 20 (8), 1900-1909. <https://doi.org/10.1111/jth.15772>

Yao, Y., Yu, B., Chen, D.W., Tian, G., Mao, X.B., Zheng, P., Liu, J.B., 2013. Effect of Dietary Folic Acid Supplementation on Growth Performance and Hepatic Protein Metabolism in Early-Weaned Intrauterine Growth Retardation Piglets. Journal of Integrative Agriculture, 12 (5), 862-868. [http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119\(13\)60262-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(13)60262-2)

Yeganeh K.A., Ershad L.H., Valipour A., A.S., 2022. Fingerling beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758) growth, hematological, biochemical parameters and opercular respiratory rate under hypoxia challenge with levels of dietary folic acid. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 21(6), 1558-1572. <http://dx.doi.org/10.22092/ijfs.2023.128564>

Yue, C., Ji, C., Zhang, H., Zhang, L.W., Tong, J., Jiang, Y., Chen, T., 2017. Protective effects of folic acid on PM2.5-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways. Environmental Toxicology, 32(10), 2316-2322. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.22448>

Zehra, S., Khan, M.A., 2020. 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, 262, 114397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114397>

Zempleni, J., Rucker, R. B., McCormick, D. B., Suttie, J. W., 2007. Handbook of vitamins. 4th ed. Boca Raton: Taylor e Francis, 593p.